

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Zentrums für Innere Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

Adenovirale Gentherapie des adrenokortikalen Karzinoms

In vitro Studien zur Transduzierbarkeit adrenokortikaler Zelllinien

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Verena Boßung

aus Stade

Hamburg

2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 18.02.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Ch. Bamberger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F.U. Beil

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Dr. A. Block

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das adrenokortikale Karzinom	2
2.2	Tumoren und das Immunsystem	4
2.2.1	Die Entstehung von Tumoren	4
2.2.1.1	Genetische Veränderungen bei Tumoren	5
2.2.1.2	Von der Mutation zum Tumor	5
2.2.2	Tumorimmunologie	6
2.2.2.1	Tumorantigene	6
2.2.2.2	Die Immunantwort auf Tumoren	7
2.2.2.3	Die Beziehung zwischen Tumor und Immunsystem	8
2.2.2.4	Escape-Mechanismen	8
2.2.2.5	Immuntherapie von Tumoren	9
2.3	Die Nebennierenrinde und das Immunsystem	10
2.4	Antitumorale Gentherapie	11
2.4.1	Vektoren	11
2.4.1.1	Möglichkeiten des Gentransfers	11
2.4.1.2	Das Adenovirus als Vektor	13
2.4.2	Gentherapeutische Konzepte	15
2.4.2.1	Möglichkeiten der antitumoralen Gentherapie	15
2.4.2.2	Zytokingentherapie mit Interleukin-12	16
2.4.2.3	Zytokingentherapie mit Interleukin-18	19
2.4.2.4	Regulierbare Genexpression in der Gentherapie	20
2.4.2.5	Die Adenoviren des 3r-Systems	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	24
3.1.2	Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur	25
3.1.3	Labormaterial	25
3.1.4	Analyse Kits	26
3.1.5	Geräte	26
3.1.6	Zelllinien	27
3.1.7	Viren	27
3.2	Zellkultur	27
3.2.1	Verwendete Zelllinien	27
3.2.2	Allgemeine Methoden der Zellkultur	28
3.3	Amplifikation und Purifikation von Adenoviren	29
3.3.1	Amplifikation der Viren	29
3.3.2	Purifikation der Viren	30
3.4	Plaque-Assay	32

3.5	Analyse der Transduktion adrenokortikaler Zelllinien	33
3.5.1	Muriner Interleukin-12-Assay (Ad.3r-mscIL-12)	34
3.5.2	Muriner Interleukin-18-Assay (Ad.3r-mIL-18)	35
3.5.3	β -Galaktosidase-Assay (Ad.RSV- β -Gal) und H.E. Färbung von NCI-H295	35
3.5.4	Luciferase-Assay (Ad.3r-luc)	37
3.5.5	Humaner Interleukin-12-Assay (Ad.3r-hscIL-12)	38
3.6	Bioaktivitätsanalyse von Interleukin-12 im Interferon- γ -Bioassay	39
3.7	Proteinquantifizierung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Ergebnisse mit murinen Nebennierenkarzinomzellen	42
4.1.1	Analyse der Transduzierbarkeit von Y1-Zellen mit Ad.3r-mscIL-12	42
4.1.2	Vergleich der Interleukin-12 Produktion von Y1-Zellen mit HT29-Zellen	43
4.1.3	Analyse der Bioaktivität des produzierten Interleukin-12	45
4.1.4	Analyse der Transduzierbarkeit von Y1-Zellen mit Ad.3r-mIL-18	46
4.1.5	Vergleich der Interleukin-18 Produktion von Y1-Zellen mit HT29-Zellen	47
4.2	Ergebnisse mit humanen Nebennierenkarzinomzellen	48
4.2.1	Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.RSV- β -Gal	48
4.2.2	Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.3r-luc	50
4.2.3	Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.3r-hscIL-12	55
4.2.4	Vergleich der Supprimierbarkeit in Abhängigkeit von m.o.i. und Zelllinie	56
5	Diskussion	58
5.1	Immunogenherapie von Tumoren	58
5.2	Immuntherapie und Gentherapie des adrenokortikalen Karzinoms	60
5.3	Die regulierte Genexpression in der Tumorthherapie	61
5.4	Erfolg von Vektoren des 3r-Systems in adrenokortikalen Zelllinien	63
5.4.1	Transduzierbarkeit und Transduktionseffizienz	64
5.4.2	M.o.i. abhängige Transgenexpression	66
5.4.3	Supprimierbarkeit durch Doxycyclin	67
5.5	Zukunft der Immunogenherapie beim adrenokortikalen Karzinom	69
6	Zusammenfassung	71
	Literaturverzeichnis	72
	Abbildungsverzeichnis	85
A	Anhang	86
A.1	Plasmidkarten der Expressionsplasmide	86
A.2	Abkürzungsverzeichnis	87
	Danksagung	90
	Lebenslauf	91
	Erklärung	92

Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit einem neuen experimentellen Therapieansatz aus dem Bereich der Zytokingentherapie für das adrenokortikale Karzinom. Das adrenokortikale Karzinom ist ein seltener endokriner Tumor, der aufgrund von spät auftretenden Symptomen und mangelhaften Therapieoptionen zur Zeit eine schlechte Prognose hat. Es besteht somit ein deutlicher Bedarf an ergänzenden Therapiemöglichkeiten, die in Kombination mit den herkömmlichen Mitteln eine Prognoseverbesserung bewirken können. Diese Arbeit evaluierte die Eignung einer solchen neuen Therapieoption für das adrenokortikale Karzinom.

Es sollte die Anwendbarkeit des 3r-Vektorsystems auf murine und humane adrenokortikale Karzinomzelllinien *in vitro* getestet werden. Die eingesetzten Vektoren basieren auf E1/E3-deletierten Adenoviren, die ein therapeutisches Konstrukt tragen, welches die Zielgene für die Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18 unter der Kontrolle eines autoregulativen durch Tetracyclin regulierbaren Promotors exprimiert. Zunächst wurde die murine adrenokortikale Zelllinie Y1 mit dem Vektor Ad.3r-mscIL-12 transduziert und die Interleukin-12 Produktion sowie ihre Supprimierbarkeit durch Doxycyclin ermittelt. Diese Daten wurden mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 verglichen. Das produzierte Interleukin-12 wurde hinsichtlich seiner Bioaktivität analysiert. Als nächstes wurde der Vektor Ad.3r-mIL-18 zur Transduktion von Y1- und HT29-Zellen verwendet und die Transduktionseffizienz verglichen. Nach den Versuchen mit den murinen Zellen sollte auch die Transduzierbarkeit der humanen adrenokortikalen Zelllinie NCI-H295 mit Adenoviren des 3r-Systems evaluiert werden. Über ihre Transduzierbarkeit mit Adenoviren generell war wenig bekannt. Zunächst wurde daher ein qualitativer Versuch mit dem Vektor Ad.RSV- β -Gal unternommen, um die Transduzierbarkeit zu testen und vergleichend die Morphologie der Zellen in der H.E. Färbung dargestellt. Im nächsten Schritt erfolgte die Transduktion der Zellen mit einem Vektor des 3r-Systems. Dazu wurde Ad.3r-luc gewählt, der das Transgen Luciferase exprimiert. Als letztes wurde die Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.3r-hscIL-12 untersucht, der für die humane Variante des Zytokins Interleukin-12 kodiert, und somit auch für den Einsatz beim Menschen geeignet ist.

Die gewonnenen Daten über die Transduzierbarkeit, die m.o.i. abhängige Transgenexpression und die Supprimierbarkeit durch das Antibiotikum Doxycyclin der unterschiedlichen Zelllinien und Vektoren wurden vergleichend ausgewertet, um eine Aussage darüber zu treffen, ob das 3r-System für den *in vitro* Einsatz in adrenokortikalen Tumorzellen geeignet ist. Dies ist Grundvoraussetzung für eine weitere Erforschung des Ansatzes zur Therapie des adrenokortikalen Karzinoms in der Klinik.

Einleitung

Die Einleitung gibt zunächst einen Überblick über das Krankheitsbild des adrenokortikalen Karzinoms, dessen Therapie Gegenstand dieser Dissertation ist. Es folgt eine Einführung in die Tumorummunologie, d.h. in die Wechselwirkungen zwischen Kanzerogenese und Immunsystem, sowie ein Überblick über die Möglichkeiten der antitumoralen Gentherapie. Beides sind Grundlagen für das in dieser Dissertation verwendete 3r-System, ein Vektorsystem aus dem Bereich der Zytokingentherapie, das am Ende der Einleitung vorgestellt wird.

2.1 Das adrenokortikale Karzinom

Epidemiologie Das adrenokortikale Karzinom (ACC) zählt mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro einer Million Einwohner pro Jahr in den USA zu den seltenen Tumorarten [123]. Es führt dort zu 0,2% der Krebstodesfälle. Bei der Altersverteilung gibt es zwei Gipfel in der ersten und vierten Lebensdekade. Junges Alter scheint die Prognose zu verbessern, da bei Erwachsenen aggressivere Tumorformen auftreten als bei Kindern. Es gibt deutliche Hinweise auf eine Dominanz beim weiblichen Geschlecht und bei Weißen. Die Prognose scheint vom Geschlecht jedoch nicht beeinflusst zu werden [187]. Als Risikofaktoren sind bei Männern das Rauchen und bei Frauen die Einnahme oraler Kontrazeptiva belegt [85].

Pathogenese Adrenokortikale Tumoren treten sporadisch oder in Verbindung mit verschiedenen hereditären Syndromen auf. Durch das Studium syndromaler genetischer Aberrationen erhofft man sich Aufschlüsse über die molekulare Pathogenese des ACC. Im Rahmen des autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndroms tritt der Tumor in 1% der Patienten auf. Hierbei spielen Keimbahnmutationen des p53-Gens eine Rolle. Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom wiederum spielt eine Verminderung des Tumorsuppressors p57 sowie die Überexpression von IGF-2 eine Rolle. Es wird vermutet, dass IGF-2 bei der Tumorprogression mitwirkt. Auch im Rahmen der autosomal-dominanten Multiplen Endokrinen Neoplasie 1 tritt das ACC auf, wobei hier das Menin-Gen von Bedeutung ist. Ferner findet man Neubildungen der NNR beim Carney-Komplex, dem Familiären Hyperaldosteronismus und der Kongenitalen Adrenalen Hyperplasie. Bisher bleibt unklar, welche Rolle diese Mutationen bei der sporadischen Form des ACC spielen. Dabei ist auch die Abgrenzung des Überganges von Adenomen zu Karzinomen wichtig. Adenome scheinen eher polyklonalen Ursprungs zu sein, Karzinome monoklonalen, so dass Theorien über eine Adenom-Karzinom-Progression existieren. All diese Ansätze bedürfen jedoch noch weiterer genauer Evaluation. [100]

Klinik Etwa 60% der adrenokortikalen Karzinome sind funktionell aktiv, d.h. dass ihre Hormonproduktion beim Patienten zu klinischen Symptomen führt [187]. Das häufigste Symptom ist ein Cushing-Syndrom, bei Kindern kommt es durch erhöhte Androgenspiegel sehr häufig zur Virilisierung und Pseudopubertas praecox. Bei erwachsenen Frauen führt der Androgenexzess zu Hirsutismus, tiefer Stimme, Brustatrophie, Haarverlust und Menstruationsstörungen. Bei Männern kann ein Östrogenüberschuss zu Gynäkomastie und Hodenatrophie, bei Frauen zu Mastopathie und Blutungsunregelmäßigkeiten führen. Hyperaldosteronismus ist im Rahmen des ACC selten, kann dann aber Hypokaliämie und Hypertension hervorrufen. Nicht-funktionelle Tumoren werden meist erst spät erkannt und resultieren durch die Tumormasse in Völlegefühl, Übelkeit, Verdauungsstörungen und Schmerzen. Eine B-Symptomatik ist selten. Auch können die Erstsymptome durch Metastasen bedingt sein, wie z.B. pathologische Frakturen. Lokal infiltrierendes Wachstum, z.B. in den Nierenpol oder die V. cava inferior, Lymphknotenbefall sowie Fernmetastasen, zuerst in Leber und Lunge, sind bei fortgeschrittenem ACC häufig. [6]

Diagnostik In der Tumordiagnostik kommt die Standardbildgebung mit Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Die letzteren dienen insbesondere der Einschätzung über Ausbreitung und Dignität des Tumors. Hinsichtlich der Dignitätsevaluation können auch die Szintigraphie oder PET-Untersuchungen zum Einsatz kommen, sind aber kaum als Standarddiagnostika zu bezeichnen. Für das Staging ist ein CT des Thorax und des Abdomens empfehlenswert. Neben der Bildgebung ist die Erstellung eines Hormonprofils wichtig. Feinnadelbiopsien sind aufgrund ihrer Komplikationsrate und mangelnden Aussagekraft umstritten. [6]

Staging Das Staging ist entscheidend für die Therapie und Prognose eines Tumorleidens. Beim ACC wird meist die MacFarlane Klassifikation [113] in ihrer Modifikation nach Sullivan [175] angewendet.

Stadium	Größe	Lymphknoten	Lokalinfiltration	Metastasen	TNM
I	<5 cm	-	-	-	T ₁ N ₀ M ₀
II	>5 cm	-	-	-	T ₂ N ₀ M ₀
III	alle	+	+	-	T _{1,2} N ₁ M ₀
IV	alle	+	+	+	T _{1,2} N ₁ M ₁

Tabelle 2.1: Staging nach der MacFarlane Klassifikation in ihrer Modifikation nach Sullivan

Therapie Die chirurgische Entfernung des Tumors ist zur Zeit die Therapie der Wahl. Je nach Tumorausdehnung erfolgt eine Adrenalektomie kombiniert mit Nephrektomie sowie Splenektomie oder auch eine Entfernung von Teilen der Leber und des Pankreas. Umstritten ist die chirurgische Intervention bei den fortgeschrittenen Stadien III und insbesondere IV. Bei inkompletter Entfernung des Primärtumors oder Vorliegen von Metastasen liegt das mittlere Überleben unter 12 Monaten. Allerdings können die durch den Hormonexzess bedingten Symptome durch die Resektion gebessert werden. Die Chirurgie kann bei Rezidivtumor oder Metastasen das Überleben verlängern, aber keine Heilung darstellen. [6]

Bei der medikamentösen Therapie des metastasierten ACC ist Mitotane das bislang einzige effektive Mittel. Mitotane ist eine zytotoxische Substanz mit selektiver Aktivität in der NNR. Nach metabolischer Transformation führt es durch kovalente Bindung an Enzyme oder durch oxidative Schädigung zur Nekrose der NNR. Da aber die Fähigkeit von Tumoren zur Transformation von Mitotane variiert, ist der

Erfolg der Therapie sehr unterschiedlich [162]. Hinzu kommt, dass ein Großteil der Patienten unter den dosisabhängigen Nebenwirkungen leidet. Es kommt zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall bei über 80% der Patienten, neuropsychiatrischen Symptomen wie Lethargie in mehr als 25% und Hautausschlag in mindestens 10%. Die optimale Tagesdosis liegt zwischen 6-10 g und wird auf mehrere Portionen verteilt. Aufgrund des adrenolytischen Effekts von Mitotane müssen Glukokortikoide und Mineralokortikoide in ausreichendem Maße ersetzt werden. Es gibt Ansätze zum adjuvanten Einsatz von Mitotane nach chirurgischer Intervention vor dem Auftreten von Metastasen. Dies ist jedoch umstritten. Auch bei Patienten mit metastasiertem ACC konnte nur in insgesamt 35% der Fälle ein Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden und selbst eine erfolgte Tumorregression konnte oft das Überleben nicht verlängern [187].

Die Erfolge einer Chemotherapie waren in der Vergangenheit begrenzt. Das ACC ist resistent gegenüber vielen Chemotherapeutika, was mit dem MDR1 Protein in Zusammenhang gebracht wird, einer membranständigen Pumpe für Medikamente, die sowohl in normalem als auch entartetem adrenokortikalen Gewebe gefunden wird [39]. Die beiden erfolgreichsten Chemotherapieregime sind das sog. Italienische Protokoll (Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin, Mitotane) mit einer Ansprechrate von 48,6% [17] und die Kombination der Substanzen Streptozotocin und Mitotane mit einer Ansprechrate von 36,4% [93]. Diese beiden Protokolle werden derzeit in der FIRM-ACT Studie miteinander verglichen [51].

Der Effekt einer Strahlentherapie ist umstritten. Sie ist Therapie der Wahl bei Knochenmetastasen und es gibt Hinweise auf einen positiven Effekt einer adjuvanten Bestrahlung des Tumorbetts im Stadium III. Zusätzlich spielt sie eine Rolle als Palliativtherapie bei metastasiertem Tumorleiden. [6]

Prognose Trotz vieler Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von Tumoren bleibt die Prognose des ACC schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate unter Therapie liegt in verschiedenen Studien zwischen 23% und 60%. Prognostisch günstig sind ein frühes Tumorstadium und eine komplette chirurgische Exzision [6]. Eine suffiziente adjuvante Therapie insbesondere für fortgeschrittene Stadien fehlt bislang. Dies zeigt die Notwendigkeit für die Erforschung neuer Wege, die in Kombination mit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren die Aussicht von Patienten mit adrenokortikalem Karzinom verbessern.

2.2 Tumoren und das Immunsystem

Viele Mechanismen der Kanzerogenese konnten erst durch die Möglichkeiten der modernen molekularbiologischen Techniken gefunden werden und zahlreiche Rätsel bleiben nach wie vor ungelöst. Trotzdem postulierte schon Paul Ehrlich vor einem Jahrhundert, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren unterdrückt [46]. Im folgenden soll ein Einblick in die Grundlagen der Tumorentwicklung sowie in die Zusammenhänge zwischen Tumoren und dem Immunsystem gegeben werden.

2.2.1 Die Entstehung von Tumoren

Die Transformation einer gesunden Körperzelle in eine maligne entartete Tumorzelle ist ein komplexer Prozess, der in seinen Einzelheiten noch nicht verstanden ist. Jede einzelne der mindestens 10^{14} Zellen des menschlichen Körpers [105] verfügt über das komplette menschliche Genom mit seinen etwa 20 bis 25.000 Genen enthalten in 2,85 Milliarden Nukleotiden der DNA [89]. Eine Vielzahl von Regelkreisen sorgt für ein harmonisches Zusammenspiel der Zellen unterschiedlichster Gewebe, die zur Funktion des menschlichen Körpers als Ganzes nötig sind. Brechen Zellen aus diesen Regelkreisen aus, kann es zu Krebs kommen, einem unkontrollierten Wachstum von abnormalen Zellen.

2.2.1.1 Genetische Veränderungen bei Tumoren

In Tumorzellen werden genetische Veränderungen gefunden, welche die Basis für eine maligne Transformation bilden. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden: Dominante Veränderungen, bei denen die Mutation eines Allels bereits zur Ausprägung führt und die typischerweise eine Funktionszunahme bewirken, betreffen Proto-Onkogene, welche hierdurch zu Onkogenen werden. Rezessive Veränderungen, bei denen beide Allele mutiert sein müssen, um zur Ausprägung zu kommen, werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet und beinhalten einen Funktionsverlust. Tumoren entstehen aus Kombinationen von dominanten und rezessiven Veränderungen, welche erworben oder angeboren sein können. [21]

Onkogene kommen zum Tragen, wenn das Proto-Onkogen qualitativ oder quantitativ verändert wird. Qualitative Veränderungen des Gens sind beispielsweise Punktmutationen oder Genfusionen im Rahmen einer Translokation. Quantitative Aktivierung von Proto-Onkogenen kommt durch Genamplifikationen oder ebenfalls durch Translokationen von Genen in DNA-Abschnitte unter der Kontrolle hochaktiver Regulatorsequenzen zustande. Ein Beispiel für ein Proto-Onkogen, das häufig durch Punktmutation aktiviert wird, ist das Ras-Onkogen. Es kodiert drei membranassoziierte G-Proteine, welche am Anfang verschiedener Signalkaskaden stehen, die für Zellzyklus und Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle spielen. In 30% der menschlichen Tumoren werden Ras-Mutationen gefunden, die ein konstitutives Proliferationssignal bedingen. Onkogene, welche für Tyrosinkinasen kodieren, sind ebenfalls häufig qualitativ verändert. Die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen ist in der zellulären Signaltransduktion weit verbreitet und unphysiologische Phosphorylierung durch Genveränderung führt oft zur Karzinogenese. Amplifikation von Onkogenen führt zu deren Überexpression und tritt häufig erst im Rahmen der Tumorprogression auf. Beispiele für Proto-Onkogene, die durch Amplifikation aktiviert werden, sind *n-myc* beim Neuroblastom oder *her2* beim Mammakarzinom. [13]

Tumorsuppressorgene greifen wie Onkogene in die Signalkaskaden der Zelle ein. Sie kodieren für Proteinphosphatasen, GTPase-stimulierende Proteine oder Transkriptionsfaktoren und stellen damit auf vielen Ebenen Gegenspieler zu Onkogenen dar. Nach Kinzler und Vogelstein werden Gatekeeper und Caretaker unterschieden [96]. Gatekeeper greifen als Pfortner gewebespezifisch in die Regulation der Zellproliferation ein. Fällt ein solcher Tumorsuppressor aus, stellt dies den Beginn einer malignen Entartung dar. Beispiele sind das *apc*-Gen (Familiäre Adenomatöse Polyposis), das *nf1*-Gen (Neurofibromatose-1) und das *rb*-Gen (Retinoblastom). Caretaker sind DNA-Reparaturproteine, deren Ausfall nicht direkt zur Tumorentstehung führt, aber Mutationen begünstigt. Als Beispiele seien die Gene *brca1/2* (Mamma/Ovarial-Karzinom) und *xp* (Xeroderma Pigmentosum) genannt. Eine zentrale Rolle bei fast allen Tumoren spielt der Tumorsuppressor p53, ein Transkriptionsfaktor, der auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet wird [103]. Als Antwort auf DNA-Schäden vermittelt p53 in Interaktion mit Promotoren das weitere Schicksal der Zelle und entscheidet, ob der Schaden repariert wird, die Zelle in der G1-Phase arretiert oder es zur Apoptose kommt. Ferner wirkt es antiangiogenetisch. In Hinblick auf diese zentralen Funktionen ist nachvollziehbar, dass p53-Mutationen in der Kanzerogenese eine zentrale Rolle spielen [13].

2.2.1.2 Von der Mutation zum Tumor

Wie genau aus den Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine entartete Zelle entsteht, ist bei fast allen Tumoren ungeklärt. Allgemein gesprochen kann man sagen, dass Krebszellen entstehen, wenn die Anzahl an Mutationen die Reparaturkapazität der Zelle übersteigt. Für einige Tu-

morarten wurden Modelle zur Abfolge von Mutationen aufgestellt, die auf dem Weg einer normalen zu einer Tumorzelle durchlaufen werden müssen. Das bekannteste ist wohl das Modell zur Adenom-Karzinom-Sequenz bei der Entstehung von Kolonkarzinomen, das die Mutationen in eine Reihenfolge stellt und ihnen eine biologische Wertigkeit zuordnet. [49]

Hanahan und Weinberg postulierten, dass es für jeden menschlichen Tumor sechs Eigenschaften gibt, die er auf dem Weg zur Malignität erlangen muss; Prinzipien, welche für alle Tumoren gelten [73]. Die erste davon ist eine Unabhängigkeit von Wachstumssignalen. Im Abschnitt über Tumorgene wurden bereits Mutationen beschrieben, die Signalkaskaden der Zellproliferation betreffen. Der zweite Schritt ist eine Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, wie z.B. TGF β -Resistenz oder Verlust der Funktion des Retinoblastoms. Im dritten Schritt entgeht die Tumorzelle der Apoptose. p53 Mutationen spielen hierbei beispielsweise eine Rolle. Als viertes muss eine grenzenlose Teilungsfähigkeit erreicht werden, was auch als Immortalität bezeichnet wird. Hierbei sind die Telomeren der Chromosomen entscheidend, welche normalerweise innerhalb jedes Zellzyklus verkürzt werden. Tumorzellen können dem durch erhöhte Telomeraseaktivität oder chromosomale Rekombination entgehen. Als fünftes müssen Tumoren die Angiogenese induzieren können. Auch hierbei spielt p53 eine Rolle. Im letzten Schritt erreicht jeder Tumor die Eigenschaft zur Gewebeinvasion und Metastasierung, wobei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verändert sind. Die Reihenfolge des Erlangens der Eigenschaften ist variabel. Wichtig in diesem Modell ist, dass sich nicht nur die Tumorzellen an dem Prozess beteiligen, sondern auch Stromazellen rekrutiert werden, die z.B. als Produzenten von Wachstumsfaktoren nötig sind.

Betrachtet man die Mutationsrate normaler Körperzellen von 2×10^{-7} Mutationen pro Gen und Zellteilung und vergleicht sie mit der Unmenge von Mutationen, die in Tumorzellen gefunden werden, kann sie allein nicht für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sein. Um diese Verhältnisse zu erklären, wurde die Mutator-Hypothese erstellt. Diese besagt, dass es früh in der Kanzerogenese zu Mutationen in Genen kommt, die die genomische Stabilität gewährleisten sollen und damit die Mutationsrate ansteigt. Solche Gene kodieren etwa für DNA-Reparaturgene, Polymerasen oder Helicasen. [111]

Auch für das ACC gibt es Hinweise auf eine mehrstufige Entwicklung aus Adenomvorstufen und Ansätze die einzelnen Mutationen in eine Sequenz einzuordnen [16, 97, 168]. Trotzdem bleibt die genaue Kanzerogenese auch in diesem Fall noch ungeklärt. Sollte sie in Zukunft aufgeklärt werden, könnten sich daraus neue Ansätze für Therapien ergeben, die an kritischen Stellen des Weges einer normalen adrenokortikalen Zelle zur malignen Tumorzelle liegen.

2.2.2 Tumormunologie

Tumoren entstehen aus körpereigenen Zellen. Trotzdem können bei Patienten mit Tumoren Antikörper und tumorspezifische Immunzellen gefunden werden, was beweist, dass eine Immunantwort auf Tumorgewebe stattfindet. Dies ist nur möglich durch das Vorhandensein von Antigenen auf oder in Tumorzellen, durch welche das Immunsystem sie von normalen Körperzellen unterscheiden kann.

2.2.2.1 Tumorantigene

Tumorantigene sind Moleküle, deren prozessierte Peptide auf MHC Rezeptoren präsentiert zu einer Immunantwort führen. Diese lassen sich in vier Kategorien unterteilen: Differenzierungsantigene werden normalerweise nur während der Differenzierung des Gewebes exprimiert, aus dem der Tumor stammt. Abnormal exprimierte Antigene, welche normalerweise gar nicht vom Tumorausgangsgewebe expri-

miert werden, wie z.B. onkospermatogonale Antigene von männlichen Keimzellen oder virale Antigene bei virusinduzierten Tumoren, stellen die zweite Gruppe dar. Überexprimierte Antigene, die in Normalgewebe weniger stark exprimiert werden, und als letzte Gruppe tumorspezifische Antigene, welche in Normalgewebe gar nicht gefunden werden und auf mutierte Gene zurückzuführen sind, führen ebenfalls zu einer Immunreaktion. Durch diese von Mutationen herrührenden Veränderungen der zellulären Proteinausstattung werden Tumorzellen von normalen Zellen unterscheidbar. [31]

2.2.2.2 Die Immunantwort auf Tumoren

Bei der Aktivierung des Immunsystems durch Tumorantigene und der ausgelösten Immunantwort sind verschiedenste Zellen und Mediatoren beteiligt. Viele Erkenntnisse über deren Zusammenwirken beruhen auf in vitro- und Tierstudien und sind beim Menschen noch unklar. Trotzdem soll ein Überblick gegeben werden.

Zytotoxische T-Zellen (CTL) spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf Tumoren, indem sie Tumorzellen Perforin-abhängig lysieren. Naive CD8+ T-Lymphozyten werden zu CTL aktiviert, wenn ihnen das Tumorantigen auf MHC-I Molekülen präsentiert wird. Nach der Zwei-Signal-Theorie benötigen sie zur Aktivierung zum einen die Interaktion des T-Zell Rezeptors mit dem Komplex aus MHC Molekül und Antigen und zum zweiten eine Kostimulation, welche auf unterschiedliche Weise entstehen kann, wie z.B. durch Kontakt von CD28 der T-Zelle mit dem B7 Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), meist einer dendritische Zelle (DC). Aus vielen Studien wurde klar, dass diese Aktivierung nur in lymphatischem Gewebe stattfinden kann und ein Antigen, das nie in diese Organe gelangt, immunologisch ignoriert wird. Es kann auf zwei Wegen dorthin kommen. Entweder bringen es metastasierende Tumorzellen selbst oder APC, die es in der Peripherie in Form von toten Tumorzellen entdeckt und prozessiert haben, transportieren es weiter. Diese präsentieren das aufgenommene Antigen auf MHC-I und aktivieren die T-Zellen so indirekt, was auch als Cross-priming bezeichnet wird. Es ist insofern besonders, als dass es dem gängigen Prinzip widerspricht, dass exogene Moleküle von APC auf MHC-II Molekülen präsentiert werden. Die direkte Aktivierung durch Tumorzellen ist oft unmöglich, da die meisten Tumoren keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren. [130]

T-Helferzellen spielen ebenfalls eine Rolle bei der Tumorummunität, indem sie zum einen andere Zellen aktivierend unterstützen, zum anderen eine eigene Zytotoxizität ausüben. Die CD4+ Zellen werden durch Antigen aktiviert, das ihnen auf MHC-II Molekülen von APC präsentiert wird. Man unterscheidet Th1- und Th2-Zellen. Th2 produzieren IL-4 und IL-5. Th1 produzieren IL-2, IL-12 und Interferon- γ (IFN- γ) und sind dadurch für die Tumorbekämpfung besonders geeignet. Durch die IL-2 Produktion unterstützen sie die Proliferation von CTL. T-Helferzellen helfen auch bei der Bildung von CD8+ Gedächtniszellen und können weitere CD4+ Zellen aktivieren. Außerdem fördern sie die Bildung von Antikörpern und locken Entzündungszellen wie Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Granulozyten an. Aufgrund ihrer IFN- γ Produktion werden ihnen ferner folgende Effekte auf Tumorzellen zugerechnet: Zytotoxizität, Induktion einer MHC-I Expression, Beeinflussung der intrazellulären Antigenprozessierung und Inhibition der Angiogenese. Allerdings gibt es auch Hinweise auf gegensätzliche Effekte. Sogenannte Treg-Zellen (T regulatorisch), die sowohl CD4 als auch CD25 exprimieren, können die Ausbreitung von CTL und T-Helferzellen hemmen und wirken immunsuppressiv. [57]

Von B-Zellen produzierte tumorspezifische Antikörper werden bei Krebspatienten gefunden und es gibt effiziente Therapieansätze mit monoklonalen Antikörpern bei Tumoren. Trotzdem bleibt ihre Relevanz bei der antitumoralen Immunabwehr in vivo unklar. Sie üben ihre Wirkung zum einen über die

Blockade von oberflächlichen Signalmolekülen auf malignen Zellen aus und induzieren zum anderen sekundäre Mechanismen. Diese bestehen in der Aktivierung zytotoxischer Zellen oder in der Einleitung komplementabhängiger Zytotoxizität. [130]

Neben dem adaptiven Immunsystem, zu dem die eben beschriebenen T- und B-Zellen gehören, spielt auch die angeborene Immunität eine Rolle bei der Tumorabwehr. Hierzu gehören viele Zytokine und Chemokine, APC, aber auch die NK-Zellen, denen eine entscheidende Rolle bei der sofortigen Tumorantwort zugerechnet wird. NK-Zellen sind Lymphozyten ohne B- oder T-Zell Rezeptor. Sie können auf unterschiedlichste Weise aktiviert werden. Bei der Aktivierung durch Zellkontakte spielen inhibitorische und aktivierende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche eine Rolle. Erstere werden durch Bindung an MHC-I Rezeptoren angeschaltet, d.h. NK-Zellen sind ideal geeignet Tumorzellen anzugreifen, die ihre MHC-I Moleküle herunterreguliert haben. Zweitere werden durch Bindung an Moleküle auf gestressten, transformierten und virusinfizierten Zellen angeschaltet. Weiterhin aktivieren eine Vielzahl von Zytokinen wie Interleukin-2, -12, -15, -18, -21 sowie Interferone NK-Zellen, und antigengebundene Antikörper können eine NK-Zell-abhängige Zytolyse induzieren. Desweiteren kann eine Aktivierung durch DC erfolgen, aber diese können in anderer Richtung auch durch NK-Zellen aktiviert oder getötet werden. Dieses Wechselspiel wird als Crosstalk bezeichnet und kann als Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem gesehen werden. Wenn NK-Zellen aktiv sind, beeinflussen sie Tumorzellen auf folgende Arten: Sie induzieren direkte Apoptose auf zwei Wegen, dem perforin/granzymabhängigen Weg und dem Todesrezeptor-Weg, welcher von der TNF-Familie gesteuert wird. Außerdem aktivieren NK-Zellen über Zytokine und Chemokine B- und T-Lymphozyten. Desweiteren hemmen sie die Angiogenese und wirken antiinflammatorisch und antiviral. [188]

2.2.2.3 Die Beziehung zwischen Tumor und Immunsystem

Wie im vorangehenden Abschnitt demonstriert entsteht ein Tumor nicht unbeeinflusst vom Immunsystem. Die Beziehung zwischen Tumor und Immunsystem ist aber viel komplexer als das, denn das Immunsystem beeinflusst nicht nur den Tumor, sondern der Tumor auch das Immunsystem. Dieser dynamische Prozess wurde von Dunn et al. in drei Phasen unterteilt [44]:

In der ersten Phase der Eliminierung überwacht das Immunsystem den Tumor und schafft es durch die oben dargestellten Mechanismen, Tumorzellen abzutöten. Einige der Zellen können jedoch überleben und es bilden sich Varianten maligner Zellen, die neue Mutationen tragen, welche ihnen Resistenz gegenüber der Immunantwort verleihen. Unter dem Selektionsdruck entstehen also in einer Phase des Gleichgewichts zwischen Tumor und Immunsystem gestärkte Zellen, welche in der dritten Phase die Tumorprogression vorantreiben. Der Tumor wird klinisch apparent, da das Immunsystem der entarteten Zellen nicht mehr Herr wird, welche verschiedene Schlupflöcher gefunden haben, um ihm zu entgehen. Diese bezeichnet man als Escape-Mechanismen.

Die Hypothese von Dunn et al. impliziert also, dass das Immunsystem durch seine Bemühungen das Tumorwachstum einzudämmen die Entwicklung von resistenten Tumorzellen fördert. Im nächsten Schritt heißt das, dass die Immuntherapie des Arztes ebenfalls resistente Tumorzellen induzieren kann.

2.2.2.4 Escape-Mechanismen

Die Tatsache, dass Tumorzellen eine Immunantwort induzieren können, und die gleichzeitige Beobachtung einer Tumorprogression lässt sich durch die Escape-Mechanismen von Tumorzellen erklären. Einer

davon ist die Down-Regulation von MHC-I Molekülen auf ihrer Oberfläche oder die verminderte Antigenexpression, so dass CTL und APC sie nicht mehr erkennen. Allerdings können hier die NK-Zellen immer noch aktiviert werden. Weiterhin werden Tumorzellen gefunden, welche die Expression kostimulatorischer Moleküle, die für die Aktivierung von CTL nötig sind, auf ihrer Oberfläche sowie auf DC vermindern. Einige Tumoren sezernieren zusätzlich immunsuppressive Substanzen wie bestimmte Interleukine oder Adhäsionsmoleküle, welche Zellinteraktionen und Apoptose beeinflussen. Oder sie induzieren immunsuppressive Zellen, wie die oben erwähnten Treg-Zellen. Desweiteren exprimieren sie Proteine, welche dazu führen, dass auf sie reagierende T-Zellen vom Immunsystem als autoreaktiv eingestuft und abgetötet werden. Als T-Zell-Anergie bezeichnet man die Hemmung von T-Zellen ohne deren Zerstörung, welche Tumoren auf verschiedenen Wegen nutzen. Eine weitere Möglichkeit ist die Beeinflussung der Signaltransduktion von Immunzellen. [140]

Auch beim ACC existieren Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass die Tumorzellen Escape-Mechanismen nutzen. Eine Besonderheit von Zellen der Zona reticularis der NNR ist die Expression von MHC-II Molekülen, welche normalerweise hauptsächlich auf APC vorkommen [118]. Dadurch sind sie zur Kommunikation mit Immunzellen fähig. Beim ACC lassen sich diese Moleküle nicht mehr feststellen, Adenome dagegen besitzen die Rezeptoren in der Mehrzahl der Fälle noch [116]. Die nicht vorhandene Expression von MHC-II Molekülen ist mit einer verminderten Apoptose beim ACC verbunden. Die normalerweise vorhandenen MHC-II Moleküle können an den T-Zell Rezeptor auf CD4+ T-Helferzellen binden und ihn aktivieren. Aktivierte T-Zellen können wiederum den Fas Liganden (FasL), ein Zytokin der TNF-Familie exprimieren, der an den Fas Rezeptor (FasR) bindet und Apoptose induziert. FasL (CD95) konnte neben den MHC Molekülen ebenfalls in der Zona reticularis von gesundem adrenokortikalem Gewebe gefunden werden [115], beim ACC jedoch besteht eine Abnahme des FasR bei gleichzeitiger Zunahme von FasL, was auch schon für andere Tumoren gezeigt wurde. Durch Expression tumoreigenen FasL können Tumoren die Immunzellen über deren FasR attackieren und töten. Durch den Verlust des tumoreigenen FasR entgeht der Tumor seinem eigenem und dem fremden FasL [191], was einen weiteren effektiven Escape-Mechanismus darstellt.

Neben den Escape-Mechanismen muss auch davon ausgegangen werden, dass es Tumorzellen gibt, die von Beginn an keine Immunreaktion hervorrufen. Naheliegende Gründe hierfür sind, dass das Tumorantigen nie mit Immunzellen in Kontakt kommt oder es zu schwach bzw. über einen zu kurzen Zeitraum exprimiert wird, um eine Immunantwort zu induzieren. Dies gilt insbesondere für frühe Tumorstadien, in denen es noch zu keiner Metastasierung kommt und wenige Tumorzellen auch nur wenig Antigen als Angriffspunkt bieten [130]. Zusätzlich fehlen vielen Tumorzellen die zusätzlich nötigen kostimulatorischen Moleküle. Stimulation von CTL ohne Kostimulation führt zur T-Zell-Anergie [31].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tumorzellen aufgrund von Antigenexpression die Kapazität haben eine Immunreaktion zu induzieren. Diese fällt jedoch wegen der Ähnlichkeit zu gesundem Gewebe oft sehr schwach aus und wird zusätzlich erschwert durch tumoreigene Escape-Mechanismen, so dass es trotz einer Immunreaktion zur Tumorprogression kommt. Auch für das ACC gibt es Belege für Escape-Mechanismen, die eine suffiziente Immunreaktion verhindern.

2.2.2.5 Immuntherapie von Tumoren

Aus den Erkenntnissen um die Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem erwachsen viele Therapieansätze, die sich der körpereigenen Immunität als Grundlage bedienen. Ziel ist es, den Körper in seiner Abwehr zu unterstützen. Die Immuntherapie ist eine reizvolle Alternative zu bisherigen

Therapieformen, welche auf proliferationsstarke Gewebe abzielen, da sie spezifischer und damit nebenwirkungsärmer ist. Es werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Tumorstoffe zielen auf die aktive Immunisierung des Körpers durch Verabreichung von Tumorstoffen in aufgereinigter Form ab. Eine Möglichkeit ist die Impfung gegen tumorassoziierte Viren wie HBV. Aber auch getötete Tumorzellen oder deren Lysate sowie patienteneigene APC, welche in vitro mit antigenkodierenden Genen transduziert werden und diese auf MHC-I präsentieren, werden verwendet. Ein anderer Ansatz stimuliert das Immunsystem unspezifisch. Dazu wird beispielsweise intratumoral eine Substanz wie BCG injiziert, welche inflammatorisch wirkt und so Immunzellen anlockt. In diese Kategorie gehört auch die Stimulation des adaptiven oder angeborenen Immunsystems durch von außen zugeführte Zytokine. Diese können systemisch verabreicht werden, in vitro in Tumorzellen kloniert und appliziert oder mithilfe von Vektoren in den Körper des Patienten eingebracht werden. Auf diesen Ansatz wird im Folgenden noch näher eingegangen. Ein weiteres großes Feld stellt die passive Immuntherapie dar, welche eine schnelle aber nicht anhaltende Immunität bewirkt. Eine Möglichkeit besteht in der Reinfusion von patienteneigenen Lymphozyten, nachdem diese aus dem Blut oder dem Tumorgebiet gewonnen und in vitro durch Zytokine aktiviert wurden. Spezifischer ist der Ansatz, der mit monoklonalen Antikörpern verfolgt wird, welche gegen Tumorstoffe gerichtet sind. Sie aktivieren entweder die Signalwege, die auch körpereigene Antikörper zur Immunabwehr nutzen, blockieren Signalkaskaden der Tumorzellen oder sind an Toxine gekoppelt, welche so gerichtet in die Tumorzellen gelangen. [1]

Dieser kurze Überblick verdeutlicht, dass Tumorstofftherapie auch unabhängig von den Möglichkeiten der Gentherapie Anwendung findet.

2.3 Die Nebennierenrinde und das Immunsystem

Die Nebenniere spielt als Stressorgan eine wichtige Rolle im Organismus. Es ist inzwischen anerkannt, dass Interaktionen zwischen dem Immunsystem und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse existieren. Die Interaktionen finden auf verschiedenen Ebenen in komplexer Weise statt und sind noch nicht im Detail verstanden. Zum einen kann das Immunsystem die Ausschüttung von CRH und ACTH im Gehirn stimulieren und so zum Anstieg der adrenokortikalen Hormone im Blut führen, zum anderen gibt es lokale Interaktionen in der NNR selbst. Immunzellen, insbesondere Makrophagen, infiltrieren die NNR in großer Zahl und bilden Zytokine und auch die adrenokortikalen Zellen selbst sind Produzenten immunmodulierender Faktoren. Die wichtigsten von Immunzellen und lokalen Zellen produzierten Mediatoren sind IL-1, IL-6 oder TNF- α , aber auch IFN- γ . IL-1 und IL-6 stimulieren die Steroidsynthese, TNF- α und IFN- γ beeinflussen Wachstum und Differenzierung der NNR. Durch β -adrenerge Rezeptoren auf Makrophagen und die immunsuppressive Wirkung von Cortisol werden vegetative sowie hormonelle Impulse weiterhin in dieses System integriert [45]. Es konnte auch gezeigt werden, dass T-Lymphozyten über direkte Zell-Zell-Kontakte die Produktion von Dehydroepiandrosteron in der Zona reticularis stimulieren können [190]. Normalerweise exprimieren die Zellen der Zona reticularis als Zeichen ihrer Differenzierung MHC-II Moleküle auf der Oberfläche [118], was sie zur Kommunikation mit Immunzellen befähigt. Dies ist eine Besonderheit in einem endokrinen Organ, da MHC-II Rezeptoren normalerweise hauptsächlich auf APC vorkommen. MHC-II Moleküle binden an den T-Zell Rezeptor auf CD4+ T-Helferzellen und aktivieren diese. Die starke Verknüpfung zwischen der NNR und dem Immunsystem ist für die Gentherapie des ACC in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen muss bei Eingriffen in das Immunsystem, wie dies durch das Zuführen von Zytokinen von außen in den Orga-

nismus im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes der Fall ist, stets bedacht werden, dass damit eine Homöostase gestört werden kann, die essentiell für das Überleben des Menschen ist. Zum anderen ist die Anwesenheit einer Vielzahl von Effektorzellen des Immunsystems in der NNR eine gute Ausgangslage für einen immuntherapeutischen Ansatz.

2.4 Antitumorale Gentherapie

Gentherapie kann definiert werden als die Behandlung von Krankheiten durch den Einsatz von Methoden, welche auf dem Transfer genetischen Materials in ein Individuum basieren [101]. Diese Therapie zielt auf das Fundament einer Krankheit, ihre genetischen Ursprünge. Daher wurde sie zunächst zur Behandlung von monogenen Erkrankungen eingesetzt, bei denen ein fehlendes oder krankes Gen ersetzt wurde [22]. Die erste klinische Gentherapiestudie, die im Jahre 1990 zugelassen wurde, diente der Behandlung des ADA-SCID, einer autosomal-rezessiv vererbten Immunschwäche mit einem Mangel des Enzyms Adenosindesaminase [23].

Allerdings ist die Entwicklung bis heute eine andere: 66,5% der klinischen Gentherapiestudien sind im Jahre 2007 der Krebsbehandlung gewidmet, nur noch 8,3% den monogenen Erkrankungen [56]. Wie bereits beschrieben resultiert Krebs aus einer Anhäufung von Mutationen in normalen menschlichen Zellen. Das macht Tumoren ein ungleich schwierigeres Ziel für eine genetische Korrektur, da es unmöglich scheint jede Mutation, von denen noch nicht annähernd alle bekannt sind, in jeder Krebszelle zu erreichen. Trotzdem existieren viele Ansätze antitumorale Gentherapie, da sich herausstellt, dass es zahlreiche Wege gibt Tumoren zu bekämpfen, ohne dass jede Mutation in jeder Zelle erreicht wird [153].

Zur erfolgreichen Durchführung eines gentherapeutischen Ansatzes sind zwei Komponenten von besonderer Bedeutung: Ein effektives therapeutisches Konstrukt, das das Wachstum von Krebszellen hemmt oder diese tötet, und ein Vektor, der das Konstrukt an sein Ziel bringt. Beide Komponenten werden im folgenden Abschnitt besprochen. Zuerst wird jeweils ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der Ausführung gegeben und anschließend auf die in dieser Arbeit verwendete Variante näher eingegangen.

2.4.1 Vektoren

Der Gentransfer ist seit langer Zeit ein kritischer Punkt in der Entwicklung gentherapeutischer Strategien. In diesem Abschnitt wird zunächst ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten des Gentransfers gegeben und im Anschluss der in dieser Dissertation verwendete Vektor, das Adenovirus, vorgestellt.

2.4.1.1 Möglichkeiten des Gentransfers

Weltweit werden im Jahr 2007 24,7% der klinischen Gentherapiestudien mit Adenoviren als Vektoren durchgeführt, 22,4% mit Retroviren, 18% mit Plasmiden bzw. nackter DNA und 7,6% mit Lipofektion [56]. Andere Verfahren sind seltener. Generell werden virale von nicht-viralen Vektoren unterschieden (s. Tabelle 2.2).

Retroviren integrieren ihr Genom stabil in das der Wirtszelle, was in einer dauerhaften Expression viraler Gene resultiert. Dies ist wünschenswert bei der Therapie monogener Erkrankungen und bei verschiedenen Ansätzen der Krebsgentherapie. Es birgt jedoch die Gefahr der Mutagenese sowie der

Viral	Nicht viral
Adenoviren	DNA
Retroviren	Plasmide
AAV	Cosmide
Pockenviren	Bakteriophagen
Vacciniaviren	artifizielle Chromosomen
HSV	Oligonukleotide
	Tripelhelix
	antisense-RNA/Ribozyme
	Transkriptionsfaktoren
	siRNA
	Bakterien

Tabelle 2.2: Möglichkeiten des Gentransfers

homologen Rekombination mit Sequenzen humaner endogener Retroviren, welche von entwicklungs- geschichtlich früheren Infektionen stammen und etwa 1% des menschlichen Genoms ausmachen. Es kann theoretisch zur Bildung neuer replikationskompetenter Retroviren oder zur Aktivierung ruhender Sequenzen kommen [150]. Bei Retroviren ist die Expression des Transgens vergleichsweise hoch. Sie infizieren eine Vielzahl von Geweben, sind jedoch limitiert auf sich teilende Zellen. Dies stellt ein Problem für hochspezialisierte Gewebe wie z.B. Neuronen dar, ist aber ein Vorteil in der antitumoralen Therapie, da neoplastische Zellen ein vorrangiges Ziel sind. Die erreichbaren Virustiter liegen im Bereich von 10^6 - 10^7 pfu/ml und damit deutlich unter denen von Adenoviren und die Vektorkapazität bei 10 kb. Durch das Fehlen immunogener viraler Proteine bleibt eine Immunantwort des Wirts auf Retroviren aus, sie werden jedoch rasch durch Komplementaktivierung angegriffen. Aus der Familie der Retroviridae finden zur Zeit zusätzlich die Lentiviren als Vektoren Beachtung, da diese auch ruhende Zellen infizieren [151].

Adenoviren integrieren ihre DNA nicht in das Wirtsgenom, so dass die Expression der Gene zeitlich begrenzt und meistens nur für einige Wochen nachweisbar ist. Das birgt Nachteile bei der dauerhaften Korrektur von Mutationen, ist in der Immuntherapie von Tumoren aber durchaus erwünscht und vorteilhaft hinsichtlich des mutagenen Potentials. Die Transgenexpression ist sehr hoch. Es werden sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen verschiedenster Gewebe infiziert, was eine geringere Spezifität für neoplastische Zellen bedeutet. Ein enormer Vorteil ist die Erreichbarkeit hoher Titer bei der Virusamplifikation im Bereich von bis zu 10^{12} pfu/ml. DNA-Insertionen von 7-8 kb sind möglich, aber durch Deletionen weiter Teile des Virusgenoms kann eine noch größere Vektorkapazität erreicht werden. Für die fehlenden Langzeitexpression ist die hohe Immunogenität von Adenoviren von Bedeutung. [151]

Nicht-virale Vektoren umfassen alle Gentransfermethoden, die nicht die Produktion eines viralen Partikels beinhalten. Vorteile dieser Vektoren sind ihre einfache Herstellung sowie die Tatsache, dass sie für Menschen nicht infektiös sind, Nachteile dagegen ihre Instabilität und die transiente Expression in vivo sowie ihre schwierige Penetration in Zielzellen. Man kann sie unterteilen in DNA Moleküle, welche in vitro in Bakterien oder eukaryotischen Zellen vermehrt werden und für ein therapeutisches Protein kodieren, und Oligonukleotide, welche chemisch hergestellt werden und die Expression zelleigener Gene verändern. Die am häufigsten verwendeten DNA Moleküle sind Plasmide (doppelsträngige zirkuläre DNA von Bakterien), es kommen aber auch Bakteriophagen (doppelsträngige lineare DNA von bakterientransfizierenden Viren), Cosmide (große Plasmide mit Phagensequenzen) und artifizielle Chromosomen (Teile normaler Chromosomen kombiniert mit zusätzlichen Sequenzen) zum Einsatz. Diese Moleküle können ex vivo, also nach Entnahme von autologen Zellen, durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation (Endozy-

tose kopräzipitierter DNA), Elektroporation (Permeabilitätssteigerung durch elektrischen Impuls) oder Lipofektion (elektrostatische Koppelung an Liposomen) in Zellen eingeschleust werden. Für den in vivo Transfer werden Liposomen, DNA-Protein-Komplexe, z.B. mit inaktivierten Virusbestandteilen, oder die "Gene Gun" verwendet, bei der mit DNA beschichtete Goldpartikel mit hoher Geschwindigkeit auf Zellen geschossen werden. Die Oligonukleotide dagegen verändern die Genexpression durch Bildung einer Tripelhelix, was die Bindung von Transkriptionsfaktoren stört, in Form von antisense-RNA, die durch Bindung an homologe prä-mRNA die weitere Prozessierung hemmt, oder als Ribozyme, welche als antisense-RNA mit katalytischer Aktivität gebundene DNA spalten, sowie durch direkte Wirkung als Transkriptionsfaktor [139]. Die kurze siRNA kann im Zytoplasma einen RNA-induced-silencing-complex aktivieren, der im Zellkern die zur siRNA komplementäre mRNA inaktiviert. In vivo gelangt sie nackt durch rezeptorvermittelte Endozytose oder als Liposomen in ihre Zielzellen. Bakterien finden ebenfalls Verwendung als nicht-virale Vektoren im Gentransfer [64].

2.4.1.2 Das Adenovirus als Vektor

Adenoviren wurden erstmals im Jahre 1953 auf der Suche nach Verursachern respiratorischer Erkrankungen in Kulturen adenoiden Gewebes entdeckt, nach welchem sie 1956 auch benannt wurden. Die Familie der Adenoviridae wird in Aviaadenoviren (Vorkommen bei Vögeln) und Mastadenoviren (Vorkommen bei Säugern) eingeteilt. Zu letzteren gehören die etwa 50 bekannten humanpathogenen Arten, welche entsprechend ihrer Hämagglutinationseigenschaften von A-F subgruppiert werden. Der in dieser Arbeit eingesetzte Serotyp 5 gehört zur Subgruppe C und hat nur geringes bis gar kein onkogenes Potential [166]. Adenoviren sind endemisch und verursachen hauptsächlich Erkrankungen des Respirationstraktes, des Gastrointestinalums und der Konjunktiven, seltener der Leber und der Harnblase. Viele Infektionen verlaufen asymptomatisch, wobei Immunsupprimierte häufiger und schwerer von klinisch apparenten Symptomatikern betroffen sind. Latent persistierende Infektionen kommen vor [82].

Adenoviren sind ikosaedrische Partikel eines Durchmessers zwischen 70 und 100 nm. Sie bestehen aus dem Capsid, das die Hülle des Virus bildet, und dem Core. Zwölf Pentone, welche aus einer Pentonbasis und einem Fiberprotein bestehen, liegen an den Ecken des Capsids. Die 20 Seitenflächen werden von je zwölf Hexonen aufgebaut, so dass ein Viruspartikel aus insgesamt 252 Capsomeren (Pentonen, Hexonen) besteht. Im Virus-Core findet sich die Virus-DNA und assoziierte Proteine, welche Histon-ähnliche Funktionen erfüllen und eine Brücke zum Capsid bilden. Das terminale Protein sitzt den beiden DNA-Enden auf. Es dient als Primer und kann eine Zirkularisierung der DNA induzieren. An den beiden Genomenden finden sich invertierte terminale Repeatsequenzen (ITR), welche für die Initiation der Replikation wichtig sind. Die DNA der Adenoviren ist doppelsträngig und linear. Die Größe des Genoms liegt zwischen 30 und 40 kb. [166]

Das Virus bindet über das Fiberprotein an einen spezifischen Rezeptor seiner Zielzelle, genannt CAR (Cocksackie/Adenovirus Rezeptor) [15]. Durch Endozytose mithilfe der α -Integrine gelangt der Partikel ins Zytoplasma und die Aufnahme durch die Kernporen, bei der das Capsid zurückbleibt, erfolgt Mikrotubuli-vermittelt. Im Nukleus findet die Transkription statt, welche in unterschiedliche Einheiten gegliedert wird. In strenger Reihenfolge werden frühe (E1 bis E4), verzögerte frühe (IX und IVa2) sowie späte Gene (L1 bis L5) durch wirtseigene RNA-Polymerasen transkribiert. Die vor der Replikation abgelesenen frühen Gene haben regulatorische Funktionen. E1-Gene unterteilt man in E1A und E1B. E1A-Proteine aktivieren die Transkription weiterer viraler Gene und stimulieren das Zellwachstum. E1B-Proteine verhindern in Interaktion mit p53 eine Apoptoseinduktion durch E1A und fördern den Transport

viraler mRNA aus dem Kern [156]. Die Proteine der E2-Region sind essentiell für die Replikation der Virus-DNA und umfassen einen Vorläufer des terminalen Proteins, die virale DNA-Polymerase und ein DNA-bindendes Protein [81]. Mithilfe der E3-Proteine entkommt das Virus den wirtseigenen Abwehrstrategien, sie sind für die eigentliche Infektion jedoch nicht notwendig. Eines hemmt den Transport von MHC-I Molekülen zur Zelloberfläche und damit die Präsentation viraler Antigene, ein anderes verhindert die Apoptose und das adenovirus death protein ist für die späte Zelllyse mit Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich. Die E4-Transkriptionseinheit kodiert für mehrere Proteine, von denen eines zusammen mit E1B den Transport der späten mRNA fördert. Weitere sind wichtig für die DNA-Replikation, die Hemmung der wirtseigenen Proteinsynthese und dem Schutz der Virus-DNA vor Abbau sowie der Wirtszelle vor CTL-vermittelter Lyse [156]. Ist die Transkription der frühen Gene abgeschlossen, beginnt die semikonservative Replikation der Virus-DNA durch die viruseigene DNA-Polymerase an beiden ITR [81]. In dieser Zeit werden auch die verzögerten frühen Gene transkribiert, welche den Promotor für die späten Gene aktivieren. Letztere werden nach der Replikation abgelesen und kodieren für virale Strukturproteine, die sich aus einer langen Vorläufer-mRNA ableiten [156]. Auch die VA RNA, die nicht translatiert wird und wirtseigene Abwehrmechanismen unterdrückt, wird nun abgelesen [81, 156]. Anschließend kann die Morphogenese beginnen, neue Viruspartikel formen sich innerhalb des Zellkerns. Dafür ist die Packaging Sequenz (PS) unerlässlich, die nahe der viralen ITR kodiert wird. Zirka 40 Stunden nach Infektion werden etwa 10^4 Viruspartikel pro Wirtszelle freigesetzt, wobei diese als Folge untergeht [81].

Trotz vieler viraler Abwehrmechanismen schafft der immunkompetente Mensch es in den meisten Fällen, die Infektion durch ein Adenovirus erfolgreich zu bekämpfen. Eine schnell einsetzende unspezifische Immunantwort wird durch Capsidproteine induziert und führt zur Aktivierung von Immunzellen mit Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, so dass innerhalb von 24 Stunden 80% der Adenoviren abgetötet werden. Die spätere adaptive Immunantwort gegen Genprodukte oder Capsidbestandteile führt zur Zytolyse virustransduzierter Zellen durch CTL oder durch von aktivierten B-Zellen produzierte Antikörper. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses kann wiederholte Applikationen eines adenoviralen Vektors vereiteln. Aufgrund des endemischen Vorkommens adenoviraler Infektionen besitzt ein hoher Prozentsatz an Patienten bereits Antikörper, die eine Immunantwort beschleunigen. Bei der Ausprägung der Immunantwort gegen adenovirale Vektoren spielen der Applikationsweg, die Dosis sowie patientengebundene Faktoren eine Rolle. Bei der Verwendung von Adenoviren als Vektoren für eine Zytokingentherapie, wie in dieser Dissertation, ist die Aktivierung des Immunsystems sogar ein erwünschter Effekt, so lange trotzdem eine ausreichende Virusmenge die Zielzellen erreicht, bevor sie neutralisiert wird [18].

Aufgrund der bereits in Abschnitt 2.4.1.1 beschriebenen Eigenschaften von Adenoviren werden diese häufig als Gentherapievektoren eingesetzt. Um die Virusreplikation und damit die Zerstörung der Wirtszellen *in vivo* zu unterbinden sowie Platz für therapeutische Konstrukte zu schaffen, wurden in den adenoviralen Vektoren der ersten Generation die Gene der E1- und eventuell zusätzlich der E3-Region deletiert. So können bis zu 8 kb exogener DNA in das Virusgenom eingebaut werden. Diese replikationsdefizienten Viren können in der 293-Zelllinie propagiert werden, welche die E1-Gene *in trans* zur Verfügung stellt (siehe Abschnitt 3.2.1). Durch das Fehlen der E3-Proteine kommt es jedoch zu einer erheblichen Abwehrreaktion des Wirts, die insbesondere eine Langzeitexpression von Transgenen verhindert. Eine Möglichkeit dieses Problem abzumildern ist die Deletion weiterer Virusgene, was zur Entwicklung der zweiten Generation von Adenoviren mit fehlenden E2- und E4-Regionen sowie zur

dritten Generation mit nahezu kompletter Deletion des Virusgenoms führte. Die Immunantwort, wenn auch abgeschwächt, war jedoch weiterhin vorhanden und Drittgenerationsvektoren bergen das zusätzliche Problem, dass sie zur Propagierung Helferviren benötigen, die die viralen Gene in trans zur Verfügung stellen [81]. Aufgrund der weitreichenden Erfahrungen mit den Vektoren der ersten Generation und der Tatsache, dass die in dieser Dissertation verwendeten Viren des 3r-Systems im Rahmen der Zytokingentherapie nur auf eine transiente Transgenexpression angewiesen sind, wurden in unserem Labor E1/E3-deletierte Adenoviren als Vektoren für das therapeutische Konstrukt gewählt.

2.4.2 Genterapeutische Konzepte

Zunächst wird im folgenden Abschnitt ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der antitumoralen Genterapie gegeben und anschließend der in dieser Dissertation verfolgte Ansatz beschrieben.

2.4.2.1 Möglichkeiten der antitumoralen Genterapie

Ausgehend von den Wechselwirkungen zwischen Tumoren und ihrer Umgebung kann man genterapeutische Ansätze zur Krebstherapie in Strategien unterteilen, die sich gegen die Tumorzellen selbst richten, und Strategien, welche in der Umgebung des Tumors ansetzen [64].

Zu den gegen Tumorzellen selbst gerichteten Strategien gehören die Korrektur von Schlüsselgenen der Tumorentstehung, den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die direkte Apoptoseinduktion, der Einsatz onkolytischer Viren sowie die Suizidgenterapie. Die mRNA von Onkogenen, wie z.B. dem K-ras, kann durch antisense-Sequenzen gebunden werden, was deren weitere Prozessierung verhindert. Entsprechende Tierstudien mit unterschiedlichen Vektoren existieren seit längerem [121, 199]. Das Tumorsuppressorgen p53, das in vielen Tumoren inaktiviert ist, kann genterapeutisch in Tumorzellen eingebracht werden, wo seine Expression das Tumorstadium beeinflusst. Hierzu gibt es bereits klinische Studien [36, 72]. Genterapeutisch kann in Krebszellen der Zelltod herbeigeführt werden, z.B. durch verstärkte Expression des Fas Liganden (FasL), der nach Bindung an seinen Rezeptor zur Apoptose führt. In adenoviral transduzierten Zellkulturen, die daraufhin FasL exprimierten, konnte dies gezeigt werden [200]. Desweiteren gibt es onkolytische Viren, die sich nur in Tumorzellen teilen können und diese dabei abtöten, welche bereits Eingang in klinische Studien gefunden haben [141, 148]. Eine andere gängige Strategie gegen Tumorzellen ist die Suizidgenterapie. Dabei wird in Tumorzellen ein Gen für ein Enzym eingebracht, das eine normalerweise nicht-toxische Substanz in einen toxischen Metaboliten umwandelt, der die enzymproduzierenden Zellen schädigt. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist die Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV-TK), welche Ganciclovir in das toxische Ganciclovir-Triphosphat spaltet. Dieses Konzept wird in klinischen Studien erprobt [58, 102].

Zu den Strategien, die in der Umgebung eines Tumors ansetzen, gehören die Angiogenesehemmung, das Einbringen von Drug Resistance Genen und die Immunogenterapie. Zur Angiogenesehemmung können beispielsweise die Gene für Angiogeneseinhibitoren wie Angiostatin oder Endostatin in Tumorzellen eingebracht werden, wie bereits in vitro und in Tierstudien geschehen [95, 108], oder die Sekretion von VEGF (vascular endothelial growth factor) durch siRNA blockiert werden [127]. Drug Resistance Gene wie das MDR1, die von einigen Tumorzellen genutzt werden um den Effekten zytotoxischer Medikamente zu entgehen, können in Stammzellen des Knochenmarks kloniert werden und dieses teilungsaktive Gewebe während einer Chemotherapie schützen, so dass Dosen eingesetzt werden können, die normalerweise nicht toleriert würden. Zu diesem Ansatz gab es bereits klinische Stu-

dien [2, 78]. Ebenfalls zur Gruppe der antitumoralen Therapieansätze, welche in der Umgebung einer Neoplasie ansetzen, gehört die Immunogenherapie. Die Prinzipien der Immuntherapie wurden bereits in Abschnitt 2.2.2.5 erläutert und gelten auch im Bereich der Gentherapie. Immunsuppressive Faktoren, die von Tumoren als Escape-Mechanismus produziert werden, können gentherapeutisch blockiert werden. Ein Beispiel ist das immunsuppressiv und proliferationsfördernd wirkende TGF- β , dessen Expression etwa durch antisense-Sequenzen gehemmt werden kann [48]. Eine weitere Möglichkeit bietet die DNA-Vakzinierung mit Genen, welche für Tumorantigene oder kostimulatorische Moleküle kodieren, so z.B. bereits erprobt mit dem MUC-1 Antigen, das nach i.m. Gabe eines kodierenden Vektors eine Immunantwort hervorrief [137], oder dem Kostimulanz HLA-B7 in Form eines intratumoral applizierten Virus, das Tumorregression und Immunstimulation bewirkte [92]. Ein weit verbreiteter Ansatz ist die Zytokingentherapie, die auch in dieser Dissertation angewendet wird. Dabei werden die Gene für antitumoral wirkende Zytokine in die Tumorzellen selbst, in Immunzellen oder andere Körperzellen wie Fibroblasten eingebracht. Hierzu existieren bereits zahlreiche klinische Studien mit Zytokinen wie IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ oder TNF- α [183, 8, 91, 159, 94, 117].

2.4.2.2 Zytokingentherapie mit Interleukin-12

IL-12 erhielt im Jahre 1991 seinen Namen [71], als deutlich wurde, dass der CTL Maturation Factor, welcher gemeinsam mit IL-2 eine Induktion von CTL bewirkte [54, 192], und der Natural Killer Cell Stimulatory Factor, welcher aus Überständen von B-Zellen isoliert wurde, durch die NK-Zellen stimuliert werden konnten [99], ein und die selbe Substanz sind.

Das biologisch aktive IL-12 (p70) ist ein Heterodimer aus einer 35 kDa leichten (p35) und einer 40 kDa schweren Kette (p40) [99]. Sie werden beim Menschen von zwei unabhängigen Genen auf den Chromosomen 3 und 5 kodiert, bei der Maus auf den Chromosomen 6 und 11. Die p35-Untereinheit wird ubiquitär exprimiert, aber nur kovalent gebunden an p40 sezerniert, welches nur in Zellen vorkommt, die auch p70 bilden. IL-12 formt zusammen mit IL-23 und IL-27 eine Familie heterodimerer Zytokine, die sich funktionell und strukturell ähneln [182]. Die Homologie zwischen murinem und humanem IL-12 beträgt 70% für p40 und 60% für p35 [161]. Der IL-12 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten. Wenn IL-12 bindet, werden Janus Kinasen (JAK) durch Transphosphorylierung aktiviert und phosphorylieren Tyrosine an der intrazellulären Domäne des Rezeptors, an welche nun STAT (signal transducer and activator of transcription) binden, die ebenso von JAK phosphoryliert werden. STAT beeinflussen im Zellkern die Genexpression. IL-12 Effekte werden in ihrer Mehrzahl durch STAT4 vermittelt [90].

IL-12 wird hauptsächlich von Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, Neutrophile) und APC, insbesondere den DC, aber auch von B-Zellen produziert. Die Zellen werden durch Mikroorganismen und deren Produkte, durch direkte Interaktion mit CD40 auf aktivierten T-Zellen sowie durch IL-4, IL-13 und IFN- γ stimuliert [182]. Auch IL-12 selbst bildet einen positiven Feedbackmechanismus über einen speziellen Rezeptor auf DC [69]. Eine Hemmung der IL-12 Ausschüttung wird durch IL-10, das durch IL-12 selbst induziert wird, im Sinne eines negativen Feedbacks ausgeübt, weiterhin durch TGF- β , IFN- α/β , TNF und viele Mediatoren, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, wie z.B. Histamin oder PGE₂ [182]. Elenkov et al. zeigten, dass auch Katecholamine und Glukokortikoide dosisabhängig die IL-12 Ausschüttung hemmen und das zentrale Nervensystems über die Hypothalamus-Hypophysen-NNR-Achse auf diese Weise Einfluss auf die periphere zytokinvermittelte Stressreaktion nimmt [47].

IL-12 erfüllt eine Vielzahl biologischer Funktionen (s. Abbildung 2.1). Es fördert die Proliferation und Zytotoxizität von NK- sowie T-Zellen. Diese müssen jedoch voraktiviert sein, z.B. durch Antigenak-

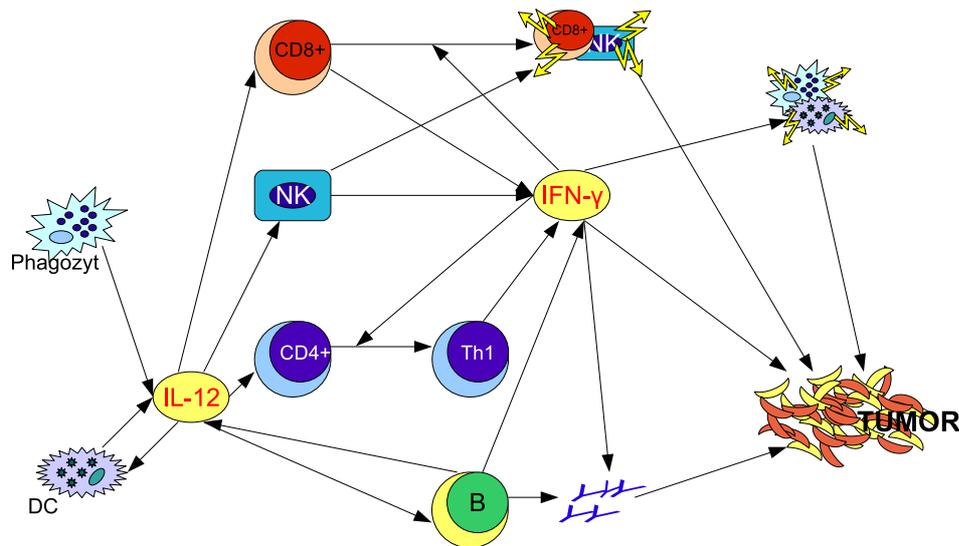


Abbildung 2.1: Direkte und Interferon- γ vermittelte antitumorale Effekte von Interleukin-12

tivierung von Tumorzellen. Es bewirkt die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-, T- sowie B-Zellen [182]. Ferner wird auch die Freisetzung von TNF- α [125] sowie von IL-8 und GM-CSF [126] durch NK-Zellen induziert. IL-12 ist ein wichtiger Faktor bei der Differenzierung und Aufrechterhaltung von CD4+ T-Lymphozyten zu Th1-Zellen, welche starke Produzenten von IFN- γ sind. Das zeigt seine Funktion bei der Vernetzung von angeborener und erworbener Immunantwort [182], aber auch die Endstrecke der Einflussnahme des neuroendokrinen Systems auf das Immunsystem im Rahmen von Stress [47]. IL-12 führt direkt oder über eine erhöhte IFN- γ Produktion von Th1-Zellen zu einer Stimulation von B-Zellen mit gesteigerter Bildung von IgG2-Antikörpern, welche komplementaktivierend wirken. Auf hämatopoietische Vorläuferzellen übt es eine proliferationssteigernde und differenzierende Wirkung aus [182].

Brunda et al. konnten zeigen, dass rekombinantes IL-12 allein in der Zellkultur das Wachstum von Tumorzellen nicht hemmen kann. Um die maximale antitumorale Aktivität zu erreichen, ist IFN- γ notwendig, dessen stärkster Induktor IL-12 ist. Viele - aber nicht alle - antitumoralen Effekte des IL-12 werden durch IFN- γ vermittelt [27]. IFN- γ zeigt folgende immunmodulierenden und antitumoralen Effekte: Es aktiviert Makrophagen und andere APC, die dann effektiv gegen antigenträgende Zellen vorgehen. Es steigert die Expression von MHC-I und -II Molekülen und damit die Fähigkeit von APC und anderen Körperzellen zur Antigenpräsentation. Weiterhin fördert es die Differenzierung zu Th1-Zellen und führt in B-Zellen zur IgG2 Ausschüttung. Es steigert die Zytotoxizität von CTL und stimuliert als positives Feedback die IL-12 Produktion von APC [20]. Desweiteren übt IFN- γ unspezifische antitumorale Effekte aus: Es hemmt die intratumorale Neovaskularisation durch Freisetzung des Angiogenesehemmers IP-10 [165], inhibiert das Tumorwachstum durch Induktion der NO Produktion von Makrophagen [197] und hat zusätzlich einen direkten antiproliferativen Effekt auf Tumorgewebe [188].

Daten aus Tierstudien beweisen die antitumorale Potenz von IL-12 und auch in klinischen Krebsgentherapiestudien wurde das Zytokin bereits erfolgreich eingesetzt. In Tierexperimenten konnte die intraperitoneale (i.p.) Gabe von rekombinantem IL-12 die Entstehung von Mammakarzinomen und Sarkomen hemmen [25, 128] sowie eine lokale oder i.p. Gabe von IL-12 die Regression verschiedener etablierter Tumoren und Metastasen herbeiführen, bzw. sogar eine antitumorale Immunität hervorrufen [28, 33]. In klinischen Studien am Menschen wurde jedoch der toxische Effekt systemisch applizierten IL-12 zum limitierenden Faktor. Häufige Nebenwirkungen sind dort Leukopenie, grippeartige Symptome, gastroin-

testinale Nebenwirkungen und Funktionsstörungen der Leber. In Tierstudien sind Pathologien an Lunge, lymphatischen Organen und Knochenmark zusätzlich häufig [30]. In einer Phase-II-Studie mit IL-12 traten schwere Nebenwirkungen auf, die zu zwei Todesfällen führten. Im Gegensatz zur Phase-I-Studie war das Applikationsschema verändert worden. Es stellte sich anhand von Tierexperimenten heraus, dass eine einmalige Gabe von IL-12 zwei Wochen vor Beginn der Studie die Toxizität senkt, indem der Anstieg von IFN- γ abgemildert wird. IFN- γ wurde für die systemische Toxizität von IL-12 verantwortlich gemacht [106]. Anschließend bewies ein murines Modell, dass durch die vorherige einmalige Gabe von IL-12 die IFN- γ Level und damit die Toxizität gesenkt und höhere Dosen an IL-12 toleriert werden, diese jedoch keinen zusätzlichen therapeutischen Effekt haben, ja sogar die Zeit bis zum Erscheinen von Tumoren verkürzt wird [41]. Weitere Studien mit systemischer Applikation bei Nierenzellkarzinom bzw. Melanom [62] und Ovarialkarzinom [87] verliefen zwar mit weniger Nebenwirkungen aber enttäuschenden Ansprechraten. Auch subkutane Injektionen bei Nierenzellkarzinom mit nur 7% Ansprechraten [122] und kutanem T-Zell-Lymphom (nicht intraläsional) mit 56% Ansprechraten [152] wurden durchgeführt.

Aufgrund der systemischen Toxizität von IL-12 wurden viele Versuche mit intra- oder peritumorale Injektionen unternommen. Dabei wurde zum Beispiel das rekombinante Zytokin direkt injiziert, was jedoch ebenfalls mit starker Toxizität einherging [77]. Hier schienen die Möglichkeiten der Gentherapie geeignet, das toxische IL-12 intratumoral zu platzieren und extratumorale Nebenwirkungen zu minimieren. Zum einen existieren präklinische und klinische Studien mit autologen Tumorzellen [176, 178] oder Fibroblasten [91, 177], welche ex vivo mit den IL-12 Genen transduziert und anschließend intratumoral appliziert werden, was einen Rückgang von Tumoren bewirken konnte, aber durch die nötige Gewinnung der autologen Zellen und ex vivo Transduktion einen hohen Aufwand darstellt. Daher sind Techniken eines Gentransfers in vivo durch geeignete Vektoren attraktiver. Es wurden IL-12 exprimierende Plasmide [76] eingesetzt, aber die Effektivität dieser Therapie blieb in der Klinik begrenzt. Auch verschiedene IL-12 exprimierende Viren wurden in Studien erforscht: Imagawa et al. erreichten durch ein IL-12 exprimierendes Retrovirus einen Rückgang von murinen Plattenepithelkarzinomen sowie einen Rückgang der Tumordurchblutung und eine Vermehrung von T- und NK-Zellen im Tumorgebiet [88], Ren et al. berichteten über eine klinische Studie mit einem intratumoral applizierten Semliki Forest Virus bei Glioblastom [149] und auch Adenoviren werden aufgrund ihrer oben erwähnten Vorteile, z.B. der hohen Transgenexpression, gern für Tumorthapien eingesetzt. Für die Effektivität eines Therapieansatzes spielt die lokal verfügbare Dosis an IL-12 eine wichtige Rolle, höhere Dosen sind generell gesprochen effektiver [28, 37, 169]. Trotzdem sollte die eingesetzte Dosis bei maximal möglicher Effektivität möglichst wenige toxische Nebenwirkungen zeigen. Caruso et al. konnten mit einem IL-12 exprimierenden Adenovirus murine hepatische Kolonkarzinommetastasen intratumoral behandeln und einen Tumorrückgang sowie eine Verlängerung der Lebenszeit erreichen [32], Bramson et al. konnten mit ihrem Adenovirus bei murinem Brustkrebs gleiches zeigen [26], Gambotto et al. setzten ihr Adenovirus erfolgreich beim murinen Fibrosarkom und Adenokarzinom ein und konnten eine Tumormunität erzielen [53], Barajas et al. konnten eine dosisabhängige Tumorreduktion beim HCC der Ratte erreichen [9] und Sangro et al. führten eine Phase-I-Studie bei 21 Patienten mit fortgeschrittenen GI-Tumoren durch, die intratumorale Injektionen eines Adenovirus erhielten. Die Sicherheit und Durchführbarkeit des Ansatzes wurde zwar untermauert, es konnten jedoch nur geringe antitumorale Effekte observiert werden. Die Autoren führten dies auf eine schlechte Transduktionseffizienz ihres Vektors und eine zu kurze Transgenexpression durch den CMV-Promotor zurück [159].

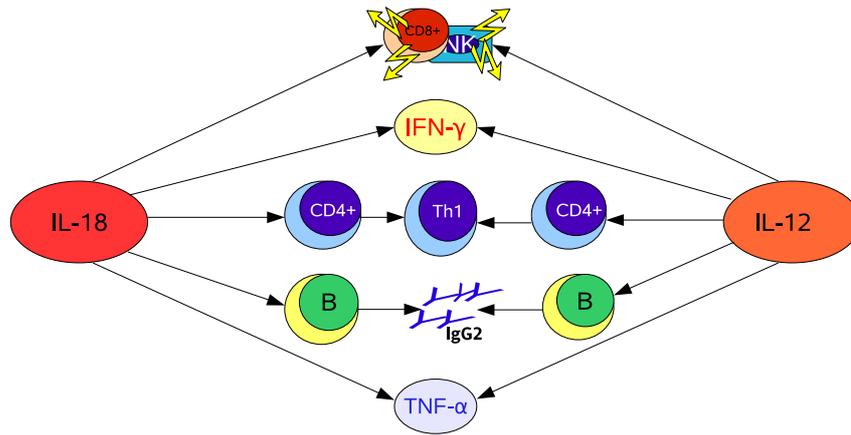


Abbildung 2.2: Gemeinsame Effekte von Interleukin-18 und Interleukin-12

All diese Studien zeigen, dass eine antitumorale Immunogenetherapie mit IL-12 ein vielversprechendes Konzept ist, aber die mangelnde lokale Ansprechrate ein Problem darstellt. Daher war auch ein wichtiges Ziel bei der Konstruktion der in dieser Dissertation verwendeten Viren des 3r-Systems, eine möglichst hohe lokale Zytokindosis durch einen effektiven Vektor zu erreichen.

2.4.2.3 Zytokingentherapie mit Interleukin-18

Viele seiner Effekte übt IL-12 in Synergie mit anderen Botenstoffen aus. Ein wichtiges Mitglied dieser Gruppe ist das IL-18, andere Synergismen bestehen z.B. mit IL-2, CD28 oder CD3 [182]. IL-18 wurde 1995 als IFN- γ induzierender Faktor aus Leberlysaten von Mäusen isoliert, die mit Lipopolysacchariden und *Propionibacterium acnes* stimuliert worden waren [131]. Es besitzt große Ähnlichkeit zu IL-1 [14]. Das murine IL-18 ist ein 157 AS langes reifes Protein mit einem 192 AS langen Vorläufer [132], dessen Gen auf Chromosom 9 liegt [154]. Das Gen für die humane Variante liegt dagegen auf Chromosom 11 [129] und kodiert für einen 193 AS langen Vorläufer mit 65% Homologie zum murinen [186]. Das Vorläuferprotein pro-IL-18 besitzt keine Signalsequenz und kann erst aus der Zelle ausgeschleust werden, wenn es durch die Caspase-1 in seine bioaktive Form gespalten worden ist [59, 70]. IL-18 wird von einer Vielzahl von Geweben produziert, darunter Kupffer-Zellen, Makrophagen [132] und dendritische Zellen [171] des Immunsystems, aber auch Keratinozyten [172], Osteoblasten [185], intestinalen Mucosazellen [142], Fibroblasten [67] und Mikroglia [143]. Auch die Zona fasciculata und reticularis der NNR produzieren IL-18 im Rahmen einer Stressreaktion [38]. Die Bildung von pro-IL-18 wird durch ACTH gesteigert und die Caspase-1 der NNR wird durch Superoxid-Anionen bei Stress aktiviert, um reifes IL-18 zu exportieren [163]. Der IL-18 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, einer IL-18 bindenden Kette (IL-18R α) und dem akzessorischen proteinähnlichen Molekül (IL-18R β). IL-18 bindet an IL-18R α , woraufhin IL-18R β rekrutiert wird. Die Signalkaskade verläuft über verschiedene Phosphorylierungsschritte durch MyD88 und IRAK, an deren Ende die Freisetzung von p50 und p65 aus dem NF- κ B steht, welche im Zellkern die Transkription beeinflussen [164].

Sowohl IL-18 als auch IL-12 induzieren unabhängig voneinander die IFN- γ Produktion durch T-, B- und NK-Zellen, jedes für sich jedoch nur in geringen Mengen. IL-18 aktiviert den IFN- γ Promotor von CD4+ T-Zellen direkt durch AP-1. IL-12 aktiviert dagegen STAT4, was allein nicht zur Stimulation ausreicht, sondern Kostimulantien wie anti-CD3 oder anti-CD28 erfordert, die ebenfalls zu einer Bindung von AP-1 an den Promotor führen. AP-1 ist also für die IFN- γ Produktion unerlässlich [10]. IL-18 allein

bewirkt trotzdem nur eine geringe IFN- γ Ausschüttung, da IL-12 gebraucht wird, um den IL-18 Rezeptor auf T- und B-Zellen zu induzieren [179, 196]. Andersherum ist auch IL-12 in der Lage, die vermehrte Expression des IL-18 Rezeptors auf T-Zellen zu fördern [195]. IL-12 und IL-18 sind gemeinsam also starke Induktoren von IFN- γ . Sie üben trotz mangelnder struktureller Verwandtschaft viele Funktionen in Synergie aus. Neben der IFN- γ Induktion stimuliert IL-18 wie IL-12 eigenständig die Zytotoxizität von NK-Zellen und die Proliferation von aktivierten T-Zellen. Weiterhin fördert es die Ausschüttung von TNF durch T- und NK-Zellen, die Ausschüttung von IL-1, die Expression des Fas-Liganden auf diesen Zellen, welcher eine Rolle bei der Apoptose spielt, sowie die Sekretion von GM-CSF [42, 132, 186]. Ferner bewirkt IL-18 durch die IFN- γ Induktion eine Änderung des Antikörperprofils von B-Zellen, es kann aber sowohl Richtung Th1 als auch Th2 Profil führen. Zudem gibt es Hinweise, dass IL-18 als Kofaktor für die Entwicklung von Th2-Zellen dienen kann, was im Kontrast zur Th1 Zugehörigkeit von IL-12 und IFN- γ steht [83]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass IL-18 eine Rolle als potenter Stimulator des Immunsystems zugesprochen werden kann, obwohl viele seiner Funktionen noch nicht in Einklang gebracht werden können. Sicher ist jedoch das Mitwirken bei der Induktion von IFN- γ , der Aktivierung des Th1-Weges und der Stimulation von T, B und NK-Zellen (s. Abbildung 2.2).

Die antitumoralen Effekte von IL-18 wurden in zahlreichen Tierexperimenten bewiesen. So inhibierte intraperitoneal und intravenös appliziertes IL-18 die Entstehung von Meth A Tumoren in Mäusen und erzeugte ein immunologisches Gedächtnis. Dieser Effekt konnte durch Hemmung der NK-Zellen stark vermindert werden [119]. Analoges wurde für Melanome sowie Fibrosarkome gezeigt und diese Studie ergab zudem, dass IL-12 und IL-18 gemeinsam den stärksten Rückgang an Tumoren hervorbringen konnten. Es wurde weiterhin herausgefunden, dass IL-18 seinen antitumoralen Effekt auch in Abwesenheit von IL-12 und IFN- γ ausüben kann, nicht jedoch ohne NK-Zellen [136]. Murine Mammakarzinomzellen, die mit IL-18 oder IL-12 transduziert wurden, konnten das Tumorstadium inhibieren. IL-12 hatte dabei einen größeren Effekt als IL-18, beide zusammen wirkten am stärksten. Der Effekt wurde auf die Hemmung der Angiogenese durch IFN- γ zurückgeführt [40]. Auch konnte durch intratumorale Injektion eines für IL-18 kodierenden adenoviralen Vektors ein Rückgang von Fibrosarkomen erreicht werden, der durch Zugabe rekombinanten IL-12 verstärkt wurde [135]. Diese Ergebnisse belegen, dass IL-18 allein einen antitumoralen Effekt besitzt, der durch IL-12 nochmals verstärkt werden kann.

2.4.2.4 Regulierbare Genexpression in der Gentherapie

Um gentherapeutische Ansätze im klinischen Bereich sicher und effektiv zu gestalten, ist es nötig von außen durch Vektoren eingebrachte Gene auch im Körper weiterhin kontrollieren zu können. Zum einen ist dies bei einigen Krankheiten erforderlich, um das eingebrachte Genprodukt innerhalb eines therapeutischen Fensters zu dosieren, zum anderen stellt es einen Sicherheitsmechanismus dar, um toxische Effekte von exprimierten Transgenen durch deren Abschaltung kontrollieren zu können. Um eingebrachte Gene in vivo an- und abschalten zu können wurden verschiedene regulierbare Systeme zur Genexpression entwickelt. Die ersten basierten auf natürlich vorkommenden induzierbaren Promotoren, z.B. durch Hitzeschockproteine, Metallothioneine oder Steroidhormone. Allerdings erwiesen sie sich durch eine niedrige Expression und Interferenzen mit körpereigenen Proteinen als nachteilig [104]. Andere Promotoren lassen sich beispielsweise durch ionisierende Strahlung von außen oder Hypoxie im Tumorbett aktivieren [66]. Es wurden chimäre Systeme entwickelt, deren Transaktivatoren so geschaffen sind, dass sie spezifisch für die speziell kodierten Gensequenzen sind und somit keine Interferenzen auftreten. Dazu zählen das durch den Progesteronantagonist RU486, das durch aus Insekten stammende Ecdyson, das

durch das Immunsuppressivum Rapamycin und das durch Tetracyclin (Tc) regulierbare System. Letzteres ist das inzwischen am häufigsten eingesetzte regulierbare System, da es mehrere Vorteile bietet: Es erlaubt eine starke Induktion und Suppression von Genen, Tetracyclin ist gut gewebebegänglich, bindet sehr spezifisch an seinen Rezeptor und führt so zu wenig Nebenwirkungen, die Eigenschaften des Antibiotikums sind sehr gut untersucht und es wirkt in den eingesetzten geringen Dosen nicht toxisch im menschlichen Organismus. Ferner kann das System so moduliert werden, dass es in Anwesenheit von Tc angeschaltet (Tet-ON) oder abgeschaltet wird (Tet-OFF) [4]. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren des 3r-Systems exprimieren die Zytokine IL-12 und IL-18 unter Kontrolle eines autoregulativen Tet-OFF-Systems. An dieser Stelle wird daher die Entwicklung des Tet-Systems vorgestellt.

Das Tet-System basiert auf der Tetracyclinresistenz von Eukaryonten, deren Sequenz unter anderem auf Transposon Tn10 von *E. coli* zu finden ist (s. Abbildung 2.3(a)). Es sind die Gene TetR und TetA, die jeweils von einem eigenen Operator kontrolliert werden. TetA kodiert für einen membranständigen Proton-Tetracyclin-Antiporter, TetR für den Tet-Repressor (TetR). Dieser Repressor bindet in Abwesenheit von Tc als Dimer mit hoher Spezifität an die Operatoren (TetO_R und TetO_A) für TetA und TetR und schaltet die Transkription beider Gene ab. Sobald Tc durch passive Diffusion in die Zelle gelangt, bindet es als Komplex mit Mg²⁺ an TetR und verhindert durch eine Konformationsänderung seine Bindung an die TetOs. Damit wird die Transkription von TetA und TetR initiiert. TetA schleust den Tc-Mg²⁺-Komplex aus der Zelle. Die Affinität von Tc zu TetR ist so groß, dass schon kleinste Konzentrationen zur Induktion von TetA ausreichen, so dass das Antibiotikum exportiert wird, bevor es seine Wirkung als Inhibitor der Proteinbiosynthese entfalten kann. Zusätzlich sind die Gene durch höhere Affinität von TetR zu TetO_A so reguliert, dass TetR induziert wird, bevor TetA das Tc ausschleust. [80]

Dieses in der Natur vorkommende System wird gentechnisch ausgenutzt, indem TetR mit dem Transkriptionsaktivator VP16 des HSV fusioniert wird (s. Abbildung 2.3(b)). So entsteht ein Tc-kontrollierter Transaktivator (tTA) [63]. VP16, das auch als α -TIF bekannt ist, ist Teil des viralen Teguments, bindet zelluläre Transkriptionsfaktoren und induziert so die Transkription früher viraler Gene [120]. Für das tTA wurde ein sog. Tetracyclin responsives Element (TRE) generiert, welches aus einem minimalen CMV-Promotor und sieben stromaufwärts davon liegenden TetO_A-Einheiten besteht und nun das entsprechende Gen reguliert. Der VP16-Anteil stimuliert in Abwesenheit von Tc den minimalen Promotor, nachdem der TetR-Anteil des tTA an eines der TetOs gebunden hat, und das Gen wird transkribiert. In Anwesenheit von Tc kann tTA nicht an TetO binden und die Transkription unterbleibt. So war im ursprünglichen System in HELA-Zellen eine Regulierbarkeit der Luciferaseproduktion über eine Spanne von fünf Zehnerpotenzen möglich [63].

Eine Weiterentwicklung war die Konstruktion eines bidirektionalen Promotors (s. Abbildung 2.3(c)), durch den die gleichzeitige Regulation zweier Gene möglich wurde. Er besteht aus sieben TetOs, welche auf beiden Seiten von einem minimalen Promotor flankiert werden, der folgende Gene kontrolliert [11].

Im selben Zeitraum entstand die Idee, das tTA-Gen unter die Kontrolle des mit TetO fusionierten Promotors zu bringen und somit ein autoregulatives System im Sinne eines positiven Feedbacks zu schaffen [167] (s. Abbildung 2.3(d)). Im angeschalteten Zustand bindet tTA an TetO und steigert seine eigene Transkription. Im abgeschalteten Zustand in Anwesenheit von Tc wird die basale Expression des tTA niedrig gehalten aber nicht abgeschaltet, da eine gewisse Leakiness (Durchlässigkeit) für tTA im abgeschalteten Zustand für die Reaktivierung nötig ist. Das wirkte sich hinsichtlich des Squelching-Effektes günstig aus. Dieser beschreibt ganz allgemein eine Toxizität von Transaktivatoren, wenn diese in zu hohen Konzentrationen anwesend sind, dann mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren,

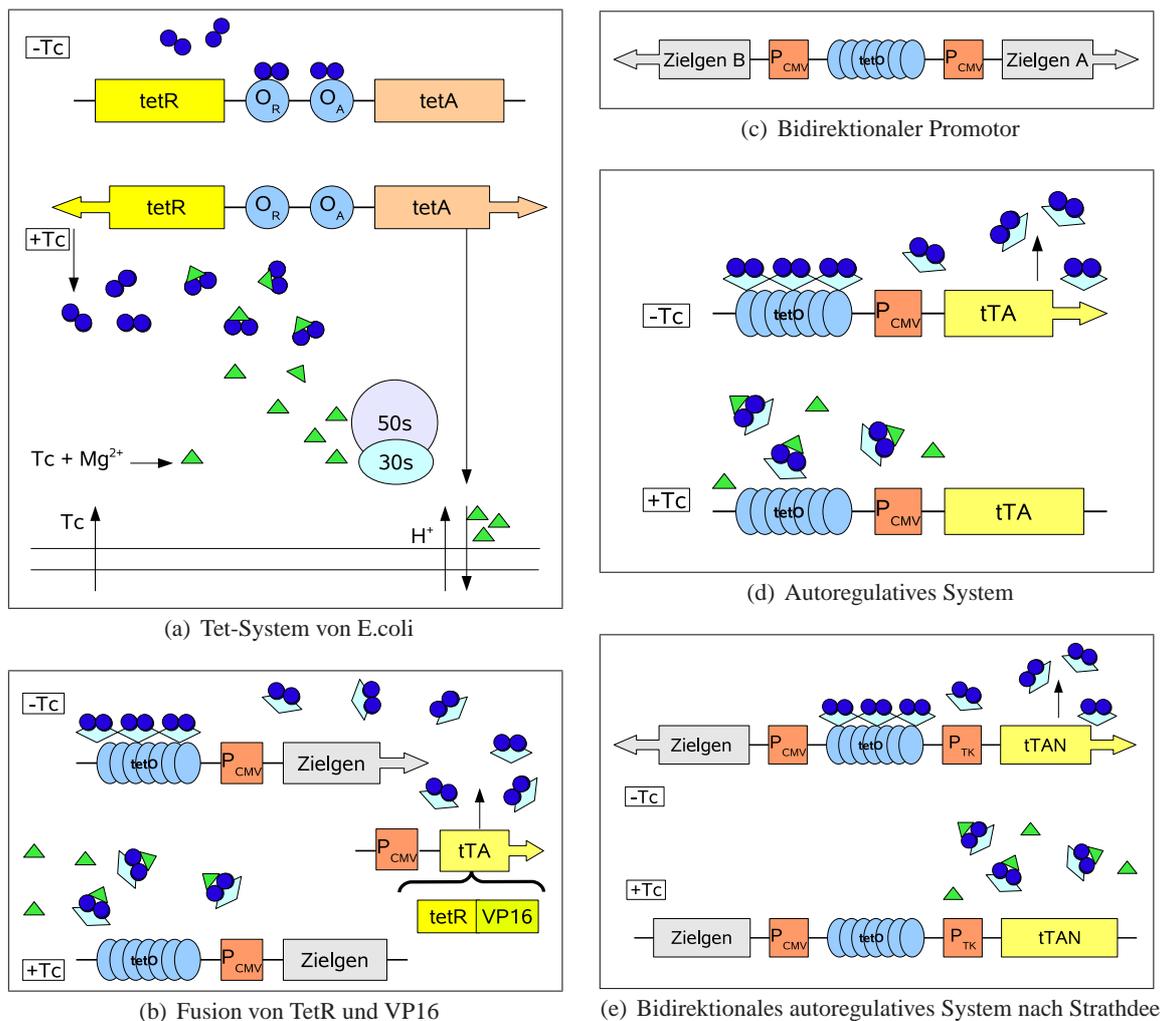


Abbildung 2.3: Die Entwicklung des Tet-Systems

diese verbrauchen und eine Suppression der zellulären Genexpression bewirken [60] und wurde auch für die VP16 Domäne des tTA beschrieben [157, 181]. Dieses Phänomen machte im ursprünglichen System nur niedrige Transgenexpression durch geringe tTA-Level möglich, da bei höheren Konzentrationen die zelluläre Genexpression zu stark geschädigt wurde.

Auf den Prinzipien des bidirektionalen Promotors und der Autoregulation aufbauend entwickelten mehrere Arbeitsgruppen autoregulative bidirektionale Promotoren, die den Vorteil haben, dass sowohl der Transaktivator als auch das TRE, an das dieser bindet, von dem selben Vektor kodiert werden. Die Arbeitsgruppe um CA. Stratheedee verfeinerte dieses System (s. Abbildung 2.3(e)) und das resultierende Plasmid pBIG3r war die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Viren des 3r-Systems [174]. Hierbei sind die sieben TetO-Einheiten auf einer Seite wiederum von dem minimalen CMV-Promotor flankiert, der das Zielgen kontrolliert. Auf der anderen Seite wurden sie mit einem minimalen Thymidinkinase(TK)-Promotor des HSV fusioniert, welcher nun die Transkription der tTA-Sequenz kontrolliert. Er ist viel schwächer als der CMV-Promotor, die tTA-Level sinken also und ein Squelching wird reduziert. Zwischen TetOs und Promotoren befindet sich jeweils ein Intron, was die Transgenexpression steigert. Eine weitere Modifikation in diesem Konstrukt betrifft den tTA, welcher an ein nukleäres Lokalisationssignal aus der Adenovirus E1A-Region gekoppelt wurde (nun tTAN), was

durch die verbesserte Adressierung in den Nukleus die Effizienz steigert. Da sowohl der CMV- als auch der TK-Promotor sehr gewebeunspezifisch sind, bietet sich dieses System für einen flexiblen Einsatz an.

2.4.2.5 Die Adenoviren des 3r-Systems

Das 3r-Vektorsystem wurde von Herrn F. Puls im Rahmen seiner Dissertation "Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression" [24, 144] in unserer Arbeitsgruppe (AG A. Block) entwickelt. Vom ihm stammen auch die Vektoren Ad.3r-mscIL-12 und Ad.3r-luc. Die Vektoren Ad.3r-hscIL-12 (H. Wulff [194]) und Ad.3r-mIL-18 (entstanden in der AG A. Block aus Ad.3i-mIL-18 [193]) bauen auf diesem System auf. Es basiert auf einem E1/E3-deletierten Adenovirus, das ein therapeutisches Konstrukt trägt, welches die Zielgene für IL-12 und IL-18 unter Kontrolle des autoregulativen Tet-Systems nach CA. Strathdee [174] exprimiert. Zur Konstruktion dieser Viren wurde in unserem Labor das Zwei-Plasmid-System nach F. Graham verwendet [19]. Das von dieser Arbeitsgruppe klonierte Plasmid namens pBHG10 enthält die bp 19-188, 1339-28133 und 30818-35934 des Genoms vom Adenovirus Typ 5. Damit sind Teile der E1- (bp 456-3346) und E3-Region (bp 28133-30848) deletiert. Aufgrund des Fehlens der Packaging Sequenz (bp 194-358) ist das Plasmid nicht-infektiös, kann diese Eigenschaft aber nach Kotransfektion mit einem zweiten Plasmid, das die Sequenz enthält, erlangen. Das zweite Plasmid ist das sogenannte adenovirale Expressionsplasmid und wurde in unserer Arbeitsgruppe kloniert. Es enthält Fragmente des adenoviralen Genoms, namentlich die bp 1-456 mit der PS und den ITR sowie die bp 3346-5865, die die nötigen homologen Sequenzen darstellen, welche bei der Rekombination der beiden Plasmide benötigt werden. Zwischen bp 456 und 3346, wo normalerweise Gene der E1-Region kodiert werden, ist Platz für die Insertion externer DNA, welche das therapeutische Konstrukt trägt. Durch homologe Rekombination dieser beiden Plasmide in 293-Zellen, die die E1-Produkte bereitstellen, können infektiöse Viren entstehen und die Zellen lysieren. Die Plasmidkarten für die Expressionsplasmide als Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren des 3r-Systems finden sich im Anhang A.1.

Die Klonierung der verschiedenen adenoviralen Expressionsplasmide, welche die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren waren, wurde nach den gängigen Klonierungsstrategien durchgeführt (s. z.B. [158]). Dabei wurden aus vorhandenen Plasmiden, welche mittels alkalischer Lyse aus *E. coli* vom Genotyp DH5 α gewonnen wurden, die gewünschten Fragmente mittels Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, diese mithilfe der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und die DNA der Banden extrahiert. Nachdem die DNA-Enden der einzelnen Fragmente wenn nötig so modifiziert wurden, dass sie zueinander komplementär waren, wurden sie durch die Ligase des Bakteriophagen T4 ligiert und ein neues Plasmid entstand. Mit diesen Plasmiden wurden kompetente *E. coli* transformiert, d.h. durch die plasmidkodierte β -Laktamase in ampicillinresistente Bakterien umgewandelt.

Die Aufnahme der Plasmide in die Zellen geschieht mithilfe der Kalziumphosphat-Kopräzipitation. Nach Kotransfektion der 293-Zellen werden diese mit einem Agarose-Overlay versehen. Im Falle der erfolgreichen Bildung eines Adenovirus werden nach 10-15 Tagen Plaques sichtbar, die durch Lyse der Wirtszelle und Transduktion der Nachbarzellen entstehen. Diese Plaques können geerntet, weiter analysiert und zur Vermehrung des generierten Adenovirus eingesetzt werden. Die adenoviralen Vektoren des 3r-Systems wurden mir für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit durch die AG A. Block freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Artikel	Hersteller
Agarose, Sea Plaque	Merck
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Assay Diluent	BD Pharmingen
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galacto-Pyranosid (X-Gal)	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ *2 H ₂ O)	Merck
Cäsiumchlorid (CsCl)	Gibco
Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5x	Promega
N,N-Dimethylformamid	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Eosin G Lösung	Merck
Essigsäure 100% (CH ₃ COOH)	Merck
Ethanol absolut p.A.	Merck
Eukitt	Kindler
Glucose	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Glycerin, wasserfrei	Merck
Hämalaun nach Mayer	Merck
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Boehringer
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(III) (K ₃ [Fe(CN) ₆])	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat (K ₄ [Fe(CN) ₆]*3H ₂ O)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Luciferase Assay Reagent Kit (Assay Substrat, Assay Puffer)	Promega
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Merck
Magnesiumsulfat-Hexahydrat (MgSO ₄ *6H ₂ O)	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Braun

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck
Phenol Rot	Merck
Tris (Hydroxymethylaminomethan) (H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃)	Gibco
Trypanblau	Merck
Tween 20	Fluka
XEM-200	Vogel

3.1.2 Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur

Artikel	Hersteller
Anti-mouse CD3-Antikörper	R&D Systems
Doxycyclin (Vibravenös)	Pfizer
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (HGDMMEM)	Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca Mg (PBS)	Gibco
β -Estradiol	Aldrich
Fetal Bovine Serum	Gibco
Fetal Bovine Serum, tetracyclinfrei	Clontech
HEPES Pufferlösung	Gibco
Horse Serum	Gibco
Hydrocortisone	Aldrich
Ionomycin	Sigma
Insulin (bovine from pancreas)	Fluka
L-Glutamin, 200mM	Gibco
McCoy's 5A Medium	Gibco
Modified Eagle Medium 2x	Gibco
Natriumselenit	Aldrich
Nutrient Mixture Ham's F12	Gibco
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Calbiochem
Transferrin, from human blood plasma	Fluka
Trypsin-EDTA	Gibco

3.1.3 Labormaterial

Sterile Materialien für die Arbeiten in der Zellkultur wurden von den Firmen Falcon, Greiner, Nunc und Sarstedt bezogen.

Artikel	Hersteller
Dialysemembranen Slide-A-Lyzer	Pierce
Einwegspritze 10 ml	Braun
Kryotubes, CryoTube Vials	Nunc
Pipetten (2-20-100-200-1000 μ l)	Gilson

Pipetten 8- und 12fach Multichannel	Eppendorf
Pipetus-akku	Hirschmann
Reaktionsgefäße (1,5-2 ml)	Sarstedt
Röhrchen (Tubes), 5 ml, 75x12 mm (für Luciferasemessung)	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter, 0,22 μ m CM Membran	Qualilab
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann

3.1.4 Analyse Kits

Artikel	Hersteller
BD OptEIA Set Mouse IL-12 (p70)	BD Biosciences
BD OptEIA Set Mouse IL-18	BD Biosciences
BD OptEIA Set Mouse IFN- γ	BD Biosciences
BD OptEIA Set Human IL-12 (p70)	BD Biosciences
BCA Protein Assay Kit	Pierce

3.1.5 Geräte

Artikel	Hersteller
Auflichtmikroskop	Hund
Autoklav LAS-S-A S2000	MM München
Brutschränke Zellkultur Hera Cell	Heraeus
Digitalkamera Modell D70	Nikon
Digitalkamera Modell D7	Konica Minolta
Durchlichtmikroskop	Leitz
ELISA-Spektralphotometer Titertek Multiskan Plus	Thermo Labsystems
Feinwaage HR-120	A&D
Luminometer Lumat LB 9507	EG&G Berthold
Magnetrührer	Cenco
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
pH-Meter pH 358	WTW
Photometer Smart Spec 3000	Biorad
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultrazentrifuge Typ L7-35, Rotor: SW40 Ti	Beckmann
Vortex	Cenco
Wasserbad	Braun
Zentrifuge Typ 5804R, Rotor: Eppendorf A4-44	Eppendorf

3.1.6 Zelllinien

Name	Zellart	ATCC-Nummer
293	humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie	CRL-1573
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie	HTB-38
NCI-H295	humane Nebennierenkarzinomzelllinie	CRL-10296
Y1	murine Nebennierenkarzinomzelllinie	CCL-79

3.1.7 Viren

Die Viren des 3r-Systems wurden in der AG A. Block nach dem Zwei-Plasmid-System von F. Graham [19] generiert. Dazu wurde jeweils aus dem Plasmid pBHG10 und dem entsprechenden Expressionsplasmid, das unten aufgeführt ist, der adenovirale Vektor durch homologe Rekombination generiert. Die genaue Konstruktion ist in den angegebenen Referenzen veröffentlicht, bzw. in Grundzügen dem Abschnitt 2.4.2.5 der Einleitung zu entnehmen. Die Plasmidkarten der Expressionsplasmide finden sich im Anhang A.1.

Virus	Expressionsplasmid	Herkunft
Ad.3r-mscIL-12	pAd.3r-mscIL-12	F. Puls (AG A. Block) [144]
Ad.3r-mIL-18	pAd.3r-mIL-18	AG A. Block (abgeleitet aus pAd.3i-mscIL-18 [193])
Ad.3r-luc	pAd.3r-luc	F. Puls (AG A. Block) [144]
Ad.3r-hscIL-12	pAd.3r-hscIL-12	H. Wulff (AG A. Block) [194]
Ad.RSV- β -Gal	pAd.RSV- β -Gal	M. Perricaudet (Institut Gustave Roussy) [173]

3.2 Zellkultur

In diesem Abschnitt wird eine kurze Einführung in die Herkunft der verwendeten Zelllinien gegeben und die Standardmethoden der Zellkultur beschrieben.

3.2.1 Verwendete Zelllinien

Y1-Zellen Die adhären wachsende Y1-Zelllinie stammt aus dem adrenokortikalen Tumor einer männlichen LAF-1 Maus. Von der Arbeitsgruppe um V. Buonassisi (Brandeis University, Waltham, MA, USA) wurde durch ein damals neues Verfahren mit wiederholter Kultivierung der Tumorzellen und anschließender erneuter Injektion in eine Maus die Kultur so selektiert, dass nur die Zellen überlebten, die sich den Kulturbedingungen anpassten [29]. Aus dieser entstand 1966 die Zelllinie, die heute über ATCC bezogen werden kann. Es handelt sich um Steroidhormon-produzierende Zellen, welche durch ACTH stimulierbar sind [145]. Y1-Zellen wachsen in einem Medium bestehend aus 250 ml HGDMEM, 250 ml Nutrient Mixture Ham's F12, 75 ml HS, 15 ml FCS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin/Streptomycin. Für die Versuchsteile unter Einsatz von Adenoviren des 3r-Systems wurden tetracyclinfreies FCS und HS verwendet.

NCI-H295-Zellen Die in Suspension wachsende Zelllinie NCI-H295 wurde aus dem 1980 entdeckten adrenokortikalen Karzinom einer 48-jährigen schwarzen Frau gewonnen. Sie wurde von der Arbeitsgruppe um A.F. Gazdar (NCI-Navy Medical Oncology Branch, Bethesda, MD, USA) etabliert. Die

Zellen produzieren Mineralkortikoide, Glukokortikoide und C19-Steroide, welche aus einer endogenen Cholesterinsynthese hervorgehen. Daher sind sie von exogenem Cholesterin unabhängig [55]. Die Zellen wachsen in einem Medium bestehend aus RPMI 1640, 10^{-8} M Hydrocortison, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ humanem Transferrin, 10^{-8} M β -Estradiol und 3×10^{-8} M Natriumselenit. Zusätzlich wird das Medium mit 2% FCS versetzt. Für die Versuchsteile unter Einsatz von Adenoviren des 3r-Systems wurde tetracyclinfreies FCS verwendet. Beim Splitten der Zellen wurde stets darauf geachtet ca. ein Viertel des verbrauchten Mediums mitzuführen, um autokrine wachstumsfördernde Substanzen zu erhalten.

293-Zellen Die adhärent wachsende 293-Zelllinie wurde von F. Graham (Mc Master University, Hamilton, ON, Canada) durch stabile Transduktion einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK) mit Fragmenten der DNA des Adenovirus Typ 5 gewonnen. Sie ist die erste mit Adenovirus transduzierte humane Zelllinie gewesen [68]. Sie enthält die Basenpaare 1 bis 4344 des adenoviralen Genoms, welche unter Deletion von 19 bp in das PSG4-Gen auf Chromosom 19q13.2 der HEK inseriert wurde. Somit beinhaltet sie die E1-Region, welche die gewonnene Zelllinie in besonderer Weise für die Vermehrung und Titrierung replikationsdefizienter Adenoviren eignet [112]. Da dies in der Vergangenheit in beschriebenen Fällen zur Bildung replikationskompetenter Adenoviren (RCA) durch Rekombination der Virus-DNA mit der E1-Region von 293-Zellen während der Viruspräparation führte [75], wird sie als potentiell biogefährlich eingestuft, so dass alle Arbeiten mit diesen Zellen in Kombination mit Adenoviren unter S2-Bedingen durchgeführt werden müssen. Die Zellen wachsen in HGD MEM, versetzt mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FCS. Für die Versuchsteile unter Einsatz von Adenoviren des 3r-Systems wurde tetracyclinfreies FCS verwendet.

HT29-Zellen Die adhärent wachsende HT29-Zelllinie besteht aus gut differenzierten humanen Kolonkarzinomzellen, die 1964 von J. Fogh (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York, NY) aus einem Primärtumor gewonnen wurden. Sie stammen aus dem Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Frau [98]. Die Zellen wurden in unserem Labor in McCoy's 5A Medium kultiviert, versetzt mit 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FCS. Für die Versuchsteile unter Einsatz von Adenoviren des 3r-Systems wurde tetracyclinfreies FCS verwendet.

3.2.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Kultivierung und Passagierung Jegliche Arbeit mit eukaryonten Zellen erfolgte an einer sterilen Werkbank. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen kultiviert und in einem Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und 96% relativer Luftfeuchtigkeit verwahrt. Die adhären Zellen wurden alle in einer Monolayer kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 90% passagiert. Die in Suspension wachsende Zelllinie NCI-H295 wurde in Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert, wenn ein Farbumschlag des Kulturmediums einen Nährstoffverbrauch anzeigte oder eine starke Traubenbildung erfolgte.

Zum *Passagieren der adhären Zellen* wurde das Kulturmedium abgesaugt und mit ca. 5 ml PBS gewaschen, um tote Zellen oder Zellreste zu entfernen. Dieses wurde wieder abgesaugt und nun etwa 3 ml Trypsin-EDTA auf die Platte pipettiert. Es folgte eine Inkubation für ca. 5 min bei 37°C . Durch das Trypsinieren wurden die Zellen aus ihrer Adhärenz gelöst, anschließend von der Platte gespült und in ein 50 ml Falcontube überführt, das ca. 10 ml Medium pro 1 ml Trypsin enthielt und diese Reaktion stoppte. Die gefüllten Falcontubes wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wurde in Kompletmedium gründlich resuspendiert, um Verklumpungen zu

vermeiden, und konnte nun im Verhältnis von 1:3 bis 1:7 auf Zellkulturgefäße aufgeteilt werden, die vorher mit etwa 20 ml Komplettmedium bestückt worden waren. Bevor die Schalen zurück in den Inkubator verbracht wurden, wurden sie gründlich geschwenkt, um ein möglichst gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu gewährleisten.

Zum *Passagieren der in Suspension wachsenden Zelllinie* NCI-H295 wurde die Zellsuspension in ein Falcontube überführt und für 5 min bei ca. 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden drei Viertel des verbrauchten Mediums abgesaugt und verworfen und ein Viertel des Volumens erhalten, da es zelleigene proliferationsfördernde Substanzen enthält. Das verworfene Medium wurde durch frisches ersetzt und die Zellen im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 auf neue Gefäße aufgeteilt. Bei diesen Zellen wurde jeden zweiten bis dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Während der Passage wurde darauf geachtet die Zellen nicht zu dünn auszusäen, weil hohe Zelldichten sich als proliferationsfördernd erwiesen.

Zellzählung und Vitalitätsprüfung Zum Auszählen und zur Vitalitätsbeurteilung der Zellen wurden diese nach Trypsinierung, Zentrifugation und Resuspension in ca. 3 ml Medium pro 144 mm Zellkulturschale in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau gemischt und für 5 min inkubiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden sie unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Anhand des Verhältnisses von nicht gefärbten lebenden Zellen, die den Farbstoff ausschleusen können, zu blaugefärbten toten Zellen konnte der Vitalitätsgrad abgeschätzt werden.

Einfrieren von Zellen Zum Einfrieren von Zellen wurde ein Medium verwendet, das sich aus RPMI 1640, 10% DMSO und 20% FCS zusammensetzte. Dieses wurde sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden nun wie beim Passagieren gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet dann mit Einfriermedium aufgenommen, so dass ca. 10^6 bis 10^7 Zellen pro ml Einfriermedium enthalten waren. 1 ml der Zellsuspension wurde in jeweils ein Kryotube überführt, langsam abgekühlt und, nachdem es gefroren war, bei -120°C oder bei -80°C gelagert. Das DMSO verhinderte dabei die Kristallisation innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die Dehydratation des Zytoplasmas.

Aussäen tiefgefrorener Zellen Die kryokonservierten Zellen wurden in den Tubes im Wasserbad bei 37°C etwas angetaut und anschließend in ca. 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Verdünnung des DMSO haltigen Einfriermediums erfolgte möglichst rasch, um die Zellen durch die toxische Wirkung des warmen DMSO nicht zu schädigen. Die Zellsuspension wurde wie gewohnt in ein Zellkulturgefäß gebracht und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um Reste des DMSO zu entfernen.

3.3 Amplifikation und Purifikation von Adenoviren

Sämtliche Arbeiten mit Adenoviren wurden unter der sterilen Werkbank unter S2-Bedingungen durchgeführt. Die Viren wurden während der gesamten Arbeit möglichst gut vor UV-Licht abgeschirmt, da dieses ihre Infektiosität mindert.

3.3.1 Amplifikation der Viren

Um eine große Virusmenge zu gewinnen, wurden 293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 85% auf 144 mm Zellkulturschalen in ihrem üblichen Medium kultiviert. Es wurde zunächst eine Platte trans-

duziert, dann sieben und abschließend 50. Bei der Aufreinigung von Viren des 3r-Systems wurde durch Zugabe von 2 μg Doxycyclin pro ml Medium beim letzten Splitten vor der Transduktion sowie beim Mediumwechsel direkt vor der Transduktion die IL-12 Expression unterdrückt, um den toxischen Effekt auszuschalten, der das Wachstum negativ beeinflussen würde.

Zur Transduktion einer Platte wurde das Kulturmedium gewechselt und in das frische Medium aufgereinigtes Virus einer m.o.i. von 10:1 gegeben (ca. 10-20 μl). Als Alternative konnte auch 5 ml Überstand einer vorhergegangenen Aufreinigung verwendet werden. Nach der Überschichtung mit Virus wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für 46 bis 48 h inkubiert. Zum Zeitpunkt der Ernte war ein kompletter cytopathischer Effekt mit abgerundeten und zu 10 bis 20% schwimmenden Zellen sichtbar und die Zellen ließen sich leicht von der Platte spülen. Sie wurden in ein 50 ml Falcontube überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm. Der Überstand wurde nun in ein neues Falcontube überführt und das Pellet in ca. 5 ml Medium resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren und die Viren freizusetzen, wurde mit dieser zellhaltigen Suspension ein dreimaliger Gefrier-Tau-Zyklus mit einem Trockeneis-Ethanol(100%)-Bad und einem Wasserbad von 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellreste durch eine Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm und 10°C entfernt. Der virushaltige Überstand wurde in ein neues Falcontube überführt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde dieser Überstand mit dem virushaltigen Überstand vom Anfang vereinigt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zur Transduktion von sieben Platten erwies es sich als praktikabel nach dem Absaugen des Mediums das frische Medium mit der aufgetauten virushaltigen Lösung aus dem ersten Schritt zu vereinen und anschließend zu gleichen Teilen auf den Platten zu verteilen. Die Ernte nach 48 h und das Aufbrechen der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Die Transduktion von 50 zu 85% konfluenten Platten wurde auf gleiche Weise durchgeführt. Bei der Ernte wurden die Zellen wiederum von den Platten gespült und in 50 ml Falcontubes überführt. Waren diese gefüllt, wurden sie 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand anschließend abgesaugt und die Falcontubes erneut gefüllt, so dass man am Ende der Ernte vier Pellets erhielt. 50 bis 100 ml des Überstandes wurden für spätere Aufreinigungen bei -80°C aufbewahrt, der Rest verworfen. Die vier Pellets wurden in PBS resuspendiert und auf zwei Falcontubes verteilt, so dass jedes Falcontube ca. 5 ml enthielt. Es folgte ein dreimaliger Gefrier-Tau-Zyklus wie oben beschrieben. Danach wurde für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert, der Überstand in einem Falcontube vereinigt und mit PBS auf 36 ml aufgefüllt. Es folgte eine zweite Zentrifugation mit Überführen des Überstandes in ein frisches Falcontube. Dieses konnte nun bis zur Purifikation der Viren bei -80°C eingefroren werden.

3.3.2 Purifikation der Viren

Für die Aufreinigung der Viren mittels Ultrazentrifugation wurde im ersten Schritt ein Stufengradient benötigt, der aus drei Cäsiumchlorid(CsCl)-Lösungen unterschiedlicher Dichte bestand. Die Viren reicherten sich am Ort gleicher Dichte an. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgte mit einem kontinuierlichen Gradienten, der sich innerhalb der 24 h dauernden Zentrifugation ausbildete. Die anschließende Dialyse diente der Entfernung der toxisch wirkenden Cäsiumionen.

Für Lösung A mit einer Dichte von 1,5 g/ml wurden 31,77 g CsCl auf einer Feinwaage abgewogen und mit PBS auf 45 ml aufgefüllt. Anschließend wurde diese Lösung sterilfiltriert und ab jetzt nur noch unter der sterilen Werkbank geöffnet. Für Lösung B mit einer Dichte von 1,35 g/ml wurden 30 ml von Lösung A mit 12 ml PBS verdünnt. Lösung C mit einer Dichte von 1,25 g/ml erhielt man, indem 22 ml

von Lösung A mit 18 ml PBS verdünnt wurden. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen, wurde die Dichte aller drei Lösungen mehrfach überprüft. Bis zum Herstellen des Stufengradienten konnten diese im Kühlschrank bei 4°C verwahrt werden.

Um den Stufengradienten zu erreichen, wurden die drei hergestellten Lösungen in sechs Ultrazentrifugenröhrchen in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet:

- 0,5 ml 1,50 g/ml CsCl
- 3,0 ml 1,35 g/ml CsCl
- 3,0 ml 1,25 g/ml CsCl

Darüber wurden jeweils 6 ml der Zelllösung pipettiert. All dies geschah äußerst vorsichtig, um keine Verwirbelungen zwischen den Schichten zu riskieren, welche den Gradienten zerstört hätten. Die Röhrchen mussten gegeneinander austachiert werden, so dass alle gleich viel wogen (Toleranz: 0,05 g) und bis ca. 3 mm unter den Rand des Röhrchens gefüllt waren.

Die Röhrchen wurden dann in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 34.000 rpm und 10°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Viren als bläulich-weiße Bande sichtbar (s. Abbildung 3.1). Sie konnten mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit einer 20G-Kanüle nach Einstechen des Röhrchens ca. 0,5 bis 1 cm unterhalb der Bande abgezogen werden. Pro Bande ergab sich ca. 1 ml Flüssigkeit.

Diese insgesamt 6 ml wurden in ein 50 ml Falcontube überführt, mit Lösung B auf 24 ml aufgefüllt und anschließend auf 2 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt. Das genaue Austachieren der Röhrchen gegeneinander erfolgte hier mit Lösung B. Die übrigen Röhrchen der Zentrifuge wurden mit PBS gefüllt und gegeneinander ausgewogen. Es folgte eine zweite Zentrifugation für 20 bis 24 h bei 34.000 rpm und 10°C, durch die sich ein kontinuierlicher Gradient ausbildete.

Am nächsten Tag waren erneut bläulich-weiße Virusbanden innerhalb des Gradienten sichtbar und konnten wie oben beschrieben abgezogen werden. Das gesamte Volumen wurde in einen Dialyserahmen überführt, nachdem es je nach abgezogenem Bandenvolumen vorher eventuell mit einigen ml Dialysepuffer verdünnt wurde, um eine Präzipitation der Viren während der Dialyse zu verhindern. Der Dialysepuffer war bereits am Vortag angesetzt und autoklaviert worden und bestand aus folgenden Substanzen:

10 ml 1M TRIS, pH 7,5	}	mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.
1 ml 1M MgCl ₂		
100 ml Glycerin (100%)		

Es wurden insgesamt 4 l benötigt. Nach dem Einfüllen der virushaltigen Lösung in den Dialyserahmen wurde überschüssige Luft sorgfältig abgesaugt, damit sich die Viruslösung gleichmäßig verteilen konnte. Ein großes Becherglas, das einen Rührfisch enthielt, wurde mit einem Drittel des gesamten Puffers gefüllt und der Dialyserahmen auf einen Schwimmer aus Styropor gesteckt und hineingelegt. Mit

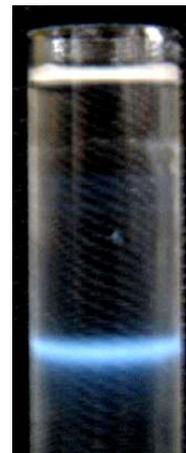


Abbildung 3.1: Photo einer Virusbande: Ein Ultrazentrifugenröhrchen nach der ersten Zentrifugation. Zu sehen ist die bläulich-schimmernde Virusbande, die abgenommen wird. Quelle: A. Block

Alufolie verschlossen wurde die Dialyse für 24 h bei 4°C unter ständigem Rühren im Kühlschrank durchgeführt. Nach jeweils 8 und 16 h musste der Dialysepuffer gewechselt werden.

Nach den 24 h wurde die Viruslösung mit einer Spritze behutsam abgesaugt und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

3.4 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay diente der Titerung aufgereinigter Adenoviren. Nachdem 293-Zellen mit verschiedenen Virusverdünnungen inkubiert und mit Agarose überschichtet worden waren, konnten die lytisch freigesetzten Viren aus einer Zelle nur noch benachbarte Zellen transduzieren, was zur Bildung von Plaques führte.

Einen Tag vor der Titration wurden 2 bis 3 140 mm Zellkulturschalen auf zwanzig 60 mm Schalen gesplittet. Am nächsten Tag hatte sich eine gleichmäßige Monolayer gebildet. Am Tag der Titration wurden zunächst verschiedene Virusverdünnungen angesetzt. Unter der Cleanbench wurden 13 sterile Reaktionsgefäße vorbereitet. Das erste wurde mit 270 µl einer Grundlösung bestehend aus HGDMEM versetzt mit 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin gefüllt, die nächsten 11 Gefäße mit jeweils 1,8 ml dieser Lösung. Das 13. wurde mit 2 ml Lösung gefüllt und diente als Negativkontrolle. In das erste Gefäß wurden 30 µl der zu titernden Viruslösung gegeben. Nach gutem Mischen wurden 200 µl der Virusverdünnung (1:10) in das nächste Gefäß überführt (1:10²), erneut sorgfältig gemischt und ein Aliquot von 200 µl in ein weiteres Gefäß gegeben (1:10³). Dies wurde fortgeführt bis auf diese Weise eine Verdünnungsreihe der Verdünnungsstufen 1:10¹ bis 1:10¹² entstand. Es wurden jedoch nur die Verdünnungen von 1:10⁷ bis 1:10¹² benötigt. Diese und die Negativkontrolle wurden auf Eis gelagert. Der Rest wurde verworfen.

Es wurden im nächsten Schritt immer jeweils drei 60 mm Platten 293-Zellen mit derselben Virusverdünnung infiziert, mit der Negativkontrolle nur zwei. Nach einem Zeitplan wurde bei jeweils 3 Platten das Medium abgesaugt, mit 4 ml PBS gewaschen und 500 µl der Virusverdünnung hinzugefügt. Es wurde mit der Negativkontrolle und dann der höchsten Verdünnung begonnen. Die Platten wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und dabei alle 15 min geschwenkt.

Nach 1 h wurde die Viruslösung abgesaugt und die Platten mit Agarose überschichtet. Dazu wurden am besten schon am Vortag die folgenden Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 1 g Agarose in 100 ml dH₂O. Diese wurde autoklaviert und bis zu ihrer Verwendung bei 37°C im Wasserbad gehalten.

Lösung B: 250 ml 2xMEM
5 ml Penicillin/Streptomycin
5 ml Glutamin
5 ml 5% Hefeextrakt
2,5 ml 1M HEPES Puffer

Lösung B konnte bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden. Vor dem Mischen der beiden Lösungen am Tag des Plaque-Assays wurden zu Lösung B noch 25 ml HS hinzugefügt. Für Viren des 3r-Systems wurde 2 µg Doxycyclin pro ml der Endlösung addiert. Kurz vor dem Überschichten wur-

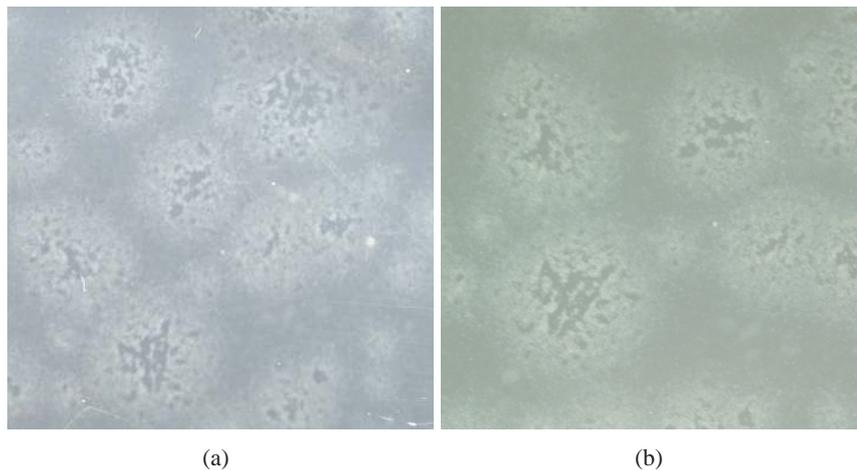


Abbildung 3.2: Plaque-Assay: Photos von Ausschnitten der mit Adenovirus transduzierten und mit Agarose überschichteten 293-Zellen. Durch Lyse der Zellen und Ausbreitung der Viren nur jeweils auf die Nachbarzellen entstehen die Plaques. Digitalkamera Modell D7 von Konica Minolta.

den gleiche Mengen der beiden Lösungen A und B gut vermischt. Nun wurden die Platten mit jeweils 8 ml warmer Agarose überschichtet. Dies musste sehr vorsichtig geschehen, um den Zellrasen nicht zu beschädigen. Die Platten wurden erst zurück in den Inkubator gestellt, wenn die Agarose vollkommen erstarrt war.

Nach 1 Woche musste der Plaque-Assay mit 5 ml pro Platte frischer Agarose überschichtet werden, um den Zellen genügend Nährstoffe zu bieten. Nach ca. 7 Tagen wurden die ersten Plaques sichtbar. Am 10. und 14. Tag wurden sie auf drei Platten einer Verdünnung ausgezählt, die zwischen 10 und 50 Plaques enthielt. Abbildung 3.2 zeigt Beispiele für die charakteristische Morphologie der Plaques. Die Platten wurden in der zweiten Woche regelmäßig abgesucht und Plaques markiert, weil eine Zuordnung nach ihrer Ausbreitung oft schwierig war. Deshalb wurden sie frühest möglich erfasst. Nach dem Auszählen konnte der Virustiter nach folgender Formel bestimmt und in der Einheit pfu/ml (plaque forming units) angegeben werden:

$$t = \frac{nd}{v}$$

t: Virustiter

n: Anzahl der Plaques pro ausgezählter Verdünnung

d: Verdünnung

v: Virusvolumen (hier 0,5 ml)

3.5 Analyse der Transduktion adrenokortikaler Zelllinien

Durch die Analyse verschiedener Markerproteine im Zellüberstand oder Zellinneren konnte die Transduzierbarkeit der Zelllinien ermittelt und die Transduktionseffizienz verschiedener Vektorsysteme in diesen Zellen verglichen werden. Desweiteren wurde so die Expression von IL-12 und IL-18 in der selben Zelllinie analysiert. Bei allen Versuchen mit Viren des 3r-Systems wurden die Zellen immer mindestens eine

Passage vor Beginn des eigentlichen Versuches in tetracyclinfreiem getestetem Medium gehalten, um das Versuchsergebnis nicht durch Spuren von Tetracyclin in den Ansätzen ohne Doxycyclin zu gefährden.

3.5.1 Muriner Interleukin-12-Assay (Ad.3r-mscIL-12)

Für den IL-12-Assay wurden Y1-Zellen in 12-Well-Platten zu jeweils 350.000 Zellen/Well in 1 ml tetracyclinfreiem Medium ausgesät. Bei der Hälfte der Wells wurde 2 μ g Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt. Diese wurden für 6 h bei 37°C inkubiert, um Adhärenz zu erzielen. Nach dieser Zeit erfolgte die Transduktion der Zellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen von Ad.3r-mscIL-12 von 0,1 bis 1000 m.o.i. Dazu wurden von der Virusstocklösung ausgehend entsprechende Verdünnungen angesetzt. Anschließend wurde das Medium aus den 12-Well-Platten abgesaugt und mit jeweils 1 ml PBS gespült. Das PBS wurde entfernt und 0,5 ml der entsprechenden Virusverdünnung hinzugefügt. So wurden jeweils 6 Wells pro m.o.i. bestückt, wobei stets darauf geachtet wurde, dass durch regelmäßiges Wechseln der Pipettenspitzen keine Kontamination der 3 doxycyclinfreien Wells mit dem Antibiotikum haltigen Medium der 3 mit Doxycyclin versetzten Wells stattfand. Als Negativkontrolle diente HGDMEM mit 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C mit dem Virus inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der virushaltige Überstand gründlich abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium +/- Doxycyclin ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation für 48 h bei 37°C, in der die virustransduzierten Zellen IL-12 produzierten. Nach dieser Zeit erfolgte die Ernte, indem die Überstände in Reaktionsgefäße überführt und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurden, um Zellreste zu entfernen. Der nun zellfreie Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Analyse durch den IL-12-ELISA bei -20°C eingefroren. Ein Teil der Aliquots wurde zur Stimulation von Lymphozyten zur Analyse der Bioaktivität verwendet, welche im Abschnitt 3.6 beschrieben wird.

In einem ähnlichen Versuch wurde die IL-12 Produktion der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 zum Vergleich mit Y1-Zellen gemessen. Dazu wurden 300.000 Zellen pro Well in 1 ml tetracyclinfreiem Medium in 24-Well-Platten ausgesät. Die Hälfte der Wells wurden auch hier mit 2 μ g Doxycyclin pro ml Medium bestückt. Es folgte eine Inkubation für 6 h bei 37°C. Wiederum wurden Virusverdünnungen hergestellt, diesmal von 0,1 bis 100 m.o.i. Die Transduktion erfolgte wie oben beschrieben. Nach einer Inkubation der Zellen in 1 ml tetracyclinfreiem Medium mit und ohne Doxycyclin für 48 h erfolgte die Ernte mit Zentrifugation und Aliquotierung der Überstände. Die Aliquots wurden bei -20°C eingefroren.

Um die IL-12 Konzentration in den Überständen der transduzierten Zellen zu messen, wurde der IL-12-ELISA (BD OptEIA Set Mouse IL-12 (p70)) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieser wird an dieser Stelle beispielhaft für alle verwendeten ELISAs beschrieben:

Es wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem gegen die p70 Untereinheit des IL-12 gerichteten Capture Antibody beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 300 μ l Waschpuffer pro Well bestehend aus PBS versetzt mit 0,05% Tween-20. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um Flüssigkeitsreste zu entleeren. Anschließend wurde jedes Well mit 200 μ l Assay Diluent gefüllt, um die Oberfläche zu versiegeln. Während der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die IL-12 haltigen Proben und der im Set mitgelieferte Standard in Assay Diluent verdünnt. Verschiedene Verdünnungen der Proben dienen dazu, Messwerte innerhalb des durch den Standard vorgegebenen Referenzbereiches zu erhalten. Nach Ablauf 1 h wurde die 96-Well-Platte dreimalig gewaschen und mit 100 μ l der Proben- sowie Standardverdünnungen bestückt. Die zweistündige Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurde die p70 Untereinheit des IL-12 in den Proben fest gebunden. Im

folgenden fünfmaligen Waschschrift konnten nun alle übrigen Probenbestandteile entfernt werden. Nun wurde in jedes Well 100 μl des Working Detector pipettiert, der sowohl den Zweitantikörper, welcher gegen ein anderes Epitop des IL-12 gerichtet ist, als auch das Enzym Avidin-Horseradish-Peroxidase enthält, welches an den Zweitantikörper bindet und für die Indikatorreaktion zuständig ist. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 7 Mal gründlich gewaschen, um allen nicht-gebundenen Zweitantikörper zu entfernen, der ansonsten das Ergebnis verfälschen würde. Im nächsten Schritt wurde 100 μl der Substratlösung bestehend aus Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid in jedes Well gegeben, welches während der nun folgenden 30 min lichtgeschützt vom Enzym umgesetzt wurde, was einen sichtbaren Farbumschlag bewirkte. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit durch 50 μl 2N H_2SO_4 gestoppt.

Die Extinktionen der einzelnen Proben wurden mit Hilfe eines ELISA-Readers bei Wellenlängen von 450 nm und 492 nm (als Kontrollwellenlänge) bestimmt. Aus den Werten des Standards wurde eine Standardkurve erstellt. Mit Hilfe der daraus abgeleiteten Standardgleichung konnten nun aus den Extinktionen der Probenwerte, welche innerhalb des Standards lagen, die entsprechenden IL-12 Konzentrationen errechnet und graphisch ausgewertet werden.

3.5.2 Muriner Interleukin-18-Assay (Ad.3r-mIL-18)

Analog dem oben beschriebenen Versuch mit IL-12 wurden in diesem Teil Y1- und HT29-Zellen mit Ad.3r-mIL-18 transduziert, um die Expression eines anderen therapeutischen Gens bei gleichem Promotor und gleichem Vektor zu prüfen.

Hierzu wurden Y1- und HT29-Zellen in einer Konzentration von 300.000 Zellen pro Well auf 12-Well-Platten in tetracyclinfreiem Medium ausgesät. Zu der Hälfte der Wells jeder Zelllinie wurden 2 μg Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden für 6 h bei 37°C inkubiert. Es wurden Virusverdünnungen von 10 bis 10.000 m.o.i. hergestellt. Als Verdünnungsmedium wurde HGDMEM versetzt mit 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Dieses diente auch als Negativkontrolle. Zur Transduktion der Zellen wurde nach 6 h das Medium abgesaugt und die Wells mit 1 ml PBS gespült. Das PBS wurde wieder entfernt und 0,5 ml der jeweiligen Virusverdünnung hinzugefügt, so dass jeweils 6 Wells jeder Zelllinie pro m.o.i. vorlagen, 3 davon mit und 3 ohne Doxycyclin. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der virushaltige Überstand gründlich abgesaugt und durch 1 ml tetracyclinfreies Kompletmedium +/- Doxycyclin ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 48 h. Nach dieser Zeit wurden die Überstände in Eppendorf-Tubes überführt, für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die zellfreien Überstände nun aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die Analyse der IL-18 Konzentrationen in den Proben erfolgte mit Hilfe eines IL-18-ELISAs (BD OptEIA Set Mouse IL-18) nach den Angaben des Herstellers. Siehe Abschnitt 3.5.1 für eine beispielhafte Beschreibung der Durchführung.

3.5.3 β -Galaktosidase-Assay (Ad.RSV- β -Gal) und H.E. Färbung von NCI-H295

In diesem Versuch sollte die Transduzierbarkeit der humanen Nebennierenkarzinomzelllinie NCI-H295 mit dem Adenovirus Ad.RSV- β -Gal getestet werden. Es diente dem Nachweis, ob diese Zelllinie überhaupt mit adenoviralen Vektoren transduzierbar ist. Das Enzym β -Galaktosidase spaltet normalerweise sein Substrat Laktose. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid), das in diesem Versuch als Substrat zum Einsatz kommt, wird aber ebenfalls erkannt. Wenn die transduzierten Zellen β -Galaktosidase

produzieren, spaltet das Enzym die glykosidische Bindung des am Ende des Versuchs hinzugefügten X-Gals. Das entstandene 5-Brom-4-chlor-indoxyl dimerisiert nach Oxidation zu 5,5'-dibrom-4,4'-dichlor-indigo, einem blauen Farbstoff, der schon makroskopisch sichtbar ist. Vergleichend sollte die Morphologie der nicht-behandelten Zellen durch eine Färbung mit Hämalaun&Eosin gezeigt werden. Da für beide Färbungen nur Protokolle für adhärenzte Zellen vorlagen, wurden diese so modifiziert, dass sie auf in Suspension wachsende Kulturen übertragen werden konnten. Die Fixierung der Zellen, welche normalerweise direkt auf ihrer Zellkulturschale gefärbt werden können, war dabei der kritische Schritt.

Für die Transduktion von NCI-H295 mit Ad.RSV- β -Gal wurde die Suspensionskultur zunächst in ein Falcontube überführt, für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und anschließend nach Absaugen des Überstandes in 3 ml RPMI resuspendiert. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden in einer 24-Well-Platte 1 Mio. Zellen pro Well in 250 μ l RPMI ausgesät und 250 μ l virushaltige Lösung einer Konzentration von 200 m.o.i. hinzugefügt. Das Volumen wurde so klein gewählt, um Zellen und Virus möglichst nahe aneinander zu bringen. Als Negativkontrolle diente reines RPMI. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Nach dieser Zeit wurden die Zellsuspensionen in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml FCS-freiem Medium resuspendiert. Nun wurden diese Ansätze für 24 h bei 37°C inkubiert, in der die virustransduzierten Zellen das Enzym β -Galaktosidase produzieren konnten. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in ihrem Medium gründlich aus den Wells gespült, da virustransduzierte Zellen der Linie NCI-H295 erfahrungsgemäß zur Adhärenz neigen. Nach Überführen der Zellsuspension in Reaktionsgefäße wurden diese für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt.

Es folgte die Fixierung der Zellen auf einem Objektträger. Dazu erfolgte zunächst eine Resuspension in 40 μ l RPMI. Dieses Volumen wurde auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Den Zellen wurde Zeit gegeben anzutrocknen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 5% Glutaraldehyd, eine erneute Trocknung und ein Waschvorgang mit PBS.

Zur Färbung der transduzierten Zellen erfolgte eine Überschichtung der Objektträger in einer Petrischale mit X-Gal-Färbelösung und eine Inkubation für ca. 5 h bei 37°C. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Zellen unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet und die Photographien mit der Digitalkamera (Modell D70 von Nikon) erstellt.

Die eingesetzte Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen:

1,3 mM	MgCl ₂
3 mM	NaCl
3 mM	Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat
3 mM	Kaliumhexacyanoferrat(III)
2,5%	X-Gal-Lösung (bestehend aus 20 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galacto-Pyranosid in 1 ml N,N-Dimethylformamid)
44 mM	HEPES pH 7,3

Für die Doppelfärbung mit Hämalaun&Eosin wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert, dann jedoch nach folgendem Färbeschema weiterbehandelt:

Die Objektträger wurden für 30 s in Aqua dest. eingebracht und anschließend für 1 min in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Es folgte ein Spülvorgang für 10 min unter Leitungswasser und ein dreiminütiger Färbeschritt mit Eosinfärbelösung, die sich wie folgt zusammensetzte:

2/3	1% Eosin G Stammlösung
1/3	Aqua dest.
2-3 Tropfen	Essigsäure 100%

Nach kurzer Spülung in Aqua dest. erfolgte die Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe: Zunächst kurzes Eintauchen in 80% Ethanol, dann kurzes Eintauchen in 96% Ethanol und Einbringen in 100% Ethanol für 1 min. Abschließend wurde 3 min in Xylolersatz XEM-200 fixiert. Die Objektträger wurden getrocknet und mit Eukitt eingedeckt. Nun konnte auch hier die Betrachtung und Photographie (Modell D70 von Nikon) unter dem Durchlichtmikroskop erfolgen.

3.5.4 Luciferase-Assay (Ad.3r-luc)

Mit Hilfe des Vektors Ad.3r-luc kann das Lumineszenzgen Luciferase, das natürlicherweise in Glühwürmchen, Leuchtkäfern und Leuchtbakterien vorkommt, in Zellen eingeschleust werden. Auf diese Weise wird die Transduktionseffizienz des Vektors gemessen, denn das exprimierte Enzym, das sich im Zellinneren befindet, decarboxyliert Luciferin unter Lichtemission zu Oxyluciferin und CO₂, was im Luminometer in Form von relativen Lichteinheiten (rlu) festgestellt werden kann. Mit dieser Methode wurde die Transduktionseffizienz des verwendeten Vektors in der Zelllinie NCI-H295 getestet.

Für den Versuch wurden zunächst die Virusverdünnungen von Ad.3r-luc angesetzt, so dass Viruskonzentrationen im Verhältnis von 0,1 bis 1000 m.o.i. vorlagen. Es wurden in einer 96-Well-Platte 500.000 Zellen der Linie NCI-H295 pro Well enthalten in 105 µl RPMI ausgesät. Jeweils 6 Wells wurden mit 145 µl der gleichen viralen m.o.i. versehen, so dass jedes Well 500.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 250 µl bestückt mit der jeweiligen Anzahl an Viruspartikeln enthielt. Die Hälfte der Zellen, d.h. 3 Wells pro Verdünnungsstufe, waren seit der letzten Passage mit Zusatz von 2 µg Doxycyclin pro ml Medium kultiviert worden. Diese Ansätze wurden nun für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend der Inhalt jedes Wells in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µl FCS-freiem Medium resuspendiert und in die Wells zweier 24-Well-Platten überführt. Zu der Hälfte der Zellen, die auch vorher schon mit Doxycyclin kultiviert worden war, wurde 2 µg Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt, um die Luciferase-Expression zu hemmen. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie samt Medium gut aus den Wells gespült, um möglichst wenig Zellen und damit Luciferase zu verlieren, und in Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde das PBS bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und erneut 3 min lang bei 5000 rpm zentrifugiert. Dann wurde das restliche PBS entgültig entfernt und die verbleibenden Zellpellets in 100 µl 1x CCLR-Puffer resuspendiert. Dieser Puffer führte zur Lyse der Zellen mit Freisetzung der Luciferase. Die Zelllysate wurden in frische Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C für mindestens 30 min eingefroren. Kurz bevor die Proben weiterverwendet wurden, wurden die unaufgetauten Tubes für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Ein Aliquot jeder Probe wurde zur Luciferasebestimmung verwendet, das zweite für eine Bestimmung des Gesamtproteins, welche im Abschnitt 3.7 beschrieben wird.

Für die Messung der Luciferaseaktivität wurde das Luminometer mit dem Luciferase Assay Reagenz der Firma Promega, welches sich aus dem Luciferase Assay Substrat und dem Puffer zusammensetzte, bestückt. Die Messung erfolgte unter Einstellung folgender Parameter: Nulleffekt-Messzeit: 3.0 s, maximaler Nulleffekt: 100 rlu/s, verzögerte letzte Injektion pro Messung: 1.0 s, Messzeit: 3.0 s. Jeweils 20

μl der zentrifugierten und nun aufgetauten Proben wurden in ein Kunststoffröhrchen pipettiert und im Luminometer platziert. Das Gerät fügte automatisch 100 μl Luciferase Assay Reagenz zu jeder Probe hinzu und führte die Messung der Lichtemission durch. Die in rlu gemessenen Werte waren proportional zur Luciferasemenge in der Probe.

Dieser Versuch wurde mehrfach durchgeführt. Es gab einen Vorversuch, den Hauptversuch und einen Zusatzversuch. Die gegebene Beschreibung ist die des Hauptversuchs, bei den anderen wurde aber die Anzahl der Versuchsansätze sowie die eingesetzten m.o.i. variiert. Ansonsten stimmt der Ablauf überein.

Um die Luciferasekonzentration in pg/ml zu erhalten, was nötig war, um sie mit der Proteinkonzentration in Beziehung zu setzen, wurde der Wert der Lichtemission in rlu mithilfe einer Formel umgerechnet. Diese Formel war in unserem Labor vor einiger Zeit an dem auch in dieser Arbeit verwendeten Luminometer auf der Basis einer Messreihe bekannter Luciferasekonzentrationen erstellt worden, die graphisch gegen die gemessenen Lichtemissionen aufgetragen wurden. Daraus ergab sich ein Verhältnis zwischen Lichtemission l (rlu) und Luciferasekonzentration c (pg/ml), welches durch die Formel

$$c = (0.0017 l)^{1.0022}$$

ausgedrückt wird. Durch Einsetzen des gemessenen Emissionswertes erhielt man die Luciferasekonzentration in pg/ml . Diese wurde im Rahmen der Auswertung in Bezug zur Proteinkonzentration gesetzt.

3.5.5 Humaner Interleukin-12-Assay (Ad.3r-hscIL-12)

In diesem Versuch wurde die Transduzierbarkeit der Zelllinie NCI-H295 mit dem von Herrn H. Wulff zur Verfügung gestellten Adenovirus Ad.3r-hscIL-12 getestet.

Für den Versuch wurden zunächst die Virusverdünnungen von Ad.3r-hscIL-12 angesetzt, so dass Viruskonzentrationen im Verhältnis von 0,1 bis 1000 m.o.i. vorlagen. Es wurden in einer 96-Well-Platte 500.000 Zellen der Linie NCI-H295 pro Well enthalten in 105 μl RPMI ausgesät. Jeweils 6 Wells wurden mit 145 μl der gleichen viralen m.o.i. versehen, so dass jedes Well 500.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 250 μl bestückt mit der jeweiligen Anzahl an Viruspartikeln enthielt. Die Hälfte der Zellen, d.h. 3 Wells pro Verdünnungsstufe, waren seit der letzten Passage mit Zusatz von 2 μg Doxycyclin pro ml Medium kultiviert worden. Diese Ansätze wurden nun für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend der Inhalt jedes Wells in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 μl FCS-freiem Medium resuspendiert und in die Wells zweier 24-Well-Platten überführt. Zu der Hälfte der Zellen, die auch vorher schon mit Doxycyclin kultiviert worden war, wurde 2 μg Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt, um die IL-12 Produktion zu hemmen. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Überstände aller 36 Wells in Reaktionsgefäße überführt und diese für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Von diesen Überständen wurden nun wieder Aliquots abgenommen und bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Um die IL-12 Konzentration in den Überständen der transduzierten Zellen zu messen, wurde der IL-12-ELISA (BD OptEIA Set Human IL-12 (p70)) durchgeführt. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt, die denen des im Absatz 3.5.1 beschriebenen murinen IL-12-ELISAs entsprachen.

3.6 Bioaktivitätsanalyse von Interleukin-12 im Interferon- γ -Bioassay

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit des von Y1-Zellen produzierten IL-12 getestet, murine Lymphozyten zur IFN- γ Produktion zu stimulieren, was einer seiner wichtigsten Funktionen in vivo entspricht.

Vor der Gewinnung der Lymphozyten wurde eine Zellkulturflasche mit Anti-mouse CD3 Antikörpern beschichtet. Dafür wurden zunächst 500 μg des lyophilisierten Antikörpers in 1 ml PBS aufgenommen. 100 μl dieser Lösung wurden mit 4,9 ml PBS verdünnt. Diese 5 ml wurden anschließend auf den Boden einer 75 cm^2 Zellkulturflasche pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde eine Mäusemilz zur Gewinnung der Lymphozyten präpariert. Zunächst wurde ein Kulturmedium für die Lymphozyten angesetzt, das sich wie folgt zusammensetzte:

	RPMI 1640	500 ml
100 Units/ml	Penicillin	(=2,5 ml/500 ml)
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Streptomycin	(=2,5 ml/500 ml)
2mM	L-Glutamin	(=5 ml/500 ml)
10%	FCS	(=50 ml/500 ml)
50 μM	2-Mercaptoethanol	(=ca. 2 μl /500 ml)

In eine 100 mm Petrischale wurden 10 ml dieses Mediums gegeben und eine vorher angefertigte Nytextasche in die Schale gelegt. Es wurden 2 weitere Schalen mit PBS gefüllt. Einer weiblichen ca. 14 Wochen alten NMRI-Maus (Charles River Laboratories) wurde die Milz entnommen, diese in die erste Schale mit PBS überführt, unter die Cleanbench gebracht und dort gewaschen. Alle weiteren Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Anschließend wurde die Milz in die zweite mit PBS gefüllte Schale überführt und dort ebenfalls gewaschen. Nun wurde sie mit Hilfe einer stumpfen Pinzette in die Nytextasche in Lymphozytenkulturmedium gelegt. Die Milz wurde mit einer spitzen Pinzette durch das Netz hindurch kräftig perforiert. Anschließend wurden mit einer stumpfen Pinzette wiederholt die Zellen aus der Milz hinaus in die Petrischale gestrichen bis nur noch die glasige Milzkapsel in der Nytextasche lag. Das Netz wurde noch mehrmals gespült und dann die Zellsuspension in ein Falcontube überführt, das mit Medium auf 15 ml aufgefüllt wurde.

Im nächsten Schritt mussten die in der Suspension enthaltenen Erythrozyten lysiert werden. Dazu konnte schon am Vortag der Gey's Lysepuffer angesetzt werden, der sich wie folgt zusammensetzte:

7 ml	dH ₂ O	
2 ml	Lösung A:	17,5 g NH ₄ Cl
		0,925 g KCl
		0,375 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O
		0,0595 g KH ₂ PO ₄ unhydriert
		2,5 g Glukose
		0,025 g Phenol Rot
		Aqua dest. auf 500 ml

0,5 ml Lösung B: 0,42 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,14 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,26 g CaCl_2 unhydriert
Aqua dest. auf 100 ml

0,5 ml Lösung C: 2,25 g NaHCO_3
Aqua dest. auf 100 ml

Nach dem Ansetzen mussten Lösungen A, B und C sterilfiltriert werden. Kurz vor der Anwendung wurden die Komponenten zusammengegeben. Die Milzzellsuspension wurde 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nun wurden 10 ml Gey's Puffer dazugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 6 min mit 1500 rpm. Das Pellet wurde anschließend in 0,2 ml PBS resuspendiert und mit 14,8 ml Kulturmedium aufgefüllt. Es folgte eine Zellzahlbestimmung, auf deren Basis 20 ml einer Zellsuspension mit $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml in einem 50 ml Falcontube angesetzt wurden. Der mit CD3-Antikörpern beschichteten Zellkulturflasche, die inzwischen 2 h Inkubation hinter sich hatte, wurde das Medium entnommen und diese zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Es wurden die 20 ml Lymphozytenlösung in die Flasche pipettiert und zur Stimulation der Zellen 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin sowie $5 \times 10^{-6}\text{M}$ TPA hinzugefügt. Die ideale Konzentration der Stimulantien war den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe aus anderen Testreihen folgend in einem Vorversuch mit Lymphozyten ausgetestet worden. Es folgte eine Inkubation für 18 h bei 37°C .

Vor der Ernte der Lymphozyten nach dieser Zeit wurden die Ansätze für den folgenden Bioassay vorbereitet. Es wurden in einer 96-Well-Platte alle benötigten Wells mit 50 μl Lymphozytenkulturmedium bestückt. Dann wurden 25 μl der zu testenden IL-12 haltigen Proben, welche aus dem im Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Versuch stammten, und Negativkontrollen in jedes Well hinzu pipettiert und die Platte auf Eis gelegt. Es wurden also Überstände von Y1-Zellen verwendet, welche zuvor mit den folgenden m.o.i. von Ad.3r-mscIL-12 transduziert worden waren: 0-0,1-1-10-100-1000 m.o.i. Als Negativkontrolle diente reines Lymphozytenkulturmedium. Pro m.o.i. lagen 6 Ansätze vor, 3 davon aus Überständen von mit Doxycyclin behandelten Zellen und 3 aus tetracyclinfreien Ansätzen. Nun wurde die Lymphozytenkultur in ein 50 ml Falcontube überführt und 6 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,2 ml PBS vorsichtig resuspendiert und mit weiteren 5 ml PBS aufgefüllt. Es folgte eine zweite Zentrifugation. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und es fand eine Zellzahlbestimmung statt, auf deren Grundlage eine Zellsuspension mit $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml hergestellt wurde. In jedes Well der 96-Well-Platte wurden 50 μl dieser Lymphozytensuspension pipettiert (entsprechend 40 000 Zellen), so dass jeder Versuchsansatz am Schluss 125 μl enthielt (50 μl Lymphozytenkulturmedium, 50 μl Lymphozytensuspension und 25 μl zu testende Probe). Die Inkubationsdauer betrug nun 24 h bei 37°C .

Am nächsten Tag fand die Ernte der IFN- γ haltigen Überstände statt. Dazu wurden zuerst die Wells einer neuen 96-Well-Platte mit jeweils 50 μl PBS bestückt. Es wurden 50 μl jedes Überstandes vorsichtig hinzupipettiert. Diese nun 1:1 verdünnten Proben konnten bei -80°C mit Parafilm verschlossen bis zur weiteren Analyse eingefroren werden.

Der IFN- γ Gehalt der Proben wurde mit Hilfe eines IFN- γ -ELISAs bestimmt (BD OptEIA Set Mouse IFN- γ), welcher nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Für eine beispielhafte Beschreibung der Durchführung eines ELISAs siehe Abschnitt 3.5.1.

3.7 Proteinquantifizierung

Dieser Versuch diente der Quantifizierung des Gesamtproteins der Zellysate der Proben des Luciferase-Assays, welcher im Abschnitt 3.5.4 beschrieben wurde. So entstand die Möglichkeit die Luciferasemenge in Relation zum Gesamtprotein zu setzen, was die Aussagekraft dieses Versuchs erhöhte.

Zur Messung des Gesamtproteingehalts wurde der BCA Protein Assay der Firma Pierce verwendet. Zunächst wurde eine Standardreihe vorbereitet, indem aus einer Standardstocklösung der Konzentration 2 mg/ml Verdünnungen von 500-250-125-50-15 μg Protein pro ml hergestellt wurden. Als Verdünnungslösung diente Aqua dest. Nachdem die Proben aus dem Luciferase-Assay, wie oben beschrieben, unaufgetaut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert worden waren, mussten einige der Proben mit Aqua dest. verdünnt werden, um innerhalb der Standardkurve zu liegen. Die Verdünnung wurde bei der späteren Auswertung berücksichtigt. Nun wurde das Assay Reagenz aus den mitgelieferten Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Dieses diente auch als Leerwert. Jeweils 50 μl jeder Probe wurde mit 1 ml Assay Reagenz gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben wieder abgekühlt waren, erfolgte die photometrische Messung mit Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda=562$ nm mit dem Photometer Smart Spec 3000. Die Berechnung der den Extinktionen entsprechenden Proteinkonzentrationen in $\mu\text{g}/\text{ml}$ erfolgte anhand der durch die Standardkurve festgelegten Standardformel automatisch durch das Gerät. Nun konnten die im Luciferase-Assay bestimmten Luciferasekonzentrationen zum Gesamtprotein in Relation gesetzt werden (Luciferasekonzentration in pg pro ml/Gesamtproteinkonzentration in μg pro ml). Auf diese Weise kamen für jeden Versuchsansatz mit Ad.3r-luc drei graphische Auswertungen mit unterschiedlichen Ordinateneinheiten zustande: die reine Luciferaseaktivität gemessen in rlu, die Luciferasekonzentration in pg/ml errechnet mit Hilfe einer Standardformel (siehe Abschnitt 3.5.4) sowie die Luciferasekonzentration bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration in pg/mg entsprechend der in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise.

Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der *in vitro* Studien mit der murinen adrenokortikalen Zelllinie Y1 und der humanen adrenokortikalen Zelllinie NCI-H295 vorgestellt, die mit adenoviralen Vektoren des 3r-Systems transduziert wurden. Beide Zelllinien wurden auf ihre Transduzierbarkeit, eine m.o.i. abhängige Transgenexpression und eine Supprimierbarkeit durch das Antibiotikum Doxycyclin untersucht.

4.1 Ergebnisse mit murinen Nebennierenkarzinomzellen

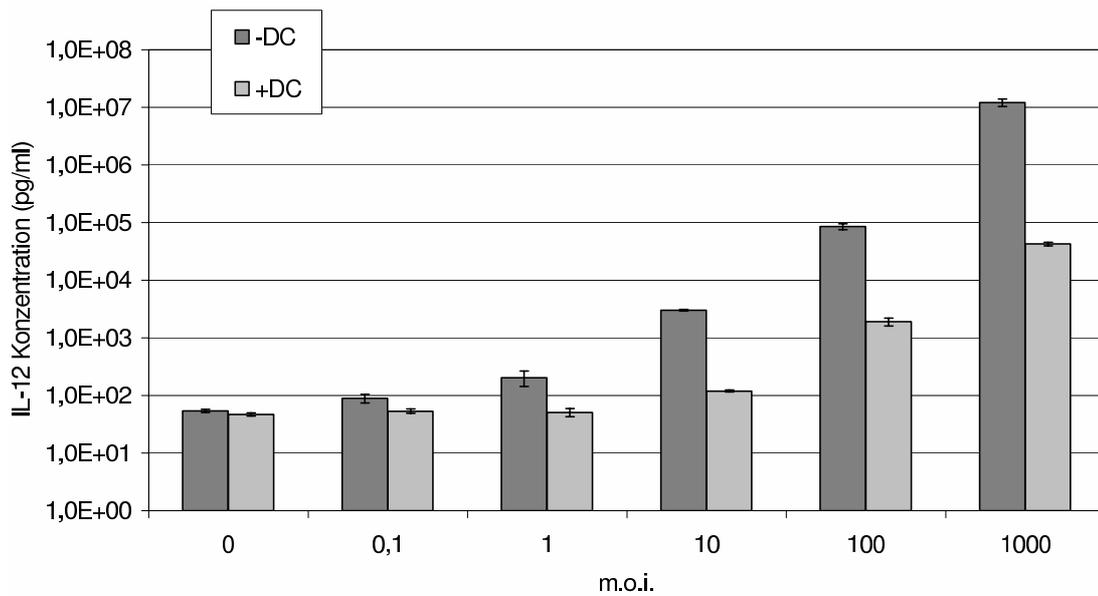
Zunächst wurde die murine adrenokortikale Zelllinie Y1 mit dem Vektor Ad.3r-mscIL-12 transduziert und die IL-12 Produktion sowie ihre Supprimierbarkeit durch Doxycyclin ermittelt. Diese Daten wurden mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 verglichen. Das produzierte IL-12 wurde hinsichtlich seiner Bioaktivität analysiert. Als nächstes wurde der Vektor Ad.3r-mIL-18 zur Transduktion von Y1- und HT29-Zellen verwendet und die Transduktionseffizienz verglichen.

4.1.1 Analyse der Transduzierbarkeit von Y1-Zellen mit Ad.3r-mscIL-12

Es sollte die Transduzierbarkeit der adrenokortikalen Zelllinie Y1 durch das Adenovirus Ad.3r-mscIL-12, die m.o.i. abhängige IL-12 Produktion und die Supprimierbarkeit der Transgenexpression durch Doxycyclin getestet werden.

Dazu wurden Y1-Zellen in 12-Well-Platten zu jeweils 350.000 Zellen pro Well mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen von Ad.3r-mscIL-12 von 0,1 bis 1000 m.o.i. für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der virushaltige Überstand entfernt und durch 1 ml frisches Medium +/- Doxycyclin ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 48 h bei 37°C, in der die virustransduzierten Zellen IL-12 produzierten. Dieses wurde mithilfe eines IL-12-ELISAs aus den gewonnenen Überständen bestimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve und der daraus abgeleiteten Standardgleichung konnten aus den Extinktionen der Probenwerte, welche innerhalb des Standards lagen, die entsprechenden IL-12 Konzentrationen errechnet und graphisch ausgewertet werden.

Das Ergebnis ist Abbildung 4.1 zu entnehmen. In der Graphik 4.1(a) ist zu sehen, dass die IL-12 Konzentration in den Überständen von Y1-Zellen mit der eingesetzten m.o.i. zunimmt. Der Maximalwert für 1000 m.o.i. liegt im Bereich von 10^7 pg/ml und damit um mehr als fünf Zehnerpotenzen höher als der Nullwert. Es kann infolgedessen festgestellt werden, dass Y1-Zellen mit diesem Vektor als Stellvertreter des 3r-Systems transduzierbar sind und eine dosisabhängige IL-12 Produktion zeigen. Der Graphik ist auch zu entnehmen, dass die Transgenexpression durch Doxycyclin regulierbar ist. In den Proben mit Zusatz von 2 µg Doxycyclin pro ml Medium ist die IL-12 Produktion deutlich inhibiert. Der Suppressionsfaktor lässt sich durch einfache Division der Werte ohne und mit Doxycyclin errechnen (s. dazu



(a) Graphische Darstellung der IL-12 Produktion

m.o.i.	IL-12 ohne DC (a)	IL-12 mit DC (b)	Suppression (a/b)
1000	12105510,92	42587,98	284,25
100	84869,35	1910,64	44,42
10	3011,71	119,47	25,21
1	204,91	51,02	4,02
0,1	89,32	53,58	1,67

(b) Kalkulation des Suppressionsfaktors der IL-12 Produktion durch Doxycyclin

Abbildung 4.1: IL-12 Produktion von mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierten Y1-Zellen +/- Doxycyclin

Abbildung 4.1(b)). Bei 1000 m.o.i. ist sie um den Faktor 284 niedriger, das entspricht einer Abnahme um 99,6%. Bei 100 m.o.i. sind es 98% (Faktor 44), bei 10 m.o.i. 96% (Faktor 25), bei 1 m.o.i. 75% (Faktor 4) und bei 0,1 m.o.i. immer noch 40% (Faktor 2). Das fasst die Unterschiede, die aufgrund der logarithmischen Darstellung nicht spektakulär aussehen, in imposante Zahlen.

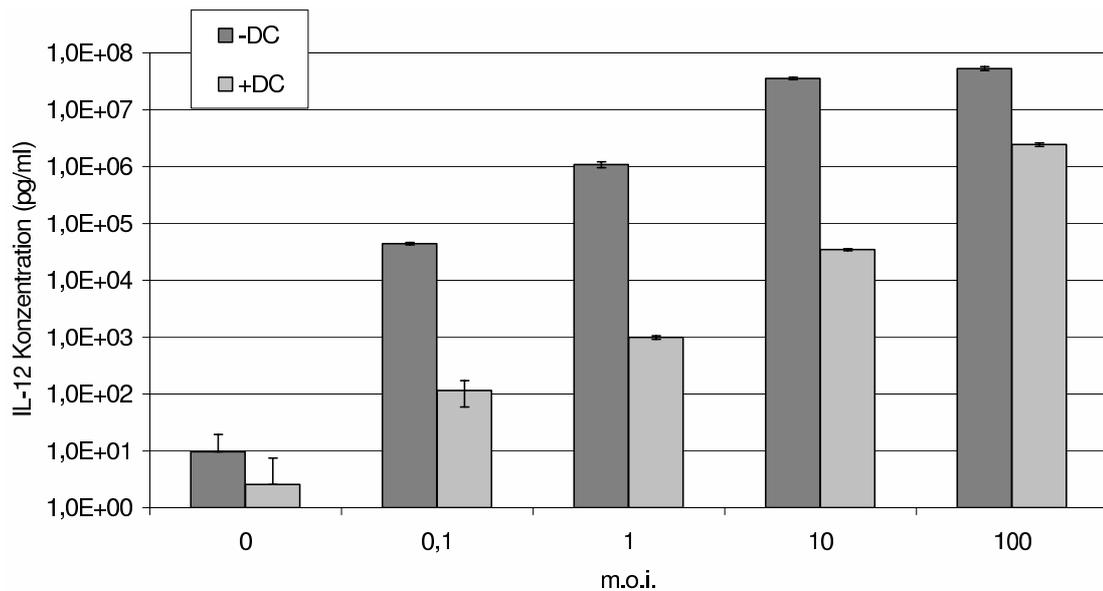
Y1-Zellen sind demnach durch Ad.3r-mscIL-12 transduzierbar, produzieren dosisabhängig IL-12 und sind durch Doxycyclin in ihrer Produktion regulierbar.

4.1.2 Vergleich der Interleukin-12 Produktion von Y1-Zellen mit HT29-Zellen

In diesem Versuchsteil wurde die IL-12 Produktion der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach Transduktion mit Ad.3r-mscIL-12 gemessen, um sie mit der von Y1-Zellen zu vergleichen.

Dazu wurden 300.000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten mit Virusverdünnungen von Ad.3r-mscIL-12 von 0,1 bis 100 m.o.i. für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der virushaltigen Überstände folgte eine Inkubation der Zellen in 1 ml frischen Mediums mit und ohne Doxycyclin für 48 h. Die Überstände wurden nach dieser Zeit geerntet und der IL-12 Gehalt mithilfe eines IL-12-ELISAs bestimmt. Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der ermittelten Standardgleichung.

In der graphischen Auswertung der Abbildung 4.2(a) ist ein dosisabhängiger Anstieg der IL-12 Konzentration in den Überständen von HT29-Zellen sichtbar. Der Maximalwert für 100 m.o.i. liegt bei etwa 5×10^7 pg/ml und damit um sechs Zehnerpotenzen höher als der Nullwert. Vergleicht man ihn mit der IL-12 Konzentration in den Überständen von Y1-Zellen bei Transduktion mit 100 m.o.i., die bei



(a) Graphische Darstellung der IL-12 Produktion

m.o.i.	IL-12 ohne DC (a)	IL-12 mit DC (b)	Suppression (a/b)
100	52954003,06	2425397,95	21,83
10	35485126,25	34440,02	1030,35
1	1076734,96	1087,64	989,97
0,1	43859,21	115,24	380,59

(b) Kalkulation des Suppressionsfaktors der IL-12 Produktion durch Doxycyclin

Abbildung 4.2: IL-12 Produktion von mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierten HT29-Zellen +/- Doxycyclin

ca. 8×10^4 pg/ml liegt, kommt eine Differenz von drei Zehnerpotenzen zum Tragen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Zahlen nicht direkt vergleichbar sind, da die m.o.i. zwar gleich waren, nicht jedoch die ausgesäte Zellzahl. In 1 ml Medium der 350.000 Y1-Zellen wäre eine höhere IL-12 Konzentration zu erwarten gewesen als in 1 ml HT29-Medium von 300.000 Zellen. Daher ist der Unterschied von drei Zehnerpotenzen noch eher als zu gering bemessen anzusehen. Weiterhin ist in der Graphik die Regulierbarkeit der IL-12 Expression von HT29-Zellen zu erkennen. Bei 100 m.o.i. ist die IL-12 Konzentration in den Proben mit Doxycyclin um den Faktor 22 niedriger als ohne das Antibiotikum, was einer Abnahme um 95% entspricht. Bei 10 m.o.i. sind es 99,9% (Faktor 1030), bei 1 m.o.i. ebenfalls 99,9% (Faktor 990) und bei 0,1 m.o.i. 99,7% (Faktor 381) (s. Abbildung 4.2(b)). Die Supprimierung durch Doxycyclin ist also als noch stärker einzustufen als bei Y1-Zellen.

Auffallend an der Graphik ist ferner ein Plateau, das sich bei den Werten von 10 bzw. 100 m.o.i. ohne Doxycyclin zeigt. Es findet trotz höherer Virusmenge kein nennenswerter Anstieg der IL-12 Produktion statt. Dagegen steigt der Wert mit Doxycyclin weiter an. Dieses Phänomen lässt sich durch einen Sättigungseffekt erklären. Die HT29-Zellen erreichen bei 100 m.o.i. ihre maximale Produktionskapazität. Da durch Doxycyclin die Expression des IL-12 Gens gesenkt wird, ist hier noch nicht die maximale mögliche Zytokinproduktion erreicht und IL-12 wird in den Überstand ausgeschleust. Für noch höhere m.o.i. wäre eine weitere Annäherung beider Säulen zu erwarten, die dann auf einem Niveau verharren würden. Bei den Y1-Zellen tritt dieser Effekt auch bei der m.o.i. von 1000 nicht auf, was zeigt, dass ihre maximale Produktionskapazität nicht erreicht ist und sie durch höhere m.o.i. dazu in der Lage wären mehr IL-12 zu

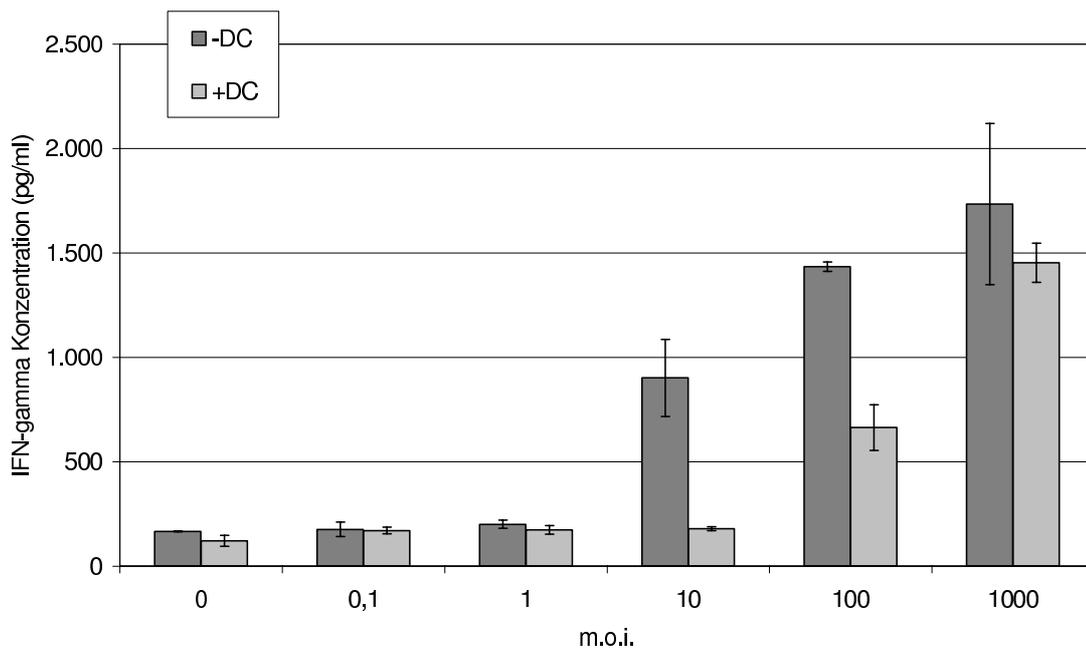


Abbildung 4.3: Interferon- γ Produktion von mit IL-12 stimulierten murinen Lymphozyten

sezernieren. Das ist in Anbetracht ihrer im Vergleich zu HT29-Zellen viel geringeren Transgenexpression bei gleicher m.o.i. nicht überraschend.

Es ist zusammenfassend festzustellen, dass Y1-Zellen nach Transduktion mit Ad.3r-mscIL-12 weniger IL-12 produzieren und eine geringere Suppression durch Doxycyclin zeigen als HT29-Zellen. Bei Verwendung höherer Virusmengen besteht hinsichtlich der produzierten IL-12 Menge jedoch wahrscheinlich noch Kapazität nach oben.

4.1.3 Analyse der Bioaktivität des produzierten Interleukin-12

Im Bioassay wurde die Fähigkeit des durch mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierte Y1-Zellen produzierten IL-12 getestet, die IFN- γ Produktion von murinen Lymphozyten zu stimulieren. Dies geschieht durch Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor auf den Zellen, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die im Zellkern die Transkription des IFN- γ Gens fördert. Es steht stellvertretend für andere in vivo Effekte von IL-12 und soll beweisen, dass durch den Vektor Ad.3r-mscIL-12 transduzierte Y1-Zellen biologisch aktives IL-12 produzieren.

Murine Lymphozyten wurden aus einer Mäusemilz gewonnen und in Kultur gebracht. Die Lymphozyten wurden in ihrem Wachstum für 18 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin sowie $5 \times 10^{-6}\text{M}$ TPA stimuliert. Im eigentlichen Versuchsansatz wurden jeweils 40.000 Zellen mit 25 μl Medium aus den Überständen von mit unterschiedlichen m.o.i. von Ad.3r-mscIL-12 stimulierten Y1-Zellen zusammen für 24 h inkubiert. Pro m.o.i. gab es drei Ansätze aus Proben mit und drei ohne Doxycyclin. Am nächsten Tag fand die Ernte der Überstände statt, aus denen die Bestimmung des IFN- γ Gehalts mithilfe eines IFN- γ -ELISAs durchgeführt wurde. Die graphische Auswertung dieser Daten ist in Abbildung 4.3 zu sehen.

Es wird ein dosisabhängiger Anstieg der IFN- γ Konzentration in den Überständen von murinen Lymphozyten deutlich. Mehr IL-12 führt zu einer höheren IFN- γ Produktion. Zwischen 0 und 1000 m.o.i. ist ein Anstieg um ca. eine Zehnerpotenz zu verzeichnen. Deutlich wird auch, dass die Proben, in denen der IL-12 Gehalt aufgrund des Abschaltens durch Doxycyclin niedriger ist, ebenfalls eine niedrigere IFN- γ

Antwort bewirken. Zu erwähnen ist weiterhin, dass in der Graphik ein Sättigungseffekt deutlich wird. Der Anstieg der IFN- γ Produktion ist besonders stark zwischen 1 und 10 m.o.i., dagegen aber zwischen 100 und 1000 m.o.i. nur gering. Ferner ist kaum ein Unterschied zwischen der Probe mit und ohne Doxycyclin zu erkennen. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Lymphozyten schon bei 100 m.o.i. beinahe maximal stimuliert sind und eine höhere Menge an IL-12 kaum eine weitere Stimulation bewirkt, so dass sich die Säulen annähern. Lägen Werte in geringeren Intervallen zwischen 10 und 1000 m.o.i. vor, könnte dieser Effekt noch genauer verfolgt werden.

Es wurde in diesem Versuch deutlich, dass das IL-12, das durch mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierte Y1-Zellen produziert wurde, in der Lage ist eine dosisabhängige Stimulation von murinen Lymphozyten herbeizuführen.

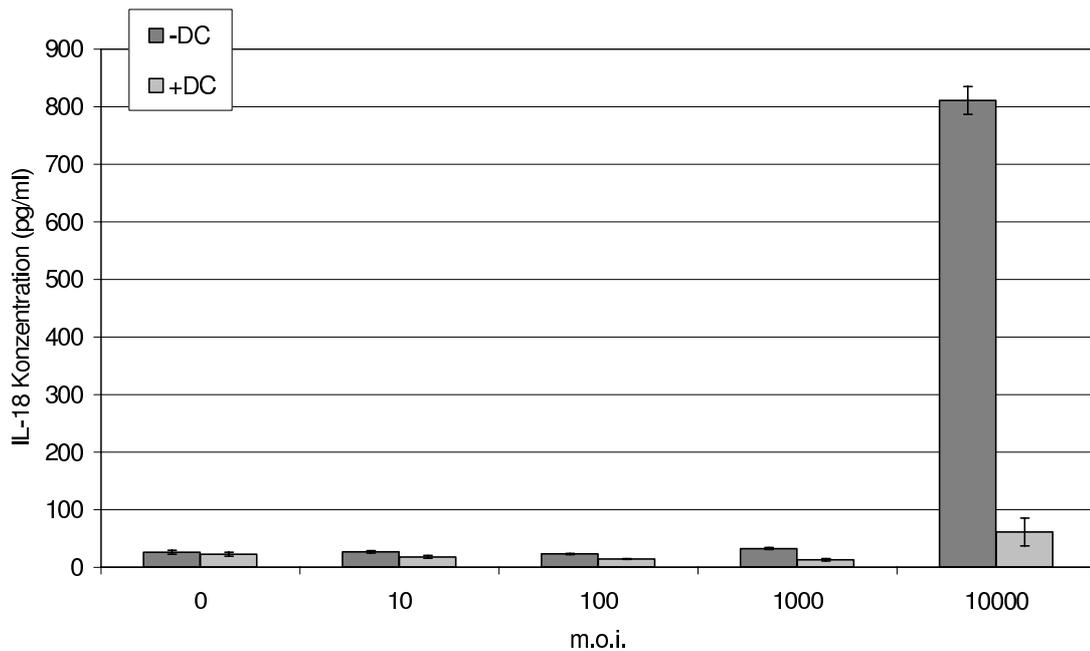
4.1.4 Analyse der Transduzierbarkeit von Y1-Zellen mit Ad.3r-mIL-18

Interleukin-18 ist ein weiteres Zytokin, das antitumorale Wirkungen besitzt und viele seiner Effekte in Synergie mit IL-12 ausübt. Es wurde in unserem Labor als Transgen unter dem gleichen Promotor in das gleiche Adenovirus eingebracht, das auch als Vektor für IL-12 dient. In diesem Versuchsteil sollte überprüft werden, ob Y1-Zellen mit dem IL-18 Vektor zu transduzieren sind und das Transgen durch Doxycyclin regulierbar exprimieren.

Y1-Zellen wurden zu 300.000 Zellen pro Well auf 12-Well-Platten mit Virusverdünnungen des Adenovirus Ad.3r-mIL-18 von 10 bis 10.000 m.o.i. transduziert. Bei der Hälfte der Ansätze wurden 2 μ g Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der virushaltige Überstand gründlich abgesaugt und durch 1 ml tetracyclinfreies Komplettmedium +/- Doxycyclin ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 48 h. Anschließend wurden die Überstände geerntet und aus ihnen die IL-18 Konzentration mithilfe eines IL-18-ELISAs bestimmt. Die Auswertung ist Abbildung 4.4 zu entnehmen.

Abbildung 4.4(a) zeigt ein deutlich anderes Bild im Vergleich zur IL-12 Produktion nach Transduktion von Y1-Zellen mit Ad.3r-mscIL-12. Erst bei 10.000 m.o.i. ist ein eindeutiger Anstieg der IL-18 Konzentration im Überstand auf 800 pg/ml zu verzeichnen. Es handelt sich um eine Zunahme um etwa den Faktor 30 bezogen auf 0 m.o.i. Eine Supprimierung durch Doxycyclin bei der höchsten m.o.i. ist klar ersichtlich. Sie entspricht einer Abnahme um 92%, bzw. Faktor 13. Bei 1000 m.o.i. beträgt die Suppression noch 59,8% (Faktor 2), bei 100 m.o.i. 38,1% (Faktor 2), bei 10 m.o.i. 33,0% (Faktor 2) (s. Abbildung 4.4(b)). Es ist ganz deutlich, dass dieser Vektor trotz gleichem Promotor und gleichem Virus in Y1-Zellen sehr viel weniger effektiv ist als Ad.3r-mscIL-12. Bei 1000 m.o.i., welches die höchste getestete Virusmenge im Versuch mit Ad.3r-mscIL-12 war (siehe Abschnitt 4.1.1), konnten bereits hohe Zytokinkonzentrationen im Überstand festgestellt werden, wohingegen mit Ad.3r-mIL-18 kein eindeutiger Anstieg zu verzeichnen ist. Über einen Anstieg der IL-18 Konzentrationen bei noch höheren m.o.i. lässt sich spekulieren, der Verbrauch an Adenoviren wäre jedoch immens und in vivo sind so hohe m.o.i. nicht praktikabel.

Es ist festzustellen, dass Ad.3r-mscIL-18 Y1-Zellen transduzieren kann, diese IL-18 produzieren und durch Doxycyclin supprimierbar sind. Der Effekt ist jedoch nur bei einer hohen m.o.i. erkennbar, so dass der Vektor im Vergleich zu Ad.3r-mscIL-12 ineffizienter ist.



(a) Graphische Darstellung der IL-18 Produktion

m.o.i.	IL-18 ohne DC (a)	IL-18 mit DC (b)	Suppression (a/b)
10000	811,14	61,24	13,25
1000	32,75	13,16	2,49
100	23,26	14,39	1,62
10	26,94	18,06	1,49

(b) Kalkulation des Suppressionsfaktors der IL-18 Produktion durch Doxycyclin

Abbildung 4.4: IL-18 Produktion von mit Ad.3r-mIL-18 transduzierten Y1-Zellen +/- Doxycyclin

4.1.5 Vergleich der Interleukin-18 Produktion von Y1-Zellen mit HT29-Zellen

Besonders aufgrund der Daten der Transduktion von Y1-Zellen mit Ad.3r-mIL-18 ist ein Vergleich mit einer anderen Zelllinie interessant, um Hinweise zu erhalten, ob die schlechte Transduktionseffizienz auf die Zelllinie oder den Vektor zurückzuführen ist. Dazu wurden in Analogie zum oben beschriebenen Versuch mit Ad.3r-mIL-12 HT29-Zellen verwendet.

Sie wurden ebenfalls zu 300.000 Zellen pro Well auf 12-Well-Platten mit Virusverdünnungen des Adenovirus Ad.3r-mIL-18 von 10 bis 10.000 m.o.i. transduziert, wobei die Hälfte der Wells mit Doxycyclin versetzt wurde. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium +/- Doxycyclin ersetzt. Während der Inkubation für 48 h sollten die Zellen IL-18 produzieren, was im Nachhinein aus den Überständen mithilfe eines IL-18-ELISAs bestimmt wurde. Die Auswertung ist in Abbildung 4.5 zu sehen.

Das Ergebnis fällt ähnlich enttäuschend aus wie das der Y1-Zellen. Erst bei 1000 m.o.i. ist ein Anstieg der IL-18 Konzentration zu verzeichnen, vorher ist kein Ausschlag messbar. Ein Anstieg der Transgenexpression zwischen 1000 und 10.000 m.o.i. ist zu sehen. Die Konzentrationen liegen aber noch niedriger als die bei Y1-Zellen: sehr knapp für 1000 m.o.i. mit 27,6 pg/ml für HT29 und 32,8 pg/ml für Y1, aber deutlicher für 10.000 m.o.i. mit 263,3 pg/ml für HT29 und 811,1 pg/ml für Y1. Eine Supprimierbarkeit durch Doxycyclin kann bei 1000 und 10.000 m.o.i. festgestellt werden.

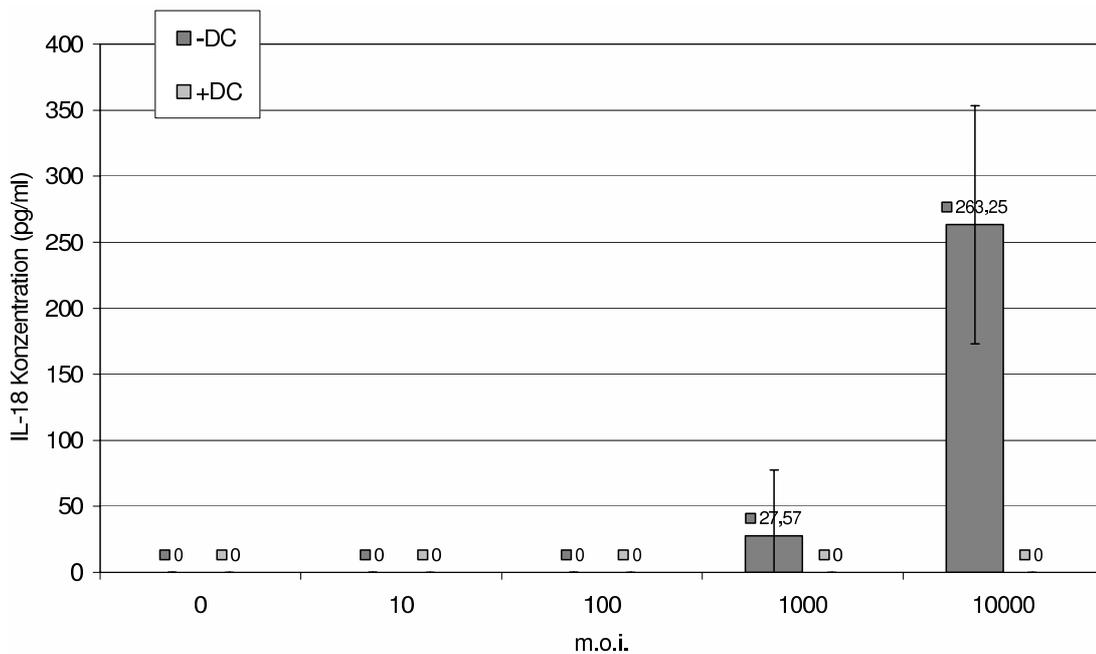


Abbildung 4.5: IL-18 Produktion von mit Ad.3r-mIL-18 transduzierten HT29-Zellen +/- Doxycyclin

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die schlechte Transduktionseffizienz durch Ad.3r-mIL-18 auf den Vektor selbst und nicht auf die Zelllinie zurückzuführen ist. Bei erhaltener Transduzierbarkeit und Regulierbarkeit durch Doxycyclin ist die Effizienz zelllinienunabhängig deutlich schlechter als die von Ad.3r-mscIL-12.

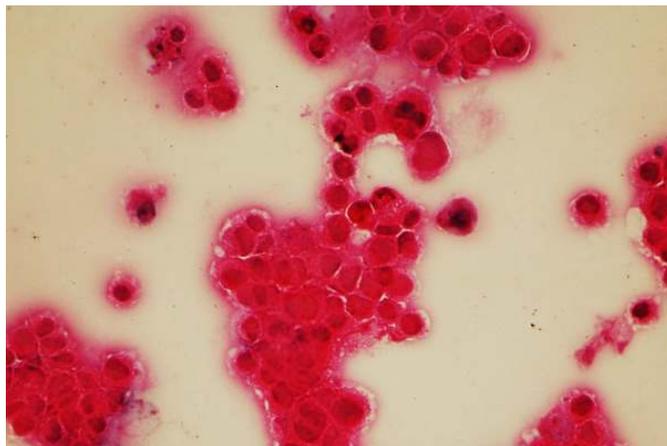
4.2 Ergebnisse mit humanen Nebennierenkarzinomzellen

Über die Transduzierbarkeit der humanen adrenokortikalen Zelllinie NCI-H295 mit Adenoviren war wenig bekannt. Zunächst wurde daher ein qualitativer Versuch mit dem Vektor Ad.RSV- β -Gal unternommen, um die Transduzierbarkeit zu testen und vergleichend die Morphologie der Zellen in der H.E. Färbung dargestellt. Im nächsten Schritt erfolgte die Transduktion der Zellen mit einem Vektor des 3r-Systems. Dazu wurde Ad.3r-luc gewählt, der das Transgen Luciferase exprimiert. Nach einem weniger umfangreichen Vorversuch folgte der Hauptversuch mit mehreren m.o.i. mit und ohne Doxycyclin und ein kleinerer Nachversuch. Als letztes wurde die Transduzierbarkeit von NCI-H295 Zellen mit Ad.3r-hscIL-12 untersucht, der für die humane Variante des Zytokins IL-12 kodiert.

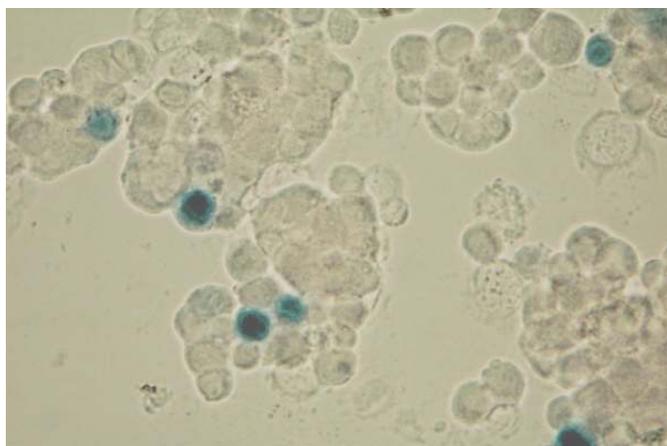
4.2.1 Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.RSV- β -Gal

Da keine Hinweise zu finden waren, ob NCI-H295-Zellen schon jemals erfolgreich mit einem Adenovirus transduziert worden waren, wurde zunächst ein Reportergen verwendet, um eine qualitative Aussage über die Transduzierbarkeit der Zelllinie zu treffen. Es wurde das Gen für β -Galaktosidase ausgewählt, welches in unserer Arbeitsgruppe als Transgen eines Adenovirus vorliegt. β -Galaktosidase spaltet das Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktosid (OPNG) in o-Nitrophenol und Galaktose, wodurch es zu einem sichtbaren blauen Farbumschlag kommt.

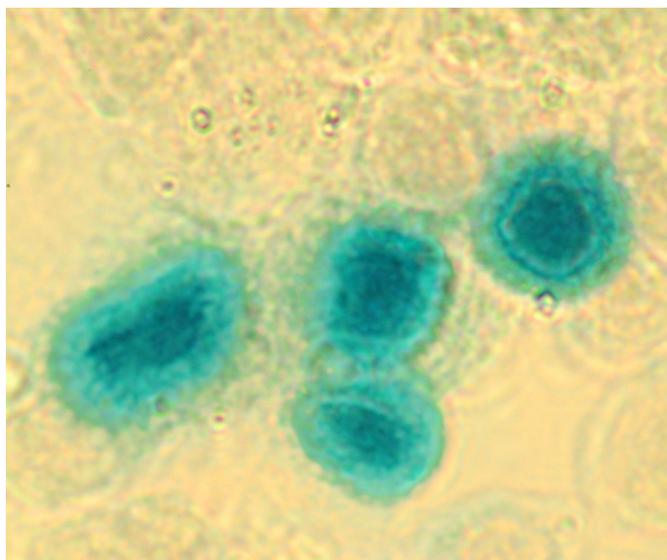
Da kein Protokoll zur Färbung in Suspension wachsender Zelllinien vorlag, wurde das vorhandene so abgewandelt, dass es auf diese Kultur anwendbar war. Dazu wurden zunächst 1 Mio. Zellen pro



(a) H.E., 1:40



(b) X-Gal, 1:40



(c) X-Gal, 1:100

Abbildung 4.6: Photos von NCI-H295-Zellen gefärbt mit H.E. und nach Transduktion mit Ad.RSV- β -Gal und X-Gal-Färbung. Digitalkamera Modell D70 von Nikon.

Well in einer 24-Well-Platte mit 200 m.o.i. des Virus Ad.RSV- β -Gal transduziert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das virushaltige Medium wurde entfernt und die Ansätze für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Zellsuspension in Reaktionsgefäßen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der kritische Punkt war, die in Suspension wachsenden Zellen auf einem Objektträger zu fixieren. Dazu erfolgte zunächst eine Resuspension in 40 μ l RPMI. Dieses Volumen wurde auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Den Zellen wurde Zeit gegeben anzutrocknen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 5% Glutaraldehyd, eine erneute Trocknung und ein Waschvorgang mit PBS. Die Objektträger wurden mit X-Gal-Färbelösung überschichtet und für ca. 5 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnte die von den Zellen produzierte β -Galaktosidase ihr Substrat OPNG spalten und der Farbumschlag fand statt. Um diesen festzustellen, wurden die Objektträger unter dem Durchlichtmikroskop bei unterschiedlichen Vergrößerungen betrachtet und das Ergebnis in Form von Photos festgehalten.

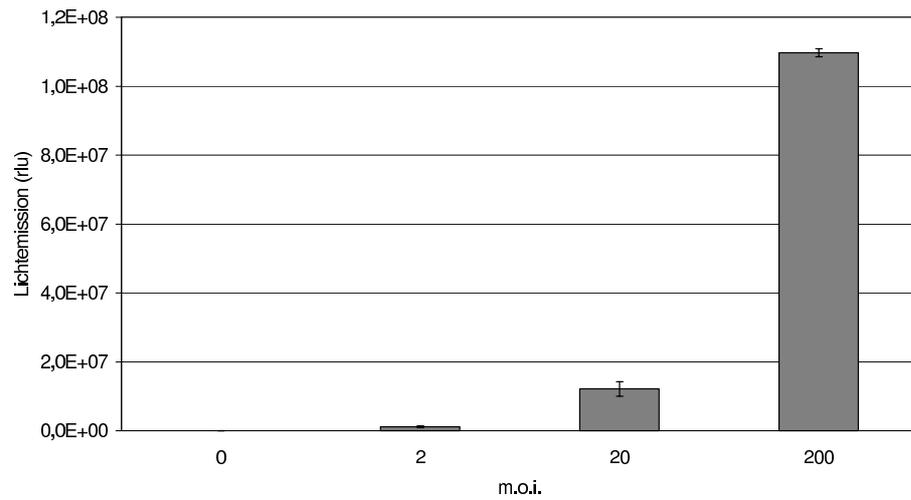
Abbildung 4.6 zeigt zwei Photos, 4.6(b) in der 40er und 4.6(c) in der 100er Vergrößerung, welche Ausschnitte des gesamten Objektträgers darstellen. Es sind blau leuchtende Zellen zu erkennen, was bedeutet, dass NCI-H295-Zellen mit Ad.RSV- β -Gal transduzierbar sind. Dies war die Basis für weitere Versuche mit anderen Adenoviren und ließ hoffen, dass auch das 3r-System auf diese Zelllinie anzuwenden ist. Einschränkend ist zu sagen, dass aufgrund der Fotos keine quantitativen Aussagen hinsichtlich der Transduktionseffizienz im Sinne eines Auszählens transduzierter und nicht-transduzierter Zellen durchzuführen war, wie es vorher geplant war. Die Fixierung auf den Objektträger war schwierig und es ist davon auszugehen, dass während der Wasch- und Färbeprozesse etliche Zellen verlorengegangen sind. Daher lagen die Zellen bei den Photos auch eher verstreut voneinander sowie in zusammenhängenden Klumpen, was ihrer Morphologie in Kultur entspricht. Da also eher wenige Zellen nach der Fixierung übrigblieben und nicht mit Sicherheit postuliert werden konnte, dass transduzierte und nicht-transduzierte Zellen zu gleichen Zahlen verloren gingen, wurde auf das vergleichende Auszählen verzichtet, zumal ein positives Ergebnis im Sinne der Transduzierbarkeit der Zellen vorlag.

Vergleichend zur Morphologie der Zellen nach der X-Gal-Färbung sollten sie mithilfe einer Standardfärbung dargestellt werden. Es wurde die H.E. Färbung gewählt. Die Durchführung erfolgte nach gängigen Protokollen, jedoch wieder mit der Einschränkung, dass sie auf in Suspension wachsende Zellen angepasst werden mussten. Das Ergebnis ist Abbildung 4.6(a) zu entnehmen. Es stellte sich unter dem Mikroskop sehr ähnlich dar wie das Bild mit X-Gal. Die Zellen lagen weit verstreut und in Klumpen. Die Klumpenbildung ist sehr typisch für diese Zellen. Ferner sind schön die großen Zellkerne maligner Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation zu erkennen. Insgesamt stimmte dieser Versuch positiv für die weiteren Arbeiten mit der Zelllinie NCI-H295.

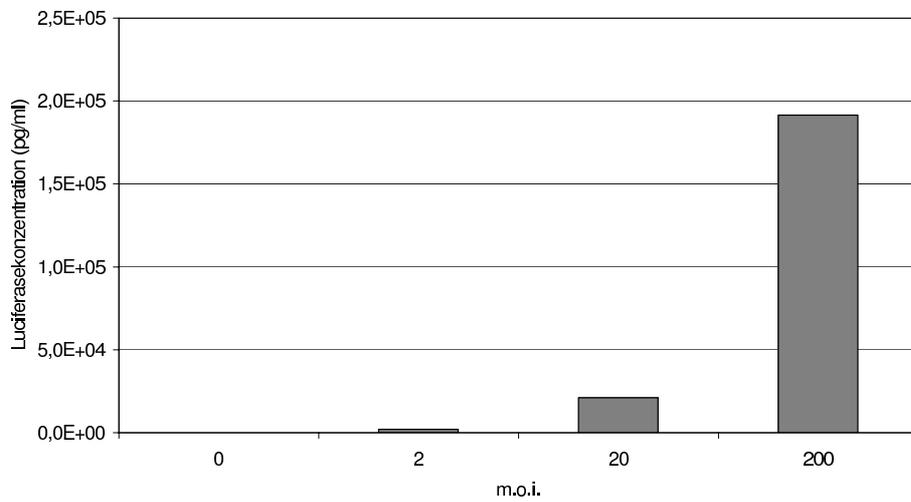
4.2.2 Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.3r-luc

Nach den ermutigenden qualitativen Ergebnissen der NCI-H295-Zelllinie mit einem adenoviralen Vektor sollte nun ein Vertreter des 3r-Systems getestet werden: Ad.3r-luc. Er exprimiert das häufig verwendete Reportergen Luciferase, das natürlicherweise in Glühwürmchen, Leuchtkäfern und Leuchtbakterien vorkommt und Luciferin unter Lichtemission zu Oxyluciferin und CO₂ decarboxyliert, was im Lumino-meter in Form von Lichtemission, gemessen in relativen Lichteinheiten (rlu), festgestellt werden kann.

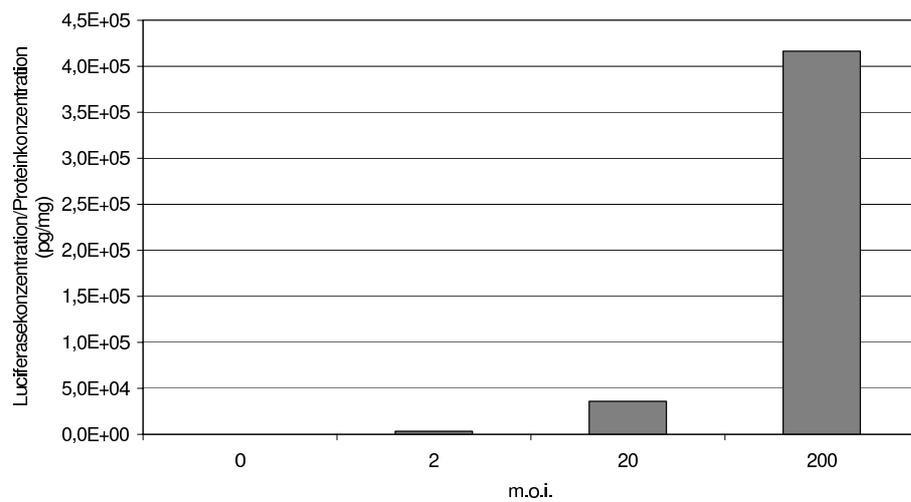
Für den Versuch wurden in einer 96-Well-Platte 500.000 Zellen pro Well ausgesät und verschiedene m.o.i. des Virus Ad.3r-luc hinzugefügt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das virushaltige Medium entfernt und die Zellen mit frischem Medium in 24-Well-Platten für 24 h



(a) Lichtemission (rlu)

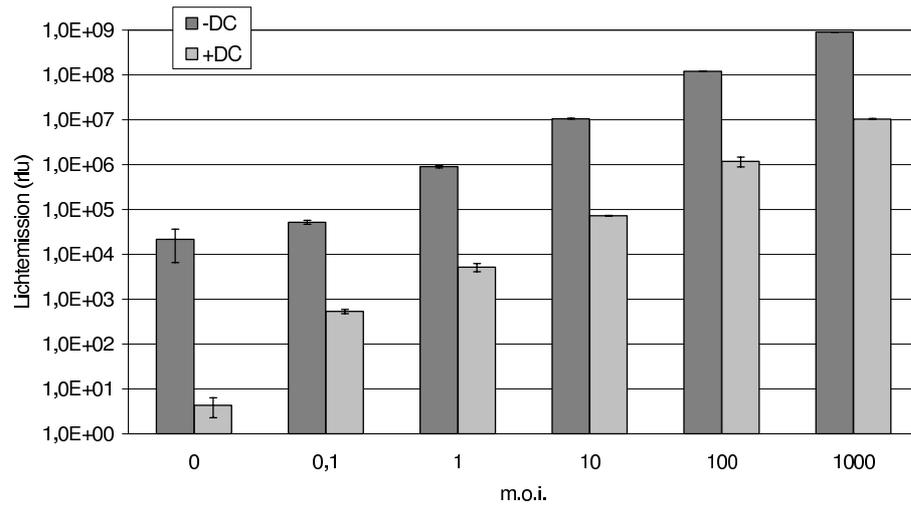


(b) Luciferasekonzentration

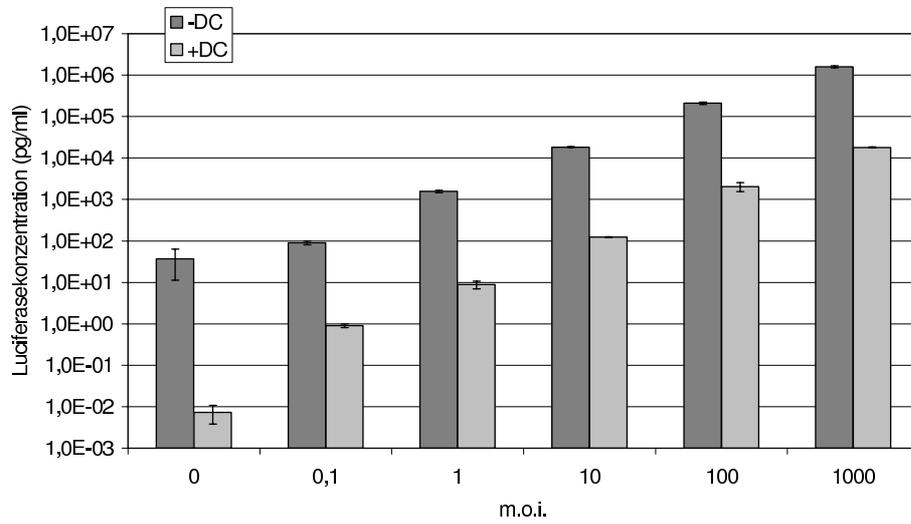


(c) Luciferasekonzentration bezogen auf Gesamteproteinkonzentration

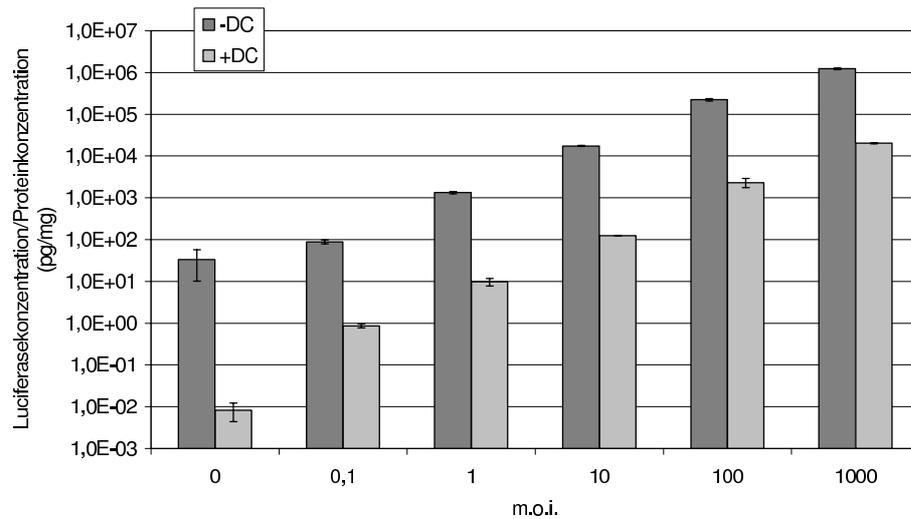
Abbildung 4.7: Vorversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen



(a) Lichtemission (rlu)

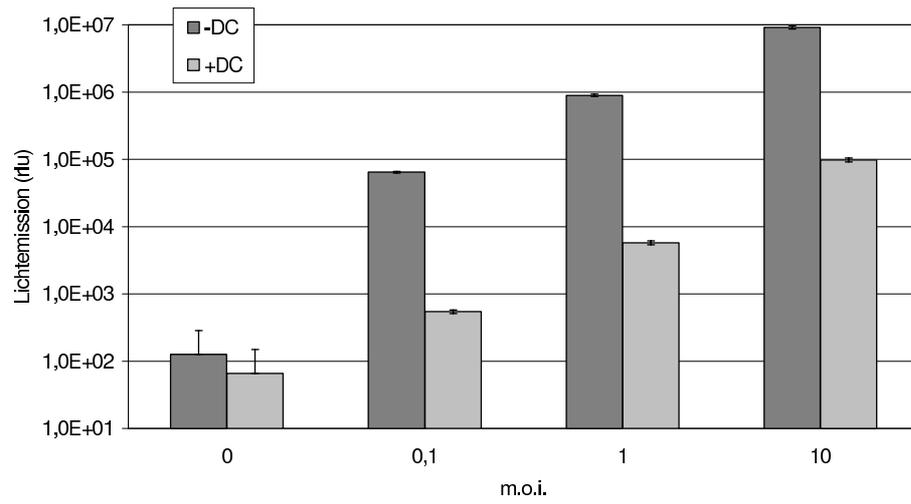


(b) Luciferasekonzentration

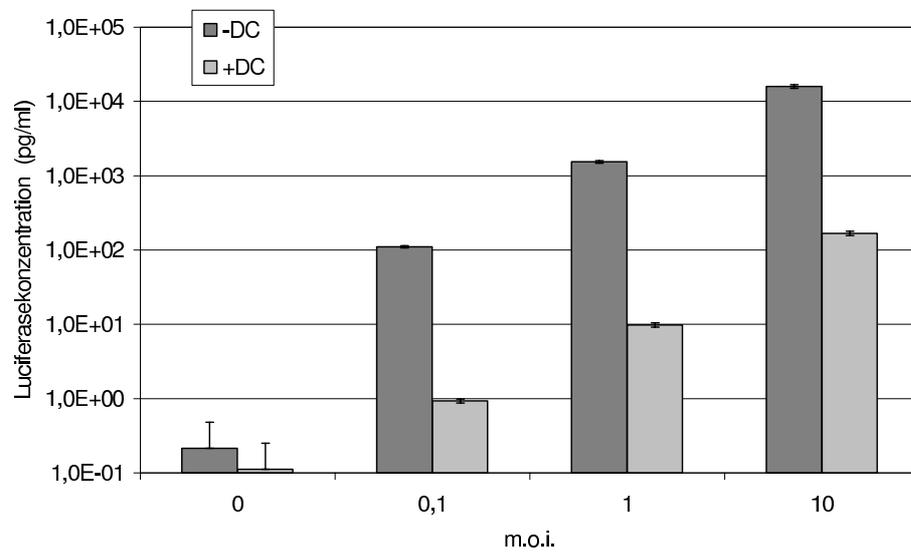


(c) Luciferasekonzentration bezogen auf Gesamtproteinkonzentration

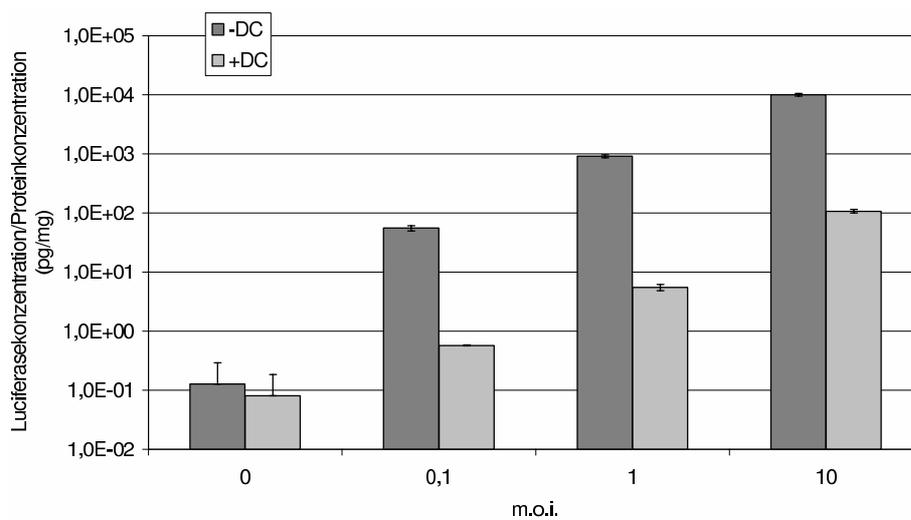
Abbildung 4.8: Hauptversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen +/- Doxycyclin



(a) Lichtemission (fluorescence)



(b) Luciferasekonzentration



(c) Luciferasekonzentration bezogen auf Gesamtproteinkonzentration

Abbildung 4.9: Nachversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen +/- Doxycyclin

bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet und in 1x CCLR-Puffer lysiert, was zur Freisetzung des Luciferaseenzym führte. Aus den Zelllysaten wurde die Luciferase als Lichtemission in Form von rlu sowie das Gesamtprotein bestimmt. Aus der Lichtemission konnte mithilfe einer Formel die Luciferasekonzentration in pg/ml errechnet werden. Diese wurde in unserem Labor an dem auch in dieser Arbeit verwendeten Luminometer auf der Basis einer Messreihe bekannter Luciferasekonzentrationen erstellt, die graphisch gegen die gemessenen Lichtemissionen aufgetragen wurden. Daraus ergab sich ein Verhältnis zwischen Lichtemission l und Luciferasekonzentration c , welches durch die Formel

$$c = (0.0017 l)^{1.0022}$$

ausgedrückt wird. Durch Einsetzen des gemessenen Emissionswertes erhielt man die Luciferasekonzentration in pg/ml. Diese wurde in einem weiteren Schritt in Bezug zur Proteinkonzentration gesetzt (Luciferasekonzentration in pg pro ml / Gesamtproteinkonzentration in μg pro ml), welche aus den gleichen Zelllysaten mithilfe des BCA Protein Assays der Firma Pierce bestimmt wurde. Auf diese Weise kamen für jeden Versuchsansatz mit Ad.3r-luc drei graphische Auswertungen mit unterschiedlichen Ordinateneinheiten zustande: die reine Luciferaseaktivität gemessen in rlu, die Luciferasekonzentration in pg/ml errechnet mithilfe der Formel sowie die Luciferasekonzentration bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration in pg/mg. Durch den Bezug auf das Zellprotein konnten Schwankungen ausgeglichen werden, welche eventuell nicht durch eine erhöhte Luciferaseproduktion einzelner Zellen selbst, sondern durch eine unterschiedliche Anzahl wirklich transduzierter Zellen zustande kam. Auf diese Weise wurde das Ergebnis genauer.

In einem Vorversuch wurden zunächst nur vier m.o.i. (0, 2, 20, 200) des Adenovirus Ad.3r-luc ohne Zusatz von Doxycyclin verwendet, um die Transduzierbarkeit mit diesem Virus zu testen. Das Ergebnis ist der Abbildung 4.7 zu entnehmen. Abbildung 4.7(a) zeigt die Messung der rlus. Es wird ein dosisabhängiger Anstieg der Lichtemission in Abhängigkeit zur verwendeten m.o.i. deutlich. NCI-H295-Zellen sind also mit Ad.3r-luc transduzierbar. Auch nach Umrechnung in Luciferasekonzentration (Abbildung 4.7(b)) und Bezug auf das Gesamtprotein (Abbildung 4.7(c)) bleibt das Ergebnis bestehen.

Daraufhin wurde der Hauptversuch mit den m.o.i. von 0/0,1/1/10/100/1000 in jeweils sechs Versuchsansätzen durchgeführt, davon drei mit und drei ohne Zusatz von 2 μg Doxycyclin pro ml Medium. Das Ergebnis der graphischen Auswertung zeigt Abbildung 4.8. In allen drei Graphiken wird wiederum ein dosisabhängiger Anstieg von Luciferase in den transduzierten Zellen deutlich. Zusätzlich ist festzustellen, dass dieser durch Doxycyclin supprimierbar ist: Bei 1000 m.o.i. um den Faktor 61, was einer Abnahme von 98,4% entspricht. Bei 100 m.o.i. sind es 99,0% (Faktor 96), bei 10 m.o.i. 99,3% (Faktor 140), bei 1 m.o.i. 99,3% (Faktor 136) und bei 0,1 m.o.i. 99,0% (Faktor 103) (s. auch Tabelle 4.1). Was allerdings verwunderte, war die hohe Luciferasebildung in der Negativkontrolle, die ebenfalls durch Doxycyclin supprimierbar war. Das war ein eindeutiger Hinweis auf eine Kontamination der Nullprobe mit Ad.3r-luc. Da die gewonnenen Daten ansonsten aber sehr aussagekräftig sind, wurden sie trotzdem in diese Dissertation aufgenommen.

Um zu beweisen, dass es sich bei der erhöhten Luciferase in der Negativkontrolle um einen Fehler handelte, wurde der Versuch wiederholt, allerdings in einem kleineren Umfang unter Verwendung der m.o.i. 0/0,1/1 und 10. Die beiden höchsten Stufen wurden gespart, da ein solcher Versuch immer einen hohen Virusverbrauch darstellt. Ansonsten wurde in gleicher Weise wie beim Hauptversuch vorgegangen, mit besonderem Augenmerk auf mögliche Kontaminationsquellen. Das Ergebnis gab den Ver-

m.o.i.	Luc/Prot ohne DC (<i>a</i>)	Luc/Prot mit DC (<i>b</i>)	Suppression (<i>a/b</i>)
1000	1227356,81	20185,59	60,80
100	222940,84	2314,15	96,34
10	17333,17	124,02	139,76
1	1333,49	9,78	136,35
0,1	88,36	0,86	102,74

Tabelle 4.1: Kalkulation des Suppressionsfaktors der Luciferaseproduktion durch Doxycyclin auf Grundlage der Daten aus dem Hauptversuch nach Bezug auf das Gesamtprotein

mutungen recht und ist in Abbildung 4.9 zu betrachten. Der Nullwert fällt deutlich geringer aus und eine Supprimierbarkeit ist innerhalb der üblichen Schwankungen ebenfalls nicht festzustellen. Besonders hervorzuheben ist, dass die Werte für 0,1/1 und 10 m.o.i. sowohl ohne als auch mit Doxycyclin im Zusatzversuch und im Hauptversuch sehr gut übereinstimmen, was zusätzlich dazu führte den Daten aus dem Hauptversuch hinsichtlich ihrer Genauigkeit zu trauen.

Zusammenfassend kann aus diesen Versuchsteilen geschlossen werden, dass NCI-H295-Zellen durch das Virus Ad.3r-luc transduzierbar sind, die produzierte Luciferasemenge dosisabhängig ansteigt und durch Doxycyclin zu supprimieren ist.

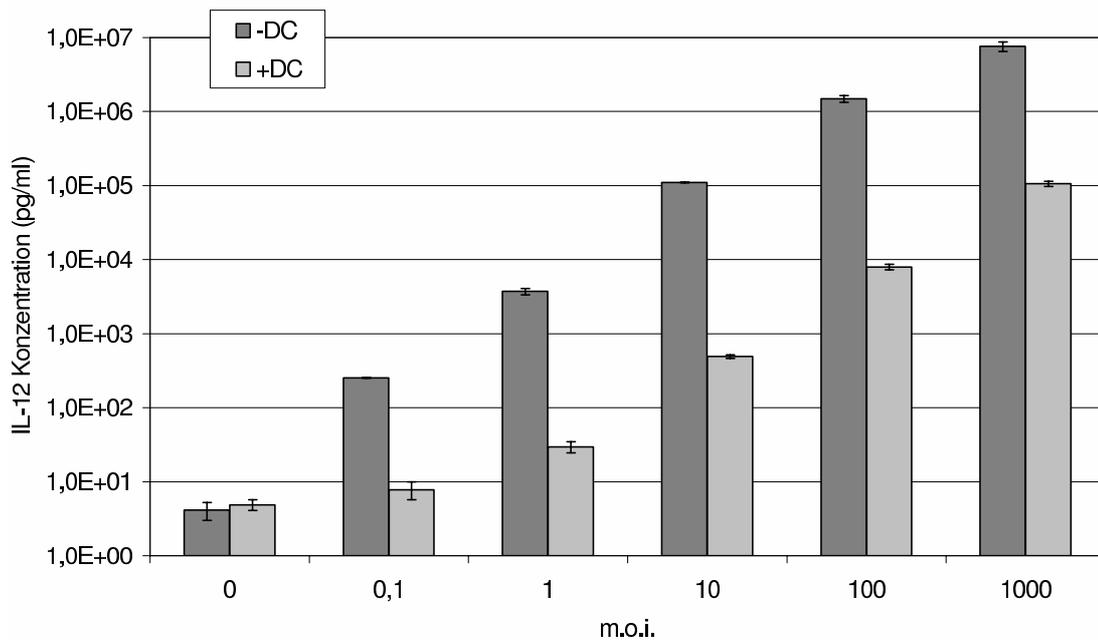
4.2.3 Analyse der Transduzierbarkeit von NCI-H295-Zellen mit Ad.3r-hscIL-12

Im letzten Versuchsteil mit der Zelllinie NCI-H295 sollte nun ein Vektor des 3r-Systems getestet werden, der das therapeutische Transgen IL-12 in seiner humanen Variante exprimiert. Zu diesem Zweck wurden wiederum Transduzierbarkeit, dosisabhängige Steigerung der IL-12 Produktion und Suppression durch Doxycyclin evaluiert.

Dazu wurden in einer 96-Well-Platte 500.000 Zellen pro Well mit 0,1 bis 1000 m.o.i. des Virus Ad.3r-hscIL-12 für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das virushaltige Medium entfernt und die Zellen in 0,5 ml frischem Medium in 24-Well-Platten überführt. Zu der Hälfte der Zellen, die auch vorher schon mit dem Antibiotikum kultiviert worden war, wurden 2 µg Doxycyclin pro ml Medium hinzugefügt, um die IL-12 Produktion zu hemmen. Alle Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium geerntet und mithilfe eines IL-12-ELISAs auf die Konzentration des Zytokins untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse ist Abbildung 4.10 zu entnehmen.

Das Bild der Abbildung 4.10(a) ist dem aus oben beschriebenen Versuchen sehr ähnlich. Es ist eine m.o.i. abhängige Steigerung der IL-12 Produktion von NCI-H295-Zellen zu sehen. Der Maximalwert liegt bei etwa 8×10^6 und damit um mehr als sechs Zehnerpotenzen höher als der Nullwert. Die Transgenexpression ist durch Doxycyclin supprimierbar. Bei 1000 m.o.i. ist die IL-12 Produktion bei Zugabe des Antibiotikums um den Faktor 72 niedriger, das entspricht einer Abnahme um 98,6%. Bei 100 m.o.i. sind es 99,5% (Faktor 187), bei 10 m.o.i. 99,6% (Faktor 224), bei 1 m.o.i. 99,2% (Faktor 126) und bei 0,1 m.o.i. 96,9% (Faktor 32) (s. auch Abbildung 4.10(b)).

Das bedeutet, dass der Vektor Ad.3r-hscIL-12, der das humane IL-12 exprimiert und damit für die Anwendung am Menschen geeignet ist, NCI-H295-Zellen in vitro erfolgreich transduziert, sein Transgen dosisabhängig exprimiert und durch Doxycyclin supprimierbar ist.



(a) Graphische Darstellung der IL-12 Produktion

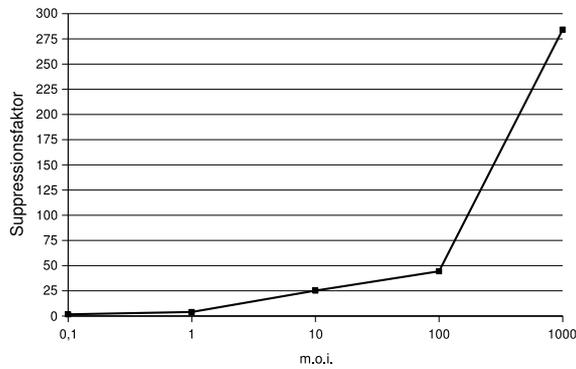
m.o.i.	IL-12 ohne DC (a)	IL-12 mit DC (b)	Suppression (a/b)
1000	7629385,50	105675,92	72,20
100	1488710,55	7957,15	187,09
10	110124,20	490,77	224,39
1	3714,61	29,53	125,79
0,1	252,18	7,81	32,29

(b) Kalkulation des Suppressionsfaktors der IL-12 Produktion durch Doxycyclin

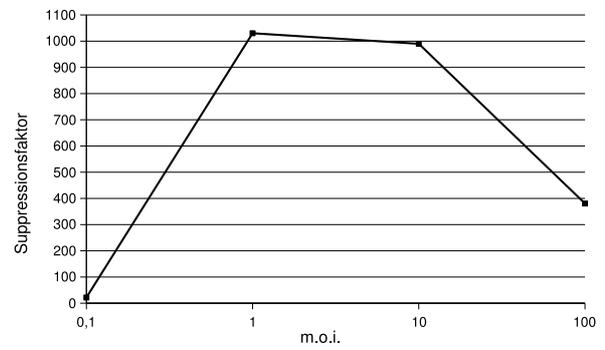
Abbildung 4.10: IL-12 Produktion von mit Ad.3r-hscIL-12 transduzierten NCI-H295-Zellen +/- Doxycyclin

4.2.4 Vergleich der Supprimierbarkeit in Abhängigkeit von m.o.i. und Zelllinie

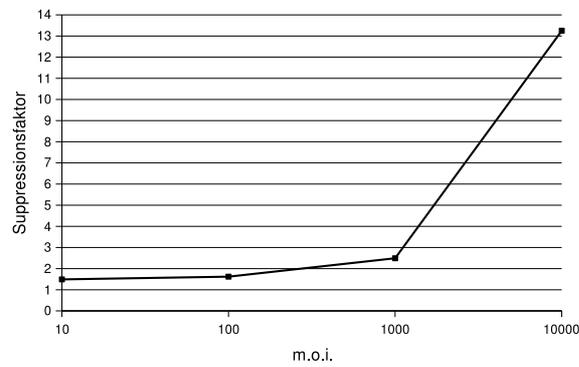
Für alle Versuche ist der Suppressionsfaktor als Maß für die Supprimierbarkeit den entsprechenden Tabellen zu entnehmen. Er errechnet sich aus dem Quotient der Transgenexpression ohne DC und der Transgenexpression mit DC. Trägt man die Suppressionsfaktoren gegen die zugehörigen viralen m.o.i. auf, ergibt sich das Bild der Abbildung 4.11. Mit steigender m.o.i. und dementsprechend steigender Transgenexpression, nimmt die Supprimierbarkeit zu, irgendwann erreicht sie ein Plateau, um bei hoher Transgenexpression wieder abzufallen. Die Graphen 4.11(a) und 4.11(c), in denen lediglich ein Anstieg zu sehen ist, können als Ausschnitt dieses gemeinsamen Verlaufs gedeutet werden. Bei weiterer Steigerung der m.o.i. wäre auch hier ein Plateau und ein Abfall der Kurve zu erwarten. Trotz dieses qualitativ sehr ähnlichen Verlaufs der Suppressionsfaktoren in Relation zur m.o.i. ist die Stärke der Suppression, d.h. der höchste erreichte Suppressionsfaktor, abhängig von Zelllinie und Vektor. So liegt der maximale Suppressionsfaktor für die Luciferaseproduktion von NCI-H295-Zellen nach Transduktion mit Ad.3r-luc beispielsweise bei ca. 140, für die IL-12 Produktion von HT29-Zellen nach Transduktion mit Ad.3r-mscIL-12 jedoch bei 1030. Dies bedeutet, dass die Regulationskapazität einen m.o.i. abhängigen Verlauf zeigt und zelllinienabhängig ist.



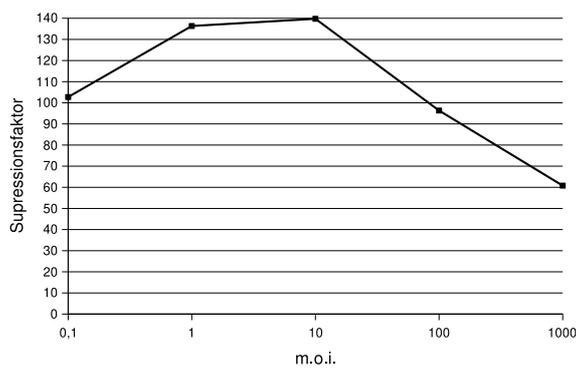
(a) Suppression der IL-12 Produktion in Y1



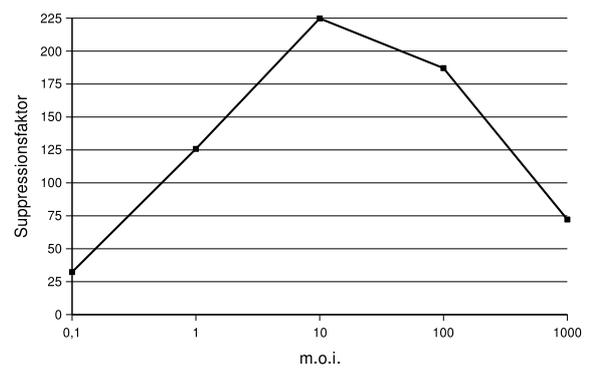
(b) Suppression der IL-12 Produktion in HT29



(c) Suppression der IL-18 Produktion in Y1



(d) Suppression der Luciferaseproduktion in NCI-H295



(e) Suppression der IL-12 Produktion in NCI-H295

Abbildung 4.11: Supprimierbarkeit der Transgenexpression durch Doxycyclin in Abhängigkeit von der m.o.i., Suppressionsfaktor als Quotient der Transgenexpression ohne DC/Transgenexpression mit DC

Diskussion

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit einem experimentellen Therapieansatz für das adrenokortikale Karzinom. Das ACC ist ein seltener endokriner Tumor, der aufgrund von spät auftretenden Symptomen und mangelhaften Therapieoptionen eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 23 bis 60% hat [6]. Die Chirurgie bietet zur Zeit die Therapie der Wahl, stellt aber oftmals keine Heilung dar. Mitotane als Medikament bei metastasiertem ACC ist eine nebenwirkungsreiche und hinsichtlich des Erfolges unzuverlässige Option. Auch Chemotherapie und Bestrahlung versagen häufig. Es besteht somit ein deutlicher Bedarf an neuen ergänzenden Therapiemöglichkeiten, die in Kombination mit den herkömmlichen Mitteln eine Prognoseverbesserung bewirken können. Eine solche neue Therapieoption zu erforschen war das Ziel dieser Arbeit.

5.1 Immunogenherapie von Tumoren

Forschungsergebnisse aus dem Bereich der Kanzerogenese erschaffen immer neue Ansatzpunkte für die antitumorale Therapie. Mutationen in gesunden Zellen führen zur Transformation in eine Tumorzelle, wenn die Anzahl der Mutationen die Reparaturkapazität der Zelle übersteigt. Durch solche genetischen Veränderungen erlangen die Zellen Eigenschaften, welche ihre Autonomie nähren. Dazu zählen ihre Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, eine Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Einflüssen, das Ausschalten der Apoptose, eine grenzenlose Teilungsfähigkeit, die Fähigkeit zur Induktion von Angiogenese und die Eigenschaft zur Gewebeinvasion und Metastasierung [73]. Es handelt sich um eine mehrstufige Entwicklung, deren genauer Ablauf für das ACC jedoch noch ungeklärt ist [16]. Da allen Tumoren diese generellen Eigenschaften und Entwicklungsschritte gemeinsam sind, kann ein Therapieansatz auch der Heilung verschiedener Krebsarten dienen.

Trotz der Entstehung der Tumorzellen aus körpereigenen Zellen findet eine Immunantwort auf Tumorgewebe statt. Diese wird durch Tumorantigene induziert, welche ein Unterscheidungsmerkmal für das Immunsystem darstellen. Verschiedenste Zellen und Mediatoren werden aktiviert, um die entarteten Zellen zu bekämpfen. Dabei spielen zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen und deren Antikörper, aber auch die angeborene Immunität mit verschiedenen Zytokinen, den antigenpräsentierenden Zellen und den NK-Zellen, die unter anderem durch IL-12 und IL-18 aktiviert werden, eine Rolle (s. dazu Abschnitt 2.2.2.2). Das Immunsystem beeinflusst aber nicht nur den Tumor, sondern auch umgekehrt. Durch die Abwehrmechanismen des Immunsystems werden resistente Tumorzellen selektiert, die durch Escape-Mechanismen neue Überlebensstrategien gefunden haben, um fortbestehen zu können [44]. Auch beim ACC gibt es Hinweise darauf, dass die Tumorzellen Escape-Mechanismen nutzen, wie z.B. die Downregulation ihrer MHC-II Moleküle [116] oder die Attackierung von Immunzellen über

ein vermehrtes FasL [191]. Neben den Escape-Mechanismen muss aber auch davon ausgegangen werden, dass es Tumorzellen gibt, die von Beginn an keine Immunreaktion hervorrufen, weil sie z.B. nie mit Immunzellen in Kontakt kommen oder das Tumorantigen zu schwach bzw. über einen zu kurzen Zeitraum exprimiert wird [130]. Zusätzlich fehlen vielen Tumorzellen die nötigen kostimulatorischen Moleküle [31]. Auf diese Weise ist zu erklären, dass es trotz einer Immunreaktion zur Tumorprogression kommt. Aus den Erkenntnissen über die Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem erwachsen Ansätze zur antitumoralen Immuntherapie. Hierzu gehört auch die in dieser Dissertation verwendete Stimulation des Immunsystems durch von außen zugeführte Zytokine, welche mit Hilfe genetisch veränderter Viren im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes appliziert werden.

Die Zytokine IL-12 und IL-18 konnten ihre potenten antitumoralen Effekte in einer Vielzahl von Studien beweisen (z.B. [25, 28, 33, 128, 135], s. dazu Abschnitte 2.4.2.2 und 2.4.2.3). IL-12 selbst inhibiert die Proliferation von Tumorzellen nicht, es aktiviert aber zahlreiche Wege, die antitumoral wirken können. Viele seiner Effekte werden durch IFN- γ vermittelt [27]. Es wurde gezeigt, dass die antitumoralen Effekte von IL-12 durch den gemeinsamen Einsatz mit IL-18 nochmals verstärkt werden können [40, 119]. In klinischen Studien am Menschen wurde jedoch der toxische Effekt systemisch applizierten IL-12 zum limitierenden Faktor [106], so dass eine effektive lokale Applikation der Zytokine nötig ist, die die systemischen Nebenwirkungen so weit es geht begrenzt.

Die Gentherapie nutzt den Transfer genetischen Materials in ein Individuum zur Behandlung einer Erkrankung, in unserem Fall den Transfer der regulierbaren Gene für IL-12 und IL-18 zur Behandlung des ACC. Zur erfolgreichen Durchführung eines gentherapeutischen Ansatzes ist neben einem effektiven therapeutischen Konstrukt, das das Wachstum von Krebszellen hemmt oder diese tötet, ein Vektor nötig, der das Konstrukt an sein Ziel bringt. Als Vektor wurde das Adenovirus Typ 5 verwendet. Adenoviren sind für die Immunogenentherapie von Tumoren aus mehreren Gründen gut geeignet: Sie exprimieren das Transgen nur zeitlich begrenzt, was hinsichtlich der Mutagenität als positiv zu werten ist. Ferner ist die Transgenexpression hoch und es werden sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen infiziert. Es können hohe Titer bei der Virusamplifikation erreicht werden und durch die Möglichkeit der Deletion großer Anteile des Virusgenoms können DNA-Insertionen von bis zu 8 kb vorgenommen werden [151]. In dieser Arbeit wurde ein E1/E3-deletiertes Adenovirus verwendet, da mit diesen Konstrukten die weitreichendsten Erfahrungen vorliegen. Durch das Entfernen der E1-Gene sind die Viren nicht zur Replikation fähig. Das Fehlen der E3-Proteine führt jedoch zu einer erheblichen Abwehrreaktion des Wirts gegen die Viren, die insbesondere eine Langzeitexpression von Transgenen unmöglich macht [81]. Bei der Verwendung von Adenoviren als Vektoren für eine Zytokingentherapie, wie in dieser Dissertation geschehen, ist die Aktivierung des Immunsystems sogar ein erwünschter Effekt, so lange trotzdem eine ausreichende Virusmenge die Zielzellen erreicht, bevor sie neutralisiert wird, und die Immunreaktion keine Gefahr für den Patienten darstellt.

Die antitumorale Immuntherapie basiert auf den Erkenntnissen um die Interaktion zwischen Tumoren und dem Immunsystem. IL-12 und IL-18 sind potente Mediatoren antitumoraler Effekte. In Kombination mit der Gentherapie mit ihren Möglichkeiten der effizienten lokalen Transgenexpression ist dies ein erfolversprechender Ansatz in der Therapie des ACC.

5.2 Immuntherapie und Genterapie des adrenokortikalen Karzinoms

Zur Zeit existiert keine zufriedenstellende Therapie des adrenokortikalen Karzinoms. Die vorliegende Dissertation evaluiert ein innovatives Konzept aus dem Bereich der Immunogenterapie. Auch von anderen Arbeitsgruppen gab es in der Vergangenheit erste genterapeutische und immuntherapeutische Ansätze für das ACC. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Genterapie beim ACC Im Bereich der Genterapie existiert eine Studie von Wolkersdörfer et al., in der die Autoren ein Vektorsystem zur Suizidgenterapie mit der HSV-TK anwenden. Es kommen zwei adenovirale Vektoren zum Einsatz, einer trägt das therapeutische Gen für die HSV-TK, ist aber durch Deletion der E1-Region replikationsdefizient. Der zweite trägt die fehlenden E1-Gene, aber nicht die E4-Region. Beide Vektoren sind komplementär und nur eine Infektion der Zelle mit beiden zugleich ermöglicht eine Vermehrung der Viren. Dies soll die Sicherheit und Effektivität erhöhen. In vitro wurden drei adrenokortikale Zelllinien transduziert: AtT20, SW13 und Y1. Es war auffällig, dass die Transduktionsrate in der FACS Analyse bei Y1-Zellen deutlich geringer war als bei den anderen Zelllinien, generell konnte aber festgestellt werden, dass adrenokortikale Zellen durch Adenoviren transduzierbar sind. Im Tierversuch konnte durch lokale Gabe beider Vektoren in Kombination mit der i.p. Gabe von Ganciclovir, das durch die HSV-TK zum toxischen Metabolit umgewandelt wird, eine Verlangsamung des Tumorstwachstums und eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden. Interessant war noch, dass auch die alleinige Gabe beider komplementärer Vektoren das Überleben schon verlängerte. Dies lässt sich durch den onkolytischen Effekt bei der Virusvermehrung erklären, konnte jedoch durch Zugabe von Ganciclovir noch gesteigert werden [189]. In einer anderen Studie von Chuman et al. konstruierten die Autoren einen Vektor, der ebenfalls das Gen für die HSV-TK trägt, aber dieses spezifisch in der Nebennierenrinde exprimiert. Gewebespezifische Genexpression ist eine attraktive aber technisch anspruchsvolle Möglichkeit, Gene zu adressieren, um umliegendes Gewebe vor toxischen Nebenwirkungen zu schonen. Dazu werden spezielle Rezeptoren oder Promotoren eines Gewebes ausgenutzt, wozu sich in der NNR der Hormonmetabolismus anbietet. So bauten die Autoren Plasmide, in denen das Gen für die HSV-TK unter Kontrolle des zellspezifischen CYP11B1 Promotors für die 11 β -Hydroxylase exprimiert wird. Zusätzlich setzten sie den Enhancer des P450_{scc} Gens¹ davor, um die Aktivität des Promotors weiter zu verstärken und zeigten, dass sie nochmals durch die Zugabe von cAMP-Agonisten wie 8-bromo-cAMP, das auf den Enhancer wirkt, gesteigert werden konnte. Sie verglichen verschiedene Zelllinien in vitro und konnten beweisen, dass die beschriebenen Effekte aufgrund der Gewebespezifität in adrenokortikalen Zelllinien weitaus stärker ausgeprägt waren als in anderen Geweben [34]. Ein solches Vektorsystem ist ein attraktives Werkzeug für die spezifische Genterapie der NNR. Ein weiteres Paper beschäftigt sich mit der Beeinflussung der adrenokortikalen Steroidbiosynthese durch adenovirale Vektoren. Alesci et al. transduzierten die Zelllinie BACC mit verschiedenen Vektoren, die vom Adenovirus Typ 5 abgeleitet waren. Sie stellten fest, dass in dieser Zelllinie generell eine hohe Transduktionsrate erreicht werden konnte und begründeten dies mit dem Adenotropismus von Adenoviren. Allerdings führte die Transduktion durch die E1/E3-deletierten Vektoren zu strukturellen Veränderungen im Bereich der Mitochondrien und des Zellkerns. Weiterhin nahm die Zellproliferation zu, die basale Hormonsekretion stieg, aber die durch ACTH-stimulierte Hormonsekretion nahm signifikant ab. Der endokrine Effekt konnte bei Vektoren, die E4-deletiert waren, nicht mehr festgestellt werden, so dass Gene dieser Region verantwortlich

¹Das Enzym P450_{scc} katalysiert die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon.

gemacht wurden. Die Autoren mahnten, dies bei Gentherapiestudien mit Adenoviren zu beachten, um die Funktion der NNR nicht zu gefährden [5]. Interessant ist in der Tat, dass es in der Vergangenheit schon mehrere Berichte gab, dass Adenoviren einen gewissen Adenotropismus aufweisen [114, 160, 170], was sie speziell für die Gentherapie von adrenokortikalen Pathologien eignen würde.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe beschäftigte sich S. Starke in ihrer 2003 eingereichten Dissertation "Adenovirale Gentherapie des murinen adrenokortikalen Karzinoms - in vitro und in vivo" [169] mit der Transduzierbarkeit der murinen adrenokortikalen Zelllinie Y1 durch verschiedene adenovirale Vektoren sowie den Effekten der Anwendung des rekombinanten replikationsdefizienten Vektors Ad.CMV-mIL-12 auf mit diesen Zellen subkutan in Mäusen erzeugte Tumoren. Durch die in vitro Versuche konnte sie zeigen, dass die Tumorzelllinie Y1 mit den Vektoren Ad.RSV- β -Gal, Ad.CMV-luc und Ad.CMV-mIL-12 transduzierbar ist, die Transduktionsrate von der eingesetzten Virus m.o.i. abhängig ist und die Y1-Zelllinie schlechter transduzierbar ist als die murine Kolonkarzinomzelllinie MCA26, mit der verglichen wurde. In einem Bioassay zeigte sich außerdem, dass das von transduzierten Y1-Zellen produzierte IL-12 bioaktiv ist. Im Tierversuch an LAHeF1-Mäusen konnte bewiesen werden, dass die subkutane Injektion von Y1-Zellen in die Flanken von LAHeF1-Mäusen zuverlässig die Entstehung subkutaner Tumoren bewirkt und es zeigte sich eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums sowie eine angedeutete Verlängerung des Langzeitüberlebens für Tiere, denen Ad.CMV-mIL-12 intratumoral appliziert worden war. Die Arbeit von Frau Starke bildet insofern eine Grundlage für die vorliegende Dissertation, dass sie eine generelle Transduzierbarkeit und Effektivität der Transduktion der Tumorzelllinie Y1 durch Adenoviren belegt. Da aber die neuen 3r-Vektoren ein flexibleres System mit einer höheren Transgenexpression als unter dem CMV-Promotor darstellen [24], stehen nun effizientere Vektoren für die Therapie des ACC zur Verfügung.

Immuntherapie beim ACC Auch aus dem Bereich der Immuntherapie existieren Ansätze beim adrenokortikalen Karzinom. Ortmann et al. nutzten in ihrer Studie das StAR-Antigen als Ziel ihrer DNA Vakzinierung, da sie in einer anderen Studie festgestellt hatten, dass dieses in allen von ihnen untersuchten ACC vorhanden war. Sie immunisierten Mäuse dreimal mit einem Plasmid, das das StAR-Gen trägt und danach einmal mit einem für StAR kodierenden rekombinanten Vaccinia Virus als Antigenboost. Anschließend wurden Tumorzellen subkutan appliziert. Immunisierte Tiere entwickelten signifikant weniger Tumoren und die vorhandenen wuchsen deutlich langsamer. Es wurden StAR-spezifische Immunzellen festgestellt. Sie konnten damit zeigen, dass die Immuntoleranz des Körpers gegenüber StAR durch die Vakzinierung gebrochen werden konnte [134]. Die Arbeitsgruppe von Papewalis et al. führten bei zwei Patienten eine Impfung mit autologen DC durch, die vorher mit autologen Tumorlysaten fusioniert worden waren. Aus dem Blut konnten daraufhin tumorspezifische Immunzellen isoliert werden, ein positiver Effekt auf die Klinik blieb jedoch aus [138].

5.3 Die regulierte Genexpression in der Tumorthherapie

Um gentherapeutische Ansätze im klinischen Bereich sicher und effektiv zu gestalten, ist es nötig von außen durch Vektoren eingebrachte Gene auch im Körper weiterhin kontrollieren zu können. Hierzu wurden verschiedene regulierbare Systeme zur Genexpression entwickelt (siehe Abschnitt 2.4.2.4). Auf einem solchen Modell basiert auch das in dieser Dissertation verwendete 3r-System.

Das 3r-Vektorsystems wurde von Herrn F. Puls im Rahmen seiner Dissertation "Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression" [144] in unserer Arbeitsgruppe (AG A. Block) entwickelt. Es basiert auf einem E1/E3-deletierten Adenovirus, das ein therapeutisches Konstrukt trägt, welches die Zielgene (in diesem Fall für die Zytokine IL-12 und IL-18) unter Kontrolle des autoregulativen Tet-Systems exprimiert. Das Tet-System ist aus den Genen für die Tetracyclinresistenz von Eukaryonten abgeleitet. Dieses in der Natur vorkommende System wird gentechnisch ausgenutzt, indem TetR mit dem Aktivator VP16 des HSV fusioniert wird, wobei ein Tc-kontrollierter Transaktivator (tTA) entsteht. Dieser bindet in Abwesenheit von Tc an einen Operator aus sieben TetOs, welcher auf einer Seite von einem minimalen CMV-Promotor flankiert wird, der das Zielgen (z.B. für IL-12) kontrolliert. Auf der anderen Seite kontrolliert ein sehr viel schwächerer TK-Promotor des HSV die Transkription der tTA-Sequenz. Der VP16-Anteil stimuliert die minimalen Promotoren, nachdem der TetR-Anteil des tTA an eines der TetOs gebunden hat, und beide Gene werden transkribiert. Im angeschalteten Zustand steigert tTA seine eigene Transkription im Sinne eines positiven Feedbacks und führt dadurch zu einer sehr hohen Transgenexpression. Im abgeschalteten Zustand in Anwesenheit von Tc wird die basale Expression des tTA niedrig gehalten (genauer im Abschnitt 2.4.2.4).

Grundlage für das 3r-System war das Plasmid pBIG3r von der Arbeitsgruppe um CA. Strathdee [174]. Dieses System bietet drei Hauptvorteile: 1) Die Möglichkeit der Supprimierung der Transgenexpression durch Zugabe von Tc in nicht-toxischer Dosierung verbessert die Sicherheit und Flexibilität. Eine unkontrollierte dauerhafte Transgenexpression, wie z.B. durch einen dauerhaft aktiven CMV-Promotor, kann zu toxischen Nebenwirkungen führen, wie sie in der Vergangenheit in anderen Studien mit IL-12 insbesondere bei systemischer Applikation bereits aufgetreten sind [30, 106]. 2) Für den 3r-Promotor konnte in Abwesenheit von Tc eine vielfach höhere Transgenexpression bewiesen werden als dies mit einem CMV-Promotor unter denselben Bedingungen möglich war [24]. Dies wird erreicht durch den potenten Transaktivator VP16, den positiven Feedback-Mechanismus in Abwesenheit von Tc im autoregulativen System, das Einfügen von Introns zwischen TetOs und Promotoren und den modifizierten tTA mit nukleärem Lokalisationssignal aus der Adenovirus E1A Region und somit verbesserter Adressierung in den Zellkern. Durch die höhere Transgenexpression sind nur noch geringere Dosen an Adenoviren für den selben Effekt notwendig. 3) Die toxischen Effekte des VP16 werden vermindert, indem die tTA-Expression durch den schwächeren TK-Promotor kontrolliert wird und somit die tTA-Level im an- und abgeschalteten Zustand niedriger sind als in vorherigen Systemen. Das wirkt sich hinsichtlich des Squelching Effekts positiv aus. Er beschreibt ganz allgemein eine Toxizität von Transaktivatoren, wenn diese in zu hohen Konzentrationen anwesend sind, dann mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren, diese verbrauchen und eine Suppression der zellulären Genexpression bewirken [60] und wurde auch für die VP16 Domäne des tTA beschrieben [157, 181].

Die AG A. Block veröffentlichte als erste über die erfolgreiche Konstruktion eines adenoviralen Vektors mit einer Tc-kontrollierten autoregulativen Genexpressionskassette in der E1-Region eines einzelnen replikationsdefizienten rekombinanten Adenovirus [24]. Die Arbeit von Herrn Puls bildet eine essentielle Grundlage für die vorliegende Dissertation. Er konstruierte das 3r-System und die in dieser Arbeit verwendeten Viren Ad.3r-mscIL-12 und Ad.3r-luc. Er bewies eine m.o.i.-abhängige und durch Tc regulierbare Transgenexpression mit höherer Effizienz als dies durch den CMV-Promotor möglich war. All dies konnte er für mehrere Zelllinien zeigen, darunter HT29 nicht jedoch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten adrenokortikalen Zelllinien Y1 und NCI-H295.

Frau S. Cinar evaluierte in ihrer Dissertation mit dem Titel "Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare Zytokingenexpression für die In-vivo-Gentherapie kolorektaler Karzinome" die Vektoren Ad.3r-mscIL-12 und Ad.3r-mIL-18 in vitro und in vivo [35]. Sie konnte dabei in vitro eine effizientere IL-12 gegenüber der IL-18 Produktion feststellen. Sie stimulierte Mauslymphozyten mit IL-12 und IL-18 allein und in Kombination und stellte fest, dass jedes für sich die IFN- γ Produktion stimulieren kann und damit bioaktiv ist, aber ein 1:1 Verhältnis zwischen den beiden die höchsten IFN- γ Werte im Überstand muriner Lymphozyten ergab. Nach i.v. Applikation des Vektors Ad.3r-luc konnte sie in Mäuseleberhomogenisaten eine durch Tc regulierbare Luciferaseexpression nachweisen. Nach intratumoraler Applikation von Ad.3r-mscIL-12 in murinen subkutanen Tumoren, erzeugt durch Injektion von MCA26-Zellen, konnte in 50% der Tiere eine Komplettremission und bei den anderen ein deutlich reduziertes Tumorstadium erzielt werden. Tiere, die Doxycyclin erhielten und damit geringere IL-12 Mengen produzierten, zeigten ein deutlich reduziertes Überleben. Dies beweist eindrucksvoll die Effizienz des 3r-Vektorsystems in vivo.

Herr H. Wulff konstruierte und charakterisierte innerhalb unserer Arbeitsgruppe das Virus Ad.3r-hscIL-12, das ein humanes IL-12 Fusionsprotein unter der Kontrolle des 3r-Promotors exprimiert und somit die Möglichkeiten zum Einsatz beim Menschen bietet. Dieses zeigte in der Zellkultur mit HT29-Zellen eine hoch effektive IL-12 Produktion und eine bis zu 2200fache Supprimierbarkeit durch Tc. Nach Transduktion menschlicher Kolonkarzinombiospien mit dem Virus konnte ebenfalls eine hohe IL-12 Produktion erreicht werden, die durch Tc bis zu 9000fach unterdrückt werden konnte. Vorher wurde immunhistochemisch eine hohe CAR Rezeptor-Expression der Biospien gezeigt [194]; der Rezeptor ist essentiell für die Aufnahme der Adenoviren in die Zellen [15]. Diese Arbeit ist durch die Konstruktion des Virus Ad.3r-hscIL-12 Grundlage der vorliegenden Dissertation. Sie beweist die Effektivität des Virus für das Kolonkarzinom, jedoch nicht für andere Tumoren. Sie unterstreicht ferner die Effektivität des von Herrn Puls entwickelten 3r-Systems und weitet den Einsatz auf humane Tumorbiospien aus.

Tetracyclin-regulierbare Systeme sind in der Vergangenheit in einer Vielzahl von präklinischen Studien zur Therapie unterschiedlichster Krankheiten wie Chorea Huntington [147], Arthritis [7] oder Hepatitis B [43] erforscht worden. Im Bereich der Tumorthherapie gibt es ebenfalls eine große Bandbreite an Untersuchungen, wie z.B. zum Tc-regulierten Einsatz von IL-3 zur Steigerung der Strahlensensitivität von Prostata-Ca [184], zum Einsatz Tc-regulierter onkolytischer Viren bei Lungenkrebs [50] oder zum Einsatz Tc-regulierter Suizidgene der HSV-TK bei Brustkrebs [110]. Es existiert zudem eine Veröffentlichung über den Einsatz eines Plasmidvektors bei hepatischen Metastasen, der IL-12 unter der Kontrolle eines Tet-ON-Systems exprimiert, welches durch Tetracyclin angeschaltet wird, mit dem eine Komplettremission der murinen Tumoren erreicht werden konnte [198]. Klinische Studien mit regulierbaren Systemen gibt es derzeit jedoch noch keine.

Die positiven Daten innerhalb unserer Arbeitsgruppe mit den hocheffektiven Vektoren des 3r-Systems, Erfolge anderer Arbeitsgruppen in der Tumorthherapie mit Tetracyclin-regulierten Systemen und die vielfach bewiesenen starken antitumoralen Effekte von IL-12 und IL-18 lassen eine Kombination dieser Komponenten als erfolgversprechenden Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen erscheinen.

5.4 Erfolg von Vektoren des 3r-Systems in adrenokortikalen Zelllinien

In der vorliegenden Dissertation wurden die murine adrenokortikale Zelllinie Y1 und die humane adrenokortikale Zelllinie NCI-H295 mit adenoviralen Vektoren des 3r-Systems transduziert und hinsichtlich

ihrer Transduzierbarkeit, einer m.o.i. abhängigen Transgenexpression und einer Supprimierbarkeit durch das Antibiotikum Doxycyclin untersucht. Es sollte evaluiert werden, ob die Vorteile des 3r-Vektorsystems auch für die Therapie des ACC nutzbar sind.

5.4.1 Transduzierbarkeit und Transduktionseffizienz

Aus dem Ergebnisteil geht hervor, dass beide getesteten Zelllinien durch Adenoviren des 3r-Systems transduzierbar sind. Alle vorliegenden Versuche waren in dieser Hinsicht positiv. Y1-Zellen wurden erfolgreich mit den Adenoviren Ad.3r-mscIL-12 sowie Ad.3r-mIL-18 transduziert, was durch Nachweis des Transgenprodukts im Überstand getestet wurde. Zusätzlich wurde im Bioassay bewiesen, dass das produzierte IL-12 murine Lymphozyten dosisabhängig stimuliert und somit bioaktiv ist. Dies korreliert mit vorherigen Daten aus unserer Arbeitsgruppe [144]. Allerdings wurde deutlich, dass Ad.3r-mIL-18 nur bei sehr hoher Virus m.o.i. zu einer erkennbaren IL-18 Produktion führte, so dass dieser Vektor als sehr viel ineffizienter einzustufen ist. Im Vergleich mit HT29-Zellen war festzustellen, dass Y1-Zellen nach Transduktion mit Ad.3r-mscIL-12 weniger IL-12 produzierten als HT29-Zellen. Die IL-18 Produktion von HT29-Zellen lag dagegen niedriger als die von Y1-Zellen. NCI-H295-Zellen konnten ebenfalls erfolgreich mit den Adenoviren Ad.3r-luc und Ad.3r-hscIL-12 transduziert werden, so dass eine Transduzierbarkeit der beiden adrenokortikalen Zelllinien mit den Viren des 3r-Systems bewiesen war. Die Transduktionseffizienz, gemessen an der Menge des produzierten Genprodukts, war jedoch zelllinienabhängig unterschiedlich, was der Vergleich mit HT29-Zellen zeigte.

Transduzierbarkeit Die erfolgreiche Anwendung eines Tet-Systems auf adrenokortikale Zelllinien wird in der vorliegenden Dissertation erstmals beschrieben. Eine Transduzierbarkeit der Y1-Zelllinie mit Adenoviren generell konnten auch andere schon belegen [169, 189], über die NCI-H295-Zellen ließen sich keine entsprechenden Daten finden. Berichte über einen generellen Adenotropismus von Adenoviren existieren seit langem [114, 160, 170], so dass sie sich als Gentherapievektoren für das ACC anzubieten scheinen. Vektoren des 3r-Systems wurden jedoch noch nie in adrenokortikalen Zellen angewendet und auch über andere Tet-Systeme waren keine Berichte zu finden.

Transduktionseffizienz Eine zelllinienabhängige Transduktionseffizienz von adenoviralen Vektoren, in der vorliegenden Arbeit festgemacht an der Menge des produzierten Interleukins, ist in der Literatur mehrfach belegt. In einer Arbeit von Wolkersdörfer et al. war auffällig, dass die Transduktionsrate mit adenoviralen Vektoren in der FACS Analyse bei Y1-Zellen deutlich geringer ausfiel als bei anderen getesteten adrenokortikalen Zelllinien [189] (s. oben). Solche Unterschiede in der Effektivität von Vektorsystemen lassen sich nicht nur zwischen mehreren Zelllinien eines Gewebes, sondern auch zwischen unterschiedlichen Geweben erkennen. Die Doktorarbeit von Frau Starke belegte, dass murine MCA26-Zellen nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren eine höhere Transgenexpression zeigten als Y1-Zellen [169]. Auch die Adenoviren des 3r-Systems zeigten schon in früheren Versuchen eine variable Transduktionseffizienz beim Vergleich mehrerer Zelllinien [24]. Die Gründe für das Phänomen der zelllinienabhängigen Vektoreffizienz können auf verschiedenen Ebenen liegen. Grundsätzlich ist natürlich zu beachten, dass die eingesetzten Messverfahren differieren können und auf einen analogen Versuchsaufbau geachtet werden muss. Allein die Berechnung der eingesetzten Virus m.o.i., die in dieser Arbeit auf der Bestimmung des Virustiters mittels eines Plaque-Assays beruhte, dessen Einsatz in der Literatur sehr unterschiedlich gesehen wird, kann zur Beeinflussung des Ergebnisses führen. Der Tropismus von

Adenoviren ist ein gut belegtes Phänomen und bietet eine plausible Erklärung für Unterschiede in der Effizienz von Gentherapievektoren zwischen Zelllinien und Geweben. Für die Aufnahme von Adenoviren des Typs 2 und 5 in die Zelle spielen das CAR Protein und die α -Integrine eine wichtige Rolle. CAR bewirkt die Bindung des Adenovirus an die Zielzelle, die α -Integrine sind für die Endozytose erforderlich [156]. Zelllinien und Gewebe exprimieren diese Faktoren in variablem Ausmaß, was den Tropismus von Adenoviren erklärt, obwohl sie generell gesehen ein breites Spektrum an Geweben infizieren können. Beim Menschen konnten in einer Studie die höchsten Level an CAR RNA in Pankreas, Gehirn, Herz, Dünndarm, Hoden und Prostata, jedoch keine in Niere, Plazenta, Leukozyten und Thymus nachgewiesen werden [180]. Weitere Studien zeigten, dass eine Differenz in der CAR Rezeptor Expression mit unterschiedlicher Transduzierbarkeit von Zellen durch adenovirale Vektoren einhergeht [107, 109, 133]. Versuche, die Expression von CAR und Integrinen mittels des Histon-Deacetylase-Inhibitors FK228 [61] oder durch Wachstumsfaktoren [86] zu steigern, bzw. die Zielzellen direkt mit CAR cDNA zu transduzieren [109], konnten die Transduktionsrate steigern. Über die Expression von CAR und Integrinen in adrenokortikalen Zelllinien ließ sich in der Literatur nichts finden, aber es ist wahrscheinlich, dass sie ein wichtiger Grund für die beobachtete Zelllinienabhängigkeit der Vektoren des 3r-Systems sind. Für die Zukunft wäre es daher interessant die CAR Expression dieser Zellen und des ACC generell zu testen, um eine Aussage über die Erfolgsaussichten für Therapiestudien mit adenoviralen Vektoren treffen zu können. Neben dem adenoviralen Tropismus können auch Faktoren, die nach dem Eintritt des Vektors in die Zelle auftreten, seine Effizienz beeinflussen. Der Differenzierungsgrad und die Teilungsaktivität von Zellen spielen eine Rolle für deren Transkriptionsprofil und das Ausmaß ihrer Produktivität. Die Aktivität von Promotoren und damit die Expression der von ihnen kontrollierten Gene variiert zwischen Geweben, wobei sowohl der TK als auch der CMV-Promotor, die Teil des 3r-Systems sind, keine hohe Gewebespezifität aufweisen [174]. Trotzdem unterscheidet sich die Effizienz des Tet-Systems zwischen Geweben [3, 84, 155, 167]. Mögliche Gründe hierfür, wie z.B. virale Enhancermechanismen oder Interaktionen zwischen zellulären Transkriptionsfaktoren und Gensequenzen im Gentherapievektor, werden im Abschnitt 5.4.3 diskutiert. Gründe für die vielfach beschriebene zelllinienabhängige Transduktionseffizienz von Vektoren sind somit nach Ausschluss von Differenzen im Messverfahren auf Ebene des Virus, der Zelle und des therapeutischen Konstrukts zu suchen.

Effizienz von Ad.3r-mIL-18 In den Versuchsteilen mit dem Vektor Ad.3r-mIL-18 fiel auf, dass in den Überständen der getesteten Zelllinien Y1 und HT29 deutlich weniger Transgenprodukt zu finden war als in den Versuchen mit Ad.3r-mscIL-12. Erst bei 10.000 m.o.i. wurde bei Y1-Zellen ein eindeutiger Anstieg der IL-18 Konzentration im Überstand deutlich, die Supprimierung durch Doxycyclin betrug bei dieser m.o.i. 92%, bzw. Faktor 13. Bei HT29-Zellen fiel das Ergebnis ähnlich enttäuschend aus: Erst bei 1000 m.o.i. war ein Anstieg der IL-18 Konzentration zu verzeichnen, eine Supprimierbarkeit durch Doxycyclin konnte bei 1000 und 10.000 m.o.i. festgestellt werden. Da das Ergebnis bei beiden getesteten Zelllinien vergleichbar war, ist zu vermuten, dass dies auf den Vektor selbst und nicht auf die Y1-Zelllinie zurückzuführen ist. Bei erhaltener Transduzierbarkeit und Regulierbarkeit durch Doxycyclin ist die Effizienz von Ad.3r-mIL-18 unabhängig von der Zelllinie deutlich schlechter als die von Ad.3r-mscIL-12. Das überrascht, da beide Vektoren bis auf das Zytokingen analog aufgebaut sind (vgl. die Expressionsplasmide im Anhang A.1). In der Dissertation von Frau S. Cinar, die ebenfalls mit dem Vektor Ad.3r-mIL-18 arbeitete, wurde dieses Phänomen jedoch auch deutlich [35]. Sie transduzierte MCA26-Zellen und HT29-Zellen mit den Vektoren Ad.3r-mIL-18 und Ad.3r-mscIL-12. Beide Zelli-

nien produzierten IL-18, aber es wurde für HT29-Zellen bei gleichen Versuchsbedingungen eine IL-12 Produktion festgestellt, die mehr als das 4000fache der IL-18 Werte betrug (1000 m.o.i., 45 h nach Transduktion). Da der Mechanismus der Transduktion und Transgenexpression aufgrund des analogen Vektorkonstrukts für beide Viren identisch sein müsste, vermutete sie, dass der Grund für die geringe IL-18 Konzentration im Überstand auf dessen Ausschleusungsmechanismus zurückzuführen sei. Das murine IL-18 Gen kodiert für das 192 AS lange pro-IL-18 [132]. Dieses enthält kein Signalpeptid, das für die Ausschleusung aus der Zelle nötig ist. Es muss daher zunächst durch die Caspase-1 in seine bioaktive Form gespalten werden, bevor es aus der Zelle ausgeschleust werden kann [59, 70]. Das in Ad.3r-mIL-18 enthaltene IL-18 Gen enthält nur den Teil der IL-18 cDNA, der für das biologisch aktive Protein kodiert, um eine Abhängigkeit von der Caspase-1 zu umgehen, die nicht zwingend in allen Tumorzellen vorhanden sein muss. Bei der Konstruktion ging jedoch das Codon für den Translationsstart verloren und es wurde ein neues Startcodon eingefügt, welches das erste Codon des IL-18 Gens ersetzt, so dass in der Aminosäuresequenz an dieser Stelle ein Methioninrest anstelle des Asparagins entstand. Das kreierte Expressionsprodukt entspricht somit nicht mehr dem natürlichen [193]. Durch die Veränderung der Aminosäuresequenz könnte ein Signalpeptid verändert worden sein, das die Ausschleusung des reifen IL-18 aus der Zelle bewirkt, so dass dies nun unterbleibt. In einer Studie von Hara et al. wurde die Ausschleusung eines reifen IL-18, an das die Signalsequenz von IFN- β angeheftet wurde, mit der Ausschleusung des reifen IL-18 ohne Signalsequenz verglichen. Im Überstand der Zellen, die mit dem IL-18 ohne Signalsequenz transduziert worden waren, war kein IL-18 zu finden, in denen mit Signalsequenz schon [74]. Auch schon früher konnten Osaki et al. nachweisen, dass sich im Überstand von Fibrosarkomzellen, die durch einen viralen Vektor transduziert wurden, der nur für pro-IL-18 kodierte, signifikant weniger IL-18 befand als bei Zellen, die durch einen Vektor transduziert wurden, bei dem die Signalsequenz von Parathormon vor die Sequenz des reifen IL-18 Gens gesetzt wurde [135]. Heuer et al bewiesen, dass retroviral transduzierte Neuroblastomzellen IL-18 sezernierten, wenn vor das reife Protein die Signalsequenz von IL-11 gesetzt wurde, nicht jedoch wenn das Gen für pro IL-18 verwendet wurde [79]. Daher könnte die fehlende Signalsequenz im Ad.3r-mIL-18 die schlechten Expressionsraten in den Versuchen erklären.

5.4.2 M.o.i. abhängige Transgenexpression

Eine m.o.i. abhängige Transgenexpression konnte in allen Versuchsteilen beobachtet werden. Das heißt, dass mit steigender Virusmenge pro Zelle das virale Transgen verstärkt exprimiert wird. Dieser Effekt ist jedoch nicht linear, d.h. eine Steigerung der Virusmenge um den Faktor 10 führt nicht unbedingt zu einer zehnfach höheren Transgenexpression. Desweiteren besteht eine Kapazitätsgrenze nach oben, die bei weiterer Steigerung der m.o.i. keine Erhöhung der Interleukin Produktion erlaubt. Dies zeigte sich in einem auffälligen Plateau-effekt bei der IL-12 Produktion von HT29-Zellen (siehe Abschnitt 4.1.2) sowie im Bioassay (siehe Abschnitt 4.1.3).

Ansätze des beobachteten Plateau-effekts sind auch in den Versuchen von Herrn F. Puls mit dem 3r-System sichtbar, obwohl hier die maximale eingesetzte m.o.i. nur bei 100 lag [24]. In der Arbeit von Frau S. Cinar mit Ad.3r-mscIL-12 in MCA26-Zellen wurde dieser Effekt sehr deutlich bei 100, 300 und 1000 m.o.i. [35]. Es erscheint logisch, dass mit zunehmender m.o.i. auch die Transgenexpression steigt, da mehr Zellen durch Viruspartikel transduziert werden und z.T. auch mehrere Viruskopien pro Zelle vorliegen. Allerdings ist dieser Effekt nicht unendlich steigerbar. Dies ist zum einen damit begründbar, dass der Transkriptions- bzw. Translationsapparat der Zelle irgendwann eine Kapazitätsgrenze erreicht

und nicht mehr Protein gebildet bzw. ausgeschleust werden kann. Theoretisch möglich wäre auch eine Sättigung der zellulären CAR Rezeptoren, die Adenoviren zur Aufnahme in die Zielzelle nutzen. Zum anderen kann der weiter oben bereits beschriebene Squelching Effekt hierbei eine Rolle spielen. Obwohl das 3r-System so konfiguriert ist, dass auf Grund der Kontrolle des tTA durch den TK-Promotor weniger Transaktivator vorliegt und somit der toxische Effekt abgemildert sein sollte [174], kann bei hoher Viruskonzentration pro Zelle nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt trotzdem zum Tragen kommt.

5.4.3 Supprimierbarkeit durch Doxycyclin

Es ist festzustellen, dass sich in allen Versuchsteilen eine Supprimierbarkeit der Transgenexpression durch das Antibiotikum Doxycyclin zeigte. Das Tet-OFF System funktioniert somit in der Zellkultur mit adrenokortikalen Zellen verlässlich. Für alle Versuche ist der Suppressionsfaktor als Maß für die Supprimierbarkeit den entsprechenden Tabellen zu entnehmen (s. Ergebnisteil) und in Abbildung 4.11 gegen die zugehörigen viralen m.o.i. aufgetragen. Mit steigender m.o.i. nimmt die Supprimierbarkeit zu, erreicht schließlich ein Plateau, um bei hoher Transgenexpression wieder abzufallen. Die Graphen, in denen nur ein Anstieg zu sehen ist, können als Ausschnitt dieses gemeinsamen Verlaufs gedeutet werden. Trotz des qualitativ sehr ähnlichen Verlaufs der Suppressionskurven ist die Stärke der Suppression, d.h. der höchste erreichte Suppressionsfaktor, abhängig von Zelllinie und Vektor. Die Regulationskapazität zeigt also einen m.o.i. abhängigen Verlauf und ist zelllinienabhängig.

M.o.i. abhängige Regulationskapazität Auch in der Arbeit von Herrn F. Puls konnte eine m.o.i. abhängige Regulationskapazität gezeigt werden. Das Optimum der Regulierbarkeit in HELA- sowie HT29-Zellen, die mit dem Vektor Ad.3r-luc transduziert worden waren, lag bei ca. 10 m.o.i. [144]. In den Versuchen mit Ad.3r-luc im Rahmen dieser Dissertation lag das Optimum für NCI-H29-Zellen in einem ähnlichen Bereich (s. Abbildung 4.11(d)). Eine geringe Regulationskapazität bei kleinen m.o.i. wurde damit begründet, dass die tTA-Konzentration in diesem Fall zu gering ist, um die positive Feedbackschleife zu aktivieren, denn im Vergleich von HELA-Zellen mit HELA-tTA-Zellen, die tTA konstitutiv exprimieren, war der Effekt bei den letzteren nicht vorhanden, da dort kein Mangel an Transaktivator herrscht. Auch in der Literatur findet man sehr unterschiedliche Aussagen darüber, was das optimale Verhältnis zwischen tTA und TRE ist. Es scheint abhängig von der Zelllinie oder dem verwendeten Vektor zu sein [66]. Die Abnahme der Regulationskapazität bei höheren m.o.i. könnte damit zusammenhängen, dass das Kapazitätsmaximum in den Zellen ohne Tc bereits erreicht ist, in denen mit Tc aber noch steigerbar ist, bzw. dass der Squelching-Effekt noch nicht so stark zu Tage tritt, da das System durch Tc heruntergefahren ist. Ein weiterer möglicher Grund wäre, dass durch das Vorliegen mehrerer Viruskopien pro Zelle Enhancermechanismen der E1A-Region des Ad5 Genoms stärker zu Tage treten und somit die Genexpression unabhängig vom Tc höher ist. Rubinchik et al. zeigten, dass die Transgenexpression unter der Kontrolle von Tet-Systemen durch adenovirale Enhancer beeinflusst werden kann. Dies ist insbesondere für den E1A-Enhancer von Ad5 bewiesen. Es wurde gezeigt, dass der Einfluss des Enhancers auf den Promotor mit der Entfernung zum Enhancer abnimmt, aber die Stärke dieses Einflusses zelllinienabhängig variiert. Außerdem steigt der Effekt des Enhancers bei höherer m.o.i., d.h. wenn mehr Viruskopien pro Zelle vorliegen und damit auch mehr Enhancer anwesend ist [155]. Das ist ein möglicher Grund für die unterschiedlich hohe Basisexpression verschiedener Zelllinien, die wiederum die Regulationskapazität beeinflussen kann.

Zelllinienabhängige Regulationskapazität In den Versuchen mit den adrenokortikalen Zelllinien war auffällig, dass die Regulationskapazität des 3r-Systems nicht nur von der m.o.i. abhängt, sondern auch von der Zelllinie bzw. dem Gewebe. Dieses Phänomen ist für Tet-Systeme in der Literatur schon vielfach beschrieben worden: Für die in unserer Arbeitsgruppe entstandenen Vektoren wurden bei gleicher Menge an Doxycyclin ($2 \mu\text{g/ml}$) Suppressionsfaktoren je nach Zelllinie zwischen 4 (U266) und 6069 (Aspc-1) für Ad.3r-mscIL-12 sowie zwischen 4 (U266) und 16353 (SkCo-1) für Ad.3r-luc ermittelt [144]. Das zeigt eine imposante Spannweite. Auch Shockett et al. berichteten, dass ihr autoreglatives Tet-System, das sie in transgene Mäuse einbrachten, eine gewebeabhängige Transgenexpression und Regulationskapazität aufwies, mit besonders hohen Werten in Thymus und Lunge. Sie diskutierten, dass dies mit der unterschiedlichen Differenzierung der Zellen und deren Transkriptionsprofil zusammenhängt [167]. Ackland-Berglund et al. stellten ebenfalls eine stark variable Transgenexpression unter einem Tet-OFF System in verschiedenen Zelllinien fest, die sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Tc zu verzeichnen war [3]. Howe et al. führten die schlechte Regulationskapazität von 293-Zellen in ihren Versuchen auf zelluläre Transaktivatoren zurück, die die Transkription der Gene tetracyclinunabhängig stimulieren und so die Regulierbarkeit vermindern [84].

Trotz der hohen Spezifität von tTA für TetO und der Herkunft des Systems aus Bakterien (TetR) und Viren (VP16) kommt es scheinbar beim Menschen zu Interaktionen mit zellulären Proteinen, was eine Erklärung für die zelllinienabhängige Regulationskapazität sein kann. Diese Effekte wurden insbesondere bei dauerhaft virustransduzierten Zelllinien bzw. transgenen Mäusen deutlich, können aber auch bei einer transienten Infektion nicht ausgeschlossen werden. Für die VP16-Domäne des tTA ist eine Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren erwiesen, sie ist für die Aktivierung der Transkription sogar nötig [120]. Dadurch ist auch der Squelching-Effekt zu erklären. Baron et al. konnten zeigen, dass durch Eliminierung von potentiellen Bindungsstellen für zelluläre Faktoren innerhalb der VP16 Sequenz im tTA der Squelching Effekt reduziert werden konnte und höhere tTA Konzentrationen toleriert wurden [12]. Aber auch andere, VP16-unabhängige Interaktionen sind möglich. Rang et al. stellten bei einer Studie zufällig fest, dass IFN- α das Tet-System tTA unabhängig stimulieren kann, indem es Transkriptionsfaktoren induziert, die an eine Sequenz zwischen den TetOs binden, die ihrer eigentlichen Bindungsdomäne stark ähnelt, und so die Transgenexpression steigern. Dieser Effekt ließ sich nicht in allen getesteten Zelllinien nachweisen, so dass wahrscheinlich zelluläre Faktoren, die ebenfalls in diesem Bereich binden, auch eine Rolle spielen [146]. Gould et al. lokalisierten innerhalb des TRE das GATA Motiv, das Bindungsstelle für endogene GATA Transkriptionsfaktoren ist. Es wurde gezeigt, dass sie durch ihre Bindung die basale Expression des Tet-Promotors senken. Außerdem existieren weitere Bindungsmotive wie das cAMP responsive Element 1, das Xenobiotika responsive Element 1 sowie Bindungsstellen für AP-2, GCF, IFN- γ und LFA-1 im TRE [65]. Es ist vorstellbar, dass bei der Fülle der zellulären Regulationsmechanismen auch bisher unbekannte Faktoren das Tet-System beeinflussen. Da das Milieu innerhalb der Zelle und die vorhandenen Transkriptionsfaktoren je nach Aktivitätszustand und Differenzierungsgrad des Gewebes variieren, kann auch die Regulationskapazität des Tet-Systems zelllinienabhängig beeinflusst werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Abhängigkeit der Supprimierbarkeit von der eingesetzten m.o.i. sowie der Zelllinie, die in dieser Dissertation gezeigt werden konnte, auch in der Literatur wiedergefunden werden kann und Erklärungen für dieses Phänomen in Ansätzen existieren. Es gibt jedoch keine abschließende Sicherheit, so dass beim Einsatz von Gentherapievektoren, die das Tet-System enthalten, mit Bedacht vorgegangen werden muss.

5.5 Zukunft der Immunogenetherapie beim adrenokortikalen Karzinom

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass adrenokortikale Zelllinien mit adenoviralen Vektoren des 3r-Systems transduzierbar sind. Diese Tatsache schafft eine erste Basis für zukünftige Versuche zum Einsatz des Vektorsystems in der Therapie des ACC. Da die Therapierfolge bei diesem Karzinom mit den bisherigen Mitteln sehr limitiert sind, ist die Erforschung innovativer Konzepte dringend notwendig. Die Genterapie mit adenoviralen Vektoren, die Interleukin-12 oder -18 exprimieren und durch Tetracyclin regulierbar sind, sind hier aus mehreren Gründen erfolgversprechend: 1) Adenoviren besitzen einen Adenotropismus [114, 160, 170] und erscheinen daher neben ihren anderen positiven Vektoreigenschaften als geeignete Vektoren für die NNR. Eine genauere Untersuchung der Expression von CAR und Integrinen auf adrenokortikalen Tumoren sollte erfolgen, um diesen Aspekt weitergehend zu erforschen. 2) Es existieren mehrere Berichte über die erfolgreiche Transduktion von adrenokortikalen Tumorzellen durch adenovirale Vektoren [5, 169, 189], so dass diese Methode offensichtlich praktikabel ist. 3) Die Interleukine-12 und 18 haben ihren potenten antitumoralen Effekt in einer Vielzahl von Studien bewiesen und können dazu eingesetzt werden, die Immuntoleranz des Körpers gegenüber dem ACC zu durchbrechen [169]. Allerdings ist ihr systemischer Einsatz aufgrund der toxischen Nebenwirkungen limitiert. Daher ist es wichtig, dass sie durch ein effizientes Vektorsystem ans Ziel gebracht werden und lokal in ausreichendem Maße produziert werden. 4) Diese Eigenschaften bietet das 3r-System, das eine höhere Transgenexpression zeigt als frühere Systeme [24]. 5) Ferner bietet es als Sicherheitsmechanismus für klinische Studien die Regulierbarkeit durch kleine Dosen des Antibiotikums Doxycyclin, die im Falle toxischer Nebenwirkungen ein Herunterfahren des Systems ermöglichen. Am Kolonkarzinommodell der Maus konnte es bereits mit Erfolg eingesetzt werden und führte dort zu einer Tumorrogression [35]. 6) Die Anwesenheit einer Vielzahl von Effektorzellen des Immunsystems in der NNR ist eine gute Ausgangslage für einen immuntherapeutischen Ansatz. Wie in der Einleitung vorgestellt, gibt es für das ACC Hinweise, dass die Tumorzellen dem Immunsystem durch Escape-Mechanismen, wie der Downregulation von MHC-II Molekülen und Überexpression von FasL, entgehen können [116, 191]. Wird das Immunsystem vor Ort nun aber durch die Immuntherapie wieder aktiviert, besteht Hoffnung, dass ein solcher Therapieansatz die Immuntoleranz gegenüber dem Tumor durchbrechen kann.

Trotz der genannten positiven Aspekte, die Hoffnung auf einen erfolgreichen neuen Therapieansatz schüren, sollen auch einige kritische Punkte nicht unerwähnt bleiben: 1) Adenoviren infizieren wie bereits erwähnt eine Vielzahl von Geweben, was sie zu flexiblen und häufig genutzten Genterapievektoren macht. Allerdings können sie auch Zellen außerhalb des Tumorgewebes befallen und dort durch die Interleukinproduktion zu toxischen Nebenwirkungen führen. 2) Da für IL-12 und IL-18 eine Beteiligung an der Entstehung und Exazerbation von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Diabetes beschrieben sind [30, 67, 142, 154], ist auch die Induktion einer Autoimmunreaktion durch einen Zytokingentherapieansatz denkbar. Sangro et al. überwachten daher ihre Patienten während einer Phase-I-Studie mit einem für IL-12 kodierenden Adenovirus zur lokalen Therapie bei Tumoren des Verdauungsapparates auf Autoimmunphänomene. Klinisch konnten sie keine Symptome feststellen, jedoch zeigten mehrere Patienten eine Serokonversion für Antinukleäre Antikörper und Antikörper gegen glatte Muskulatur [159]. Die Induktion einer Autoimmunreaktion durch Immunogenetherapieansätze mit Interleukinen kann nicht ausgeschlossen werden, weshalb Patienten in Studien engmaschig überwacht werden sollten. 3) Neben den Interleukinen induzieren auch die verwendeten E1/E3-deletierten Adenoviren der ersten Generation trotz ihrer mangelnden Replikationskompetenz eine starke Immunreaktion

durch antigen wirkende Capsidproteine und virale Genprodukte [18]. Im Falle der Immunogenetherapie ist ein solcher Effekt nicht unbedingt nachteilig, es sei denn er führt zu einer schlechten Vektoreffizienz oder zu Nebenwirkungen beim Patienten. Im Jahre 1999 kam es im Rahmen einer Gentherapiestudie zur Behandlung des X-chromosomal-rezessiven Ornithin-Transcarbamylase-Mangels zu einem Todesfall, der auf ein vektorinduziertes Schocksyndrom zurückgeführt wurde, das durch die Zytokinkaskade ausgelöst worden war, die die intrahepatisch applizierten replikationsinkompetenten Adenoviren durch ihre antigenen Komponenten ausgelöst hatten [124]. Neben der gezielten lokalen Applikation und der regulierten Genexpression als Vorsichtsmaßnahmen wäre es wünschenswert weitere Möglichkeiten zu nutzen, die das Zielgewebe einschränken. Dies kann etwa durch den Einsatz von gewebespezifischen Rezeptoren oder Promotoren geschehen, wie z.B. dem von Chuman et al. beschriebenen Ansatz unter Nutzung des für die NNR spezifischen CYP11B1 Promotors [34] (s. Abschnitt 5.2). Es gibt jedoch auch Erkenntnisse, dass eine Immunantwort durch präexistente Antikörper gegen Adenovirus Typ 5, die bei der hohen Durchseuchungsrate häufig vorliegen, einen positiven Effekt haben können. Bramson et al. berichteten, dass aufgrund der schlechten Durchblutung vieler Tumoren die Immunantwort bei intratumoraler Vektorapplikation die lokale Transgenexpression an IL-12 nicht beeinflusst, aber eine Disseminierung des Virus in andere Organe verhindert und so Nebenwirkungen vorbeugen kann [26]. 4) Ferner gibt es Berichte, dass bei den Viruspräparationen in der 293-Zelllinie durch Rekombination der Virus-DNA mit der in 293-Zellen enthaltenden E1-Region von Ad5 replikationskompetente Adenoviren (RCA) entstanden sind [75]. Sie besitzen dadurch wieder eine pathogene Wirkung und sind insbesondere für immunkompromittierte Patienten ein Risiko. Daher sollten laut US-amerikanischen Vorschriften der Food and Drug Administration Viruspräparationen, die klinisch eingesetzt werden, mit sensitiven Tests auf RCA getestet werden und einen Maximalwert von 1 RCA pro 3×10^{10} Viruspartikel nicht überschreiten [52]. 5) Ein weiterer kritischer Punkt ist die Überlegung, dass die Immuntherapie des Arztes die Entstehung resistenter Tumorzellen fördern kann, indem Zellen selektiert werden, die durch Escape-Mechanismen der Therapie entgehen [44]. Dieses Risiko muss eingegangen werden, wenn entsprechende Daten vorliegen, dass der Nutzen der Therapie überwiegt. 6) Im Falle der NNR muss zudem die bereits erwähnte starke Verknüpfung zwischen dem endokrinen und dem Immunsystem bedacht werden, deren Homöostase durch einen Ansatz aus dem Bereich der Zytokingentherapie eventuell gestört werden kann (s. Abschnitt 2.3). Außerdem können auch adenovirale Vektoren selbst die Steroidbiosynthese beeinflussen [5] (s. Abschnitt 5.2). Die entsprechenden Parameter der endokrinen Regelkreise sollten während eines klinischen Gentherapieversuchs engmaschig überwacht werden.

Zur weiteren Evaluation der Vektoren des 3r-Systems in der Therapie des ACC sollte als nächster Schritt ein Test der Viren im Tierversuch durchgeführt werden. Hierbei kann das Virus in subkutan durch Y1-Zellen erzeugte Tumoren appliziert und die Effekte verschiedener Virusdosen auf das Tumorstadium evaluiert werden. Die Regulierbarkeit durch Doxycyclin *in vivo* und toxische Nebenwirkungen der produzierten Interleukine müssen getestet werden. Nach einem Rückgang der Tumoren könnte auch ein Challenge Versuch durchgeführt werden, um eine durch Interleukine erzeugte antitumorale Immunität zu überprüfen. Interessant wäre es auch, adrenokortikales Tumorgewebe auf die Expression von CAR und Integrinen zu testen, um ihre Potential für einen adenoviralen Vektor besser kennenzulernen. Es erfordert also trotz der positiven Daten, die im Rahmen dieser Dissertation bezüglich der Transduzierbarkeit von adrenokortikalen Zelllinien erhoben werden konnten, noch viele Schritte auf einem langen Weg, bevor ein auf den Vektoren des 3r-Systems basierender Therapieansatz für das ACC in der Klinik getestet werden kann.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation sollte die Anwendbarkeit des 3r-Vektorsystems auf murine und humane adrenokortikale Zelllinien *in vitro* erforschen, um seine grundsätzliche Eignung für einen neuen Therapieansatz beim adrenokortikalen Karzinom zu testen. Da diese Erkrankung derzeit mit einer schlechten Prognose einhergeht, besteht dringender Bedarf an neuen innovativen Therapiekonzepten. Die Kombination der antitumoral wirkenden Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18 mit den attraktiven Eigenschaften der hohen Transduktionseffizienz und Regulierbarkeit des 3r-Promotors in einem adenoviralen Vektorkonstrukt stellt hier eine erfolgsversprechende Möglichkeit dar.

In den zunächst durchgeführten Versuchen mit der murinen adrenokortikalen Zelllinie Y1 wurde festgestellt, dass Y1-Zellen durch Ad.3r-mscIL-12 transduzierbar sind, das Zytokin dosisabhängig produzieren und durch Doxycyclin in ihrer Produktion regulierbar sind. Im Vergleich mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 war festzustellen, dass Y1-Zellen nach Transduktion mit Ad.3r-mscIL-12 weniger Interleukin-12 produzieren und eine geringere Suppression durch Doxycyclin zeigen als HT29-Zellen. Das von transduzierten Y1-Zellen produzierte Interleukin-12 war im Bioassay in der Lage, eine dosisabhängige Stimulation von murinen Lymphozyten herbeizuführen und bewies somit seine Bioaktivität. In den Versuchen mit dem Vektor Ad.3r-mIL-18 wurde deutlich, dass dieser zwar Y1-Zellen transduzieren kann, sie *m.o.i.* abhängig Interleukin-18 produzieren und durch Doxycyclin supprimierbar sind, der Effekt jedoch nur bei einer hohen *m.o.i.* erkennbar ist und dieser Vektor im Vergleich zu Ad.3r-mscIL-12 als viel ineffizienter einzustufen ist. In einem ersten Versuch mit der humanen adrenokortikalen Zelllinie NCI-H295 konnte zunächst eine generelle Transduzierbarkeit mit Adenoviren durch die Transduktion mit dem Vektor Ad.RSV- β -Gal gezeigt werden. Dies war die Basis für die Versuche mit Viren des 3r-Systems. Es wurde deutlich, dass NCI-H295-Zellen durch das Virus Ad.3r-luc transduzierbar sind, die produzierte Luciferasemenge dosisabhängig ansteigt und durch Doxycyclin zu supprimieren ist. In einem letzten Versuch wurde bewiesen, dass auch der Vektor Ad.3r-hscIL-12, der das humane IL-12 exprimiert und damit für den Einsatz am Menschen geeignet ist, NCI-H295-Zellen *in vitro* erfolgreich transduziert, sein Transgen dosisabhängig exprimiert und durch Doxycyclin regulierbar ist.

Insgesamt konnte diese Dissertation zeigen, dass die getesteten adrenokortikalen Zelllinien durch adenovirale Vektoren des 3r-System zu transduzieren sind, eine *m.o.i.* abhängige Transgenexpression zeigen und die Transgenexpression durch das Antibiotikum Doxycyclin supprimiert werden kann. Es wurde außerdem eine Abhängigkeit der Regulationskapazität von eingesetzter *m.o.i.* und getesteter Zelllinie deutlich. Dies ist der erste Bericht über eine erfolgreiche Anwendung eines durch Tetracyclin regulierbaren Systems auf die Nebennierenrinde und bildet eine wichtige Grundlage für die weitere Erforschung dieses Ansatzes aus dem Bereich der Zytokinentherapie für das adrenokortikale Karzinom.

Literaturverzeichnis

- [1] Abbas A, Lichtman A (2003) Immunity to tumors. In: Abbas A, Lichtman A (eds.), Cellular and molecular immunology, 5th edition, 391–410. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- [2] Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Woo D, Mills B, Srour EF, Cornetta K (2000) Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6: 652–658
- [3] Ackland-Berglund CE, Leib DA (1995) Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18: 196–200
- [4] Agha-Mohammadi S, Lotze MT (2000) Regulatable systems: Applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest* 105: 1177–1183
- [5] Alesci S, Ramsey WJ, Bornstein SR, Chrousos GP, Hornsby PJ, Benvenista S, Trimarchi F, Ehrhart-Bornstein M (2002) Adenoviral vectors can impair adrenocortical steroidogenesis: Clinical implications for natural infections and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7484–7489
- [6] Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M (2004) Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 273–287
- [7] Apparailly F, Millet V, Noel D, Jacquet C, Sany J, Jorgensen C (2002) Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: Application to experimental arthritis. *Hum Gene Ther* 13: 1179–1188
- [8] Arienti F, Belli F, Napolitano F, Sulé-Suso J, Mazzocchi A, Gallino GF, Cattelan A, Santantonio C, Rivoltini L, Melani C, Colombo MP, Cascinelli N, Maio M, Parmiani G, Santantonio C (1999) Vaccination of melanoma patients with interleukin 4 gene-transduced allogeneic melanoma cells. *Hum Gene Ther* 10: 2907–2916
- [9] 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: 52–61
- [10] Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF (1998) IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 160: 3642–3647
- [11] Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H (1995) Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23: 3605–3606
- [12] Baron U, Gossen M, Bujard H (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 25: 2723–2729
- [13] Bartram C (2004) Genetische Grundlagen der Kanzerogenese, erste Edition. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram C (eds.), Die Onkologie, volume 1, 75–146. Springer Verlag

- [14] Bazan JF, Timans JC, Kastelein RA (1996) A newly defined interleukin-1? *Nature* 379: 591–591
- [15] 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: 1320–1323
- [16] Bernard MH, Sidhu S, Berger N, Peix JL, Marsh DJ, Robinson BG, Gaston V, Le Bouc Y, Gicquel C (2003) A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 998–1001
- [17] Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porphiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L (2005) Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: A large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 12: 657–666
- [18] Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC (2004) Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 11 Suppl 1: S10–17
- [19] 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 U S A* 91: 8802–8806
- [20] Billiau A, Heremans H, Vermeire K, Matthys P (1998) Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann N Y Acad Sci* 856: 22–32
- [21] Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235–248
- [22] Blaese RM (1991) Progress toward gene therapy. *Clin Immunol Immunopathol* 61: S47–55
- [23] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475–480
- [24] Block A, Puls F, Müller J, Milasinovic D, Igelmann D, Schäfer P, Kupfermann N, Schmoldt A, Ameis D, Greten H (2003) Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system. *J Gene Med* 5: 190–200
- [25] Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, Giovarelli M, Rossi I, Nanni P, De Giovanni C, Bouchard P, Wolf S, Modesti A, Musiani P, Lollini PL, Colombo MP, Forni G (1998) Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 188: 589–596
- [26] 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 Ther* 4: 1069–1076
- [27] Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK (1995) Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 17: 71–77
- [28] 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
- [29] Buonassisi V, Sato G, Cohen AI (1962) Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1184–1190

- [30] Car BD, Eng VM, Lipman JM, Anderson TD (1999) The toxicology of interleukin-12: A review. *Toxicol Pathol* 27: 58–63
- [31] Cardoso A (2000) Antitumor immunity as therapy for human cancer. In: Bronchud M (ed.), *Principles of Molecular Oncology*, 1st edition, 359–394. Humana Press, Totowa, NJ
- [32] Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, Xu B, Kosai KI, Finegold M, Woo SL, Chen SH (1996) Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11302–11306
- [33] Cavallo F, Di Carlo E, Butera M, Verrua R, Colombo MP, Musiani P, Forni G (1999) Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Res* 59: 414–421
- [34] Chuman Y, Zhan Z, Fojo T (2000) Construction of gene therapy vectors targeting adrenocortical cells: Enhancement of activity and specificity with agents modulating the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 253–262
- [35] Cinar S (2006). Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare Zytokingenexpression für die In-vivo-Gentherapie kolorektaler Karzinome. Med. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- [36] Clayman GL, Frank DK, Brusio PA, Goepfert H (1999) Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 5: 1715–1722
- [37] Colombo MP, Vagliani M, Spreafico F, Parenza M, Chiodoni C, Melani C, Stoppacciaro A (1996) Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression. *Cancer Res* 56: 2531–2534
- [38] Conti B, Jahng JW, Tinti C, Son JH, Joh TH (1997) Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem* 272: 2035–2037
- [39] Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1277–1287
- [40] Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM (1998) Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 101: 1441–1452
- [41] Coughlin CM, Wysocka M, Trinchieri G, Lee WM (1997) The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer Res* 57: 2460–2467
- [42] Dinarello CA (1999) Interleukin-18. *Methods* 19: 121–132
- [43] Dumortier J, Schönig K, Oberwinkler H, Löw R, Giese T, Bujard H, Schirmacher P, Protzer U (2005) Liver-specific expression of interferon gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice. *Gene Ther* 12: 668–677
- [44] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137–148
- [45] Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19: 101–143
- [46] Ehrlich, P (1909) Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5: 273–290

- [47] Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP (1996) Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: Clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 374–381
- [48] Endo S, Zeng Q, Burke NA, He Y, Melhem MF, Watkins SF, Lango MN, Drenning SD, Huang L, Rubin Grandis J (2000) TGF- α antisense gene therapy inhibits head and neck squamous cell carcinoma growth in vivo. *Gene Ther* 7: 1906–1914
- [49] Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767
- [50] Fechner H, Wang X, Picó AH, Wildner J, Suckau L, Pinkert S, Sipo I, Weger S, Poller W (2007) A bidirectional Tet-dependent promoter construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication. *J Biotechnol* 127: 560–574
- [51] FIRM-ACT (2007). First international randomized trial in locally advanced and metastatic adrenocortical carcinoma treatment. <http://www.firm-act.org/>
- [52] Food and Drug Administration, Biological Response Modifiers Advisory Committee (2001). BR-MAC meeting # 30: Adenovirus titer measurements and RCA levels. <http://www.fda.gov/>
- [53] Gambotto A, Tüting T, McVey DL, Kovesdi I, Tahara H, Lotze MT, Robbins PD (1999) Induction of antitumor immunity by direct intratumoral injection of a recombinant adenovirus vector expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther* 6: 45–53
- [54] Gately MK, Wilson DE, Wong HL (1986) Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL 2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses in vitro. *J Immunol* 136: 1274–1282
- [55] Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV (1990) Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50: 5488–5496
- [56] Gene Medicine (2007). Gene therapy clinical trials worldwide. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>
- [57] Gerloni M, Zanetti M (2005) CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* 27: 37–48
- [58] Germano IM, Fable J, Gultekin SH, Silvers A (2003) Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: Preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 65: 279–289
- [59] Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H (1997) Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. *Nature* 386: 619–623
- [60] Gill G, Ptashne M (1988) Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 334: 721–724
- [61] Goldsmith ME, Kitazono M, Fok P, Aikou T, Bates S, Fojo T (2003) The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells. *Clin Cancer Res* 9: 5394–5401
- [62] Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, McDermott DF, Clancy D, Clancy M, Atkins MB (2000) Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: Ability to maintain IFN- γ induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res* 6: 1678–1692

- [63] Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547–5551
- [64] Gottesman MM (2003) Cancer gene therapy: An awkward adolescence. *Cancer Gene Ther* 10: 501–508
- [65] Gould DJ, Chernajovsky Y (2004) Endogenous GATA factors bind the core sequence of the tetO and influence gene regulation with the tetracycline system. *Mol Ther* 10: 127–138
- [66] Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG (2005) Regula-ble gene expression systems for gene therapy applications: Progress and future challenges. *Mol Ther* 12: 189–211
- [67] Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB (1999) A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 104: 1393–1401
- [68] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transfor-med by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59–74
- [69] Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC, Puccetti P (1998) IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 9: 315–323
- [70] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997) Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275: 206–209
- [71] Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC (1991) Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4143–4147
- [72] Habib NA, Hodgson HJ, Lemoine N, Pignatelli M (1999) A phase I/II study of hepatic artery infusion with wtp53-CMV-Ad in metastatic malignant liver tumours. *Hum Gene Ther* 10: 2019–2034
- [73] Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70
- [74] Hara S, Nagai H, Miyake H, Yamanaka K, Arakawa S, Ichihashi M, Kamidono S, Hara I (2001) Secreted type of modified interleukin-18 gene transduced into mouse renal cell carcinoma cells induces systemic tumor immunity. *J Urol* 165: 2039–2043
- [75] Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC (1996) Mole-cular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modi-fications to prevent their occurrence. *J Virol* 70: 8459–8467
- [76] 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. *Hum Gene Ther* 16: 35–48
- [77] van Herpen CM, Looman M, Zonneveld M, Scharenborg N, de Wilde PC, van de Locht L, Merckx MAW, Adema GJ, de Mulder PH (2004) Intratumoral administration of recombinant human in-terleukin 12 in head and neck squamous cell carcinoma patients elicits a T-helper 1 profile in the locoregional lymph nodes. *Clin Cancer Res* 10: 2626–2635

- [78] Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, Kaubisch A, Vahdat L, Balmaceda C, Garrett T, Fetell M, Reiss R, Bank A, Antman K (1998) Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 16: 165–172
- [79] Heuer JG, Tucker-McClung C, Hock RA (1999) Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response. *J Immunother (1997)* 22: 324–335
- [80] Hillen W, Berens C (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48: 345–369
- [81] Hitt MM, Graham FL (2000) Adenovirus vectors for human gene therapy. *Adv Virus Res* 55: 479–505
- [82] Horwitz M (2001) Adenoviruses. In: Fields B, Knipe D (eds.), *Fields Virology*, 4th edition, volume 2, 2301–2327. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [83] Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K (2001) Cutting edge: IL-18-transgenic mice: In vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J Immunol* 166: 7014–7018
- [84] Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA, Schmauss C (1995) The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J Biol Chem* 270: 14168–14174
- [85] Hsing AW, Nam JM, Co Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JF (1996) Risk factors for adrenal cancer: An exploratory study. *Int J Cancer* 65: 432–436
- [86] Huang S, Endo RI, Nemerow GR (1995) Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* 69: 2257–2263
- [87] Hurteau JA, Blessing JA, DeCesare SL, Creasman WT (2001) Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 82: 7–10
- [88] Imagawa Y, Satake K, Kato Y, Tahara H, Tsukuda M (2004) Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin 12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. *Auris Nasus Larynx* 31: 239–245
- [89] International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–45
- [90] Kang BY, Kim E, Kim TS (2005) Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cell Signal* 17: 665–673
- [91] Kang WK, Park C, Yoon HL, Kim WS, Yoon SS, Lee MH, Park K, Kim K, Jeong HS, Kim JA, Nam SJ, Yang JH, Son YI, Baek CH, Han J, Ree HJ, Lee ES, Kim SH, Kim DW, Ahn YC, Huh SJ, Choe YH, Lee JH, Park MH, Kong GS, Park EY, Kang YK, Bang YJ, Paik NS, Lee SN, Kim SH, Kim S, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT, Park CH (2001) Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: Outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 12: 671–684
- [92] Kaufman HL, Deraffe G, Mitcham J, Moroziewicz D, Cohen SM, Hurst-Wicker KS, Cheung K, Lee DS, Divito J, Voulo M, Donovan J, Dolan K, Manson K, Panicali D, Wang E, Hörig H, Marincola FM (2005) Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest* 115: 1903–1912

- [93] Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B (2000) Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: Long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol* 11: 1281–1287
- [94] Khorana AA, Rosenblatt JD, Sahasrabudhe DM, Evans T, Ladrigan M, Marquis D, Rosell K, Whiteside T, Phillippe S, Acres B, Slos P, Squiban P, Ross M, Kendra K (2003) A phase I trial of immunotherapy with intratumoral adenovirus-interferon-gamma (TG1041) in patients with malignant melanoma. *Cancer Gene Ther* 10: 251–259
- [95] Kim KS, Kim DS, Chung KH, Park YS (2006) Inhibition of angiogenesis and tumor progression by hydrodynamic cotransfection of angiostatin K1-3, endostatin, and saxatilin genes. *Cancer Gene Ther* 13: 563–571
- [96] Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761, 763
- [97] Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M (1996) Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 56: 4219–4223
- [98] von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M, Fogh J (1975) Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst* 55: 555–560
- [99] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170: 827–845
- [100] Koch CA, Pacak K, Chrousos GP (2002) The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5367–5384
- [101] Kresina T, Branch A (2001) Molecular medicine and gene therapy: An introduction. In: Kresina T (ed.), *An introduction to molecular medicine and gene therapy*, 1–24. Wiley-Liss, New York
- [102] Kubo H, Gardner TA, Wada Y, Koeneman KS, Gotoh A, Yang L, Kao C, Lim SD, Amin MB, Yang H, Black ME, Matsubara S, Nakagawa M, Gillenwater JY, Zhou HE, Chung LWK (2003) Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Hum Gene Ther* 14: 227–241
- [103] Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15–16
- [104] Lee YB, Glover CPJ, Cosgrave AS, Bienemann A, Uney JB (2004) Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol* 90: 33–37
- [105] Lehninger A, Nelson D, Cox M (1994) *Prinzipien der Biochemie*, zweite Edition, 23. Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- [106] Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL (1997) Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90: 2541–2548
- [107] Li D, Duan L, Freimuth P, O'Malley BW (1999) Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5: 4175–4181
- [108] Li L, Yuan YZ, Lu J, Xia L, Zhu Y, Zhang YP, Qiao MM (2006) Treatment of pancreatic carcinoma by adenoviral mediated gene transfer of vasostatin in mice. *Gut* 55: 259–265

- [109] Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, Wang Z, Hsieh JT (1999) Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: A potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 59: 325–330
- [110] Li ZB, Zeng ZJ, Chen Q, Luo SQ, Hu WX (2006) Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer* 6: 66
- [111] Loeb LA (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61: 3230–3239
- [112] Louis N, Eveleigh C, Graham FL (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233: 423–429
- [113] MacFarlane DA (1958) Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl* 23: 155–186
- [114] Margolis G, Kilham L, Hoenig EM (1974) Experimental adenovirus infection of the mouse adrenal gland. I. Light microscopic observations. *Am J Pathol* 75: 363–374
- [115] Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW, Peter M, Sippell WG, Scherbaum WA (1997) Relevance of major histocompatibility complex class II expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3136–3140
- [116] Marx C, Wolkersdörfer GW, Brown JW, Scherbaum WA, Bornstein SR (1996) MHC class II expression—a new tool to assess dignity in adrenocortical tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4488–4491
- [117] McLoughlin JM, McCarty TM, Cunningham C, Clark V, Senzer N, Nemunaitis J, Kuhn JA (2005) TNFerade, an adenovector carrying the transgene for human tumor necrosis factor alpha, for patients with advanced solid tumors: Surgical experience and long-term follow-up. *Ann Surg Oncol* 12: 825–830
- [118] McNicol AM (1986) Class II MHC antigen expression in adrenal cortex. *Lancet* 2: 1282–1282
- [119] Micallef MJ, Yoshida K, Kawai S, Hanaya T, Kohno K, Arai S, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M (1997) In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol Immunother* 43: 361–367
- [120] Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ (1998) Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 541–562
- [121] Miura Y, Ohnami S, Yoshida K, Ohashi M, Nakano M, Ohnami S, Fukuhara M, Yanagi K, Matsushita A, Uchida E, Asaka M, Yoshida T, Aoki K (2005) Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. *Cancer Lett* 218: 53–62
- [122] Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, Nemunaitis J, Murphy BA, Ellerhorst J, Schwartz LH, Berg WJ, Bukowski RM (2001) Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 21: 257–263
- [123] National Cancer Institute (1975) Third National Cancer Survey: Incidence data. Natl Cancer Inst Monogr 41. DHEW publication no. 75-787, Bethesda
- [124] National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee (2002) Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: Report of the NIH Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum Gene Ther* 13: 3–13

- [125] 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: 2429–2436
- [126] Naume B, Johnsen AC, Espevik T, Sundan A (1993) Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. *Eur J Immunol* 23: 1831–1838
- [127] Niola F, Evangelisti C, Campagnolo L, Massalini S, Buè MC, Mangiola A, Masotti A, Maira G, Farace MG, Ciafrè SA (2006) A Plasmid-Encoded VEGF siRNA Reduces Glioblastoma Angiogenesis and Its Combination with Interleukin-4 Blocks Tumor Growth in a Xenograft Mouse Model. *Cancer Biol Ther* 5: 174–179
- [128] Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ (1996) Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11798–11801
- [129] Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H (1998) The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics* 51: 161–163
- [130] Ochsenein A (2005) Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol* 27: 19–35
- [131] Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S (1995) A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 63: 3966–3972
- [132] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88–91
- [133] Okegawa T, Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Zhou J, Hsieh JT (2000) The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res* 60: 5031–5036
- [134] Ortmann D, Hausmann J, Beuschlein F, Schmenger K, Stahl M, Geissler M, Reincke M (2004) Steroidogenic acute regulatory (StAR)-directed immunotherapy protects against tumor growth of StAR-expressing Sp2-0 cells in a rodent adrenocortical carcinoma model. *Endocrinology* 145: 1760–1766
- [135] Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H (1999) Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 6: 808–815
- [136] Osaki T, Péron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H (1998) IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 160: 1742–1749
- [137] 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: 240–253
- [138] Papewalis C, Fassnacht M, Willenberg HS, Domberg J, Fenk R, Rohr UP, Schinner S, Bornstein SR, Scherbaum WA, Schott M (2006) Dendritic cells as potential adjuvant for immunotherapy in adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 215–222

- [139] Parker Ponder K (2001) Vectors of gene therapy. In: Kresina T (ed.), *An introduction to molecular medicine and gene therapy*, 77–112. Wiley-Liss, New York
- [140] Pawelec G (2004) Tumour escape: Antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 53: 262–274
- [141] Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Stermann D, Marshall JL, Goldberg S, Gross P, O'Neil JD, Groene WS, Roberts MS, Rabin H, Bamat MK, Lorence RM (2002) Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* 20: 2251–2266
- [142] Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F (1999) IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162: 6829–6835
- [143] Prinz M, Hanisch UK (1999) Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem* 72: 2215–2218
- [144] Puls F (2004). Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression. Med. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- [145] Rainey WE, Saner K, Schimmer BP (2004) Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 228: 23–38
- [146] Rang A, Will H (2000) The tetracycline-responsive promoter contains functional interferon-inducible response elements. *Nucleic Acids Res* 28: 1120–1125
- [147] Régulier E, Pereira de Almeida L, Sommer B, Aebischer P, Déglon N (2002) Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 13: 1981–1990
- [148] Reid TR, Freeman S, Post L, McCormick F, Sze DY (2005) Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin. *Cancer Gene Ther* 12: 673–681
- [149] Ren H, Boulikas T, Lundstrom K, Söling A, Warnke PC, Rainov NG (2003) Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene—a phase I/II clinical protocol. *J Neurooncol* 64: 147–154
- [150] Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A (2000) Latest developments in gene transfer technology: Achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18: 19–39
- [151] Romano G, Pacilio C, Giordano A (1999) Gene transfer technology in therapy: Current applications and future goals. *Stem Cells* 17: 191–202
- [152] Rook AH, Wood GS, Yoo EK, Elenitsas R, Kao DM, Sherman ML, Witmer WK, Rockwell KA, Shane RB, Lessin SR, Vonderheid EC (1999) Interleukin-12 therapy of cutaneous T-cell lymphoma induces lesion regression and cytotoxic T-cell responses. *Blood* 94: 902–908
- [153] Roth JA, Cristiano RJ (1997) Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89: 21–39
- [154] Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H (1997) Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 99: 469–474

- [155] Rubinchik S, Lowe S, Jia Z, Norris J, Dong J (2001) Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters. *Gene Ther* 8: 247–253
- [156] Russell WC (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81: 2573–2604
- [157] Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335: 563–564
- [158] Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning, a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- [159] Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olagüe C, Sola J, Sádaba 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: 1389–1397
- [160] Schachtner S, Buck C, Bergelson J, Baldwin H (1999) Temporally regulated expression patterns following in utero adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 6: 1249–1257
- [161] Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK, Gubler U (1992) Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* 148: 3433–3440
- [162] Schteingart DE (2000) Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. *Braz J Med Biol Res* 33: 1197–1200
- [163] Sekiyama A, Ueda H, Kashiwamura Si, Nishida K, Kawai K, Teshima-kondo S, Rokutan K, Okamura H (2005) IL-18; a cytokine translates a stress into medical science. *J Med Invest* 52 Suppl: 236–239
- [164] Sergi B, Penttilä I (2004) Interleukin 18 receptor. *J Biol Regul Homeost Agents* 18: 55–61
- [165] Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G (1996) Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87: 3877–3882
- [166] Shenk T (2001) Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D (eds.), *Fields Virology*, 4th edition, volume 2, 2265–2300. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [167] Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG (1995) A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6522–6526
- [168] Sidhu S, Sywak M, Robinson B, Delbridge L (2004) Adrenocortical cancer: Recent clinical and molecular advances. *Curr Opin Oncol* 16: 13–18
- [169] Starke S (2003). Adenovirale Gentherapie des murinen adrenokortikalen Karzinoms - in vitro und in vivo-. Med. Dissertation. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- [170] Stauber E, Card C (1978) Experimental intraamniotic exposure of bovine fetuses with subgroup 2, type 7 Adenovirus. *Can J Comp Med* 42: 466–472
- [171] Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH (1998) Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28: 3231–3239
- [172] Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, Okamura H, Knop J, Enk AH (1997) Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* 159: 298–302

- [173] Stratford-Perricaudet L, Makeh I, Perricaudet M, Briand P (1992) Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 90: 626–30
- [174] Strathdee CA, McLeod MR, Hall JR (1999) Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229: 21–29
- [175] Sullivan M, Boileau M, Hodges CV (1978) Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 120: 660–665
- [176] Sun Y, Jurgovsky K, Möller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D (1998) Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: Preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 5: 481–490
- [177] Tahara H, Zeh HJ, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT (1994) Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 54: 182–189
- [178] Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Zeh HJ, McKinney TG, Schreiber RD, Gubler U, Robbins PD, Lotze MT (1995) Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* 154: 6466–6474
- [179] Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K (2000) IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 β for IFN- γ production from human T cells. *Int Immunol* 12: 151–160
- [180] Tomko RP, Xu R, Philipson L (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3352–3356
- [181] Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 2: 718–729
- [182] Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133–146
- [183] Trudel S, Trachtenberg J, Toi A, Sweet J, Li ZH, Jewett M, Tshilias J, Zhuang LH, Hitt M, Wan Y, Gaudie 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 Ther* 10: 755–763
- [184] Tsai CH, Hong JH, Hsieh KF, Hsiao HW, Chuang WL, Lee CC, McBride WH, Chiang CS (2006) Tetracycline-regulated intratumoral expression of interleukin-3 enhances the efficacy of radiation therapy for murine prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 13: 1082–1092
- [185] Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT (1997) Interleukin-18 (interferon- γ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 185: 1005–1012
- [186] Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M (1996) Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 156: 4274–4279
- [187] Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA (2000) Adrenocortical carcinoma: Clinical and laboratory observations. *Cancer* 88: 711–736

- [188] Wallace ME, Smyth MJ (2005) The role of natural killer cells in tumor control—effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol* 27: 49–64
- [189] Wolkersdörfer GW, Bornstein SR, Higginbotham JN, Hiroi N, Vaquero JJ, Green MV, Blaese RM, Aguilera G, Chrousos GP, Ramsey WJ (2002) A novel approach using transcomplementing adenoviral vectors for gene therapy of adrenocortical cancer. *Horm Metab Res* 34: 279–287
- [190] Wolkersdörfer GW, Lohmann T, Marx C, Schröder S, Pfeiffer R, Stahl HD, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR (1999) Lymphocytes stimulate dehydroepiandrosterone production through direct cellular contact with adrenal zona reticularis cells: A novel mechanism of immune-endocrine interaction. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4220–4227
- [191] Wolkersdörfer GW, Marx C, Brown J, Schröder S, Füssel M, Rieber EP, Kuhlisch E, Ehninger G, Bornstein SR (2005) Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1768–1774
- [192] Wong HL, Wilson DE, Jenson JC, Familletti PC, Stremlo DL, Gately MK (1988) Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allogeneic human cytolytic T-lymphocyte responses in vitro. *Cell Immunol* 111: 39–54
- [193] Wulff H (2001). Induzierbare adenovirale Genexpression von murinem Interleukin 18. Diplomarbeit. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg/Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- [194] Wulff H, Krieger T, Krüger K, Stahmer I, Thaiss F, Schäfer H, Block A (2007) Cloning and characterization of an adenoviral vector for highly efficient and doxycycline-suppressible expression of bioactive human single-chain interleukin 12 in colon cancer. *BMC Biotechnol* 7: 35–35
- [195] Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY (1998) Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188: 1485–1492
- [196] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: Synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161: 3400–3407
- [197] Yu WG, Yamamoto N, Takenaka H, Mu J, Tai XG, Zou JP, Ogawa M, Tsutsui T, Wijesuriya R, Yoshida R, Herrmann S, Fujiwara H, Hamaoka T (1996) Molecular mechanisms underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int Immunol* 8: 855–865
- [198] Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Hillen W, Qian C, Prieto J, Kramer MG (2004) Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Res* 64: 2799–2804
- [199] Zhang Y, Mukhopadhyay T, Donehower LA, Georges RN, Roth JA (1993) Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. *Hum Gene Ther* 4: 451–460
- [200] Zheng SY, Li DC, Zhang ZD, Zhao J, Ge JF (2005) Adenovirus-mediated FasL gene transfer into human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 11: 3446–3450

Abbildungsverzeichnis

2.1	Direkte und Interferon- γ vermittelte antitumorale Effekte von Interleukin-12	17
2.2	Gemeinsame Effekte von Interleukin-18 und Interleukin-12	19
2.3	Die Entwicklung des Tet-Systems	22
3.1	Photo einer Virusbande	31
3.2	Photos vom Plaque-Assay	33
4.1	Interleukin-12 Produktion von mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierten Y1-Zellen	43
4.2	Interleukin-12 Produktion von mit Ad.3r-mscIL-12 transduzierten HT29-Zellen	44
4.3	Interferon- γ Produktion von mit IL-12 stimulierten murinen Lymphozyten	45
4.4	Interleukin-18 Produktion von mit Ad.3r-mIL-18 transduzierten Y1-Zellen	47
4.5	Interleukin-18 Produktion von mit Ad.3r-mIL-18 transduzierten HT29-Zellen	48
4.6	Photos von NCI-H295-Zellen	49
4.7	Vorversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen . .	51
4.8	Hauptversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen	52
4.9	Nachversuch: Luciferaseproduktion von mit Ad.3r-luc transduzierten NCI-H295-Zellen .	53
4.10	Interleukin-12 Produktion von mit Ad.3r-hscIL-12 transduzierten NCI-H295-Zellen . . .	56
4.11	Suppression der Transgenexpression durch Doxycyclin in Abhängigkeit von der m.o.i. .	57
A.1	Plasmidkarten der Expressionsplasmide des 3r-Systems	86

A

Anhang

A.1 Plasmidkarten der Expressionsplasmide

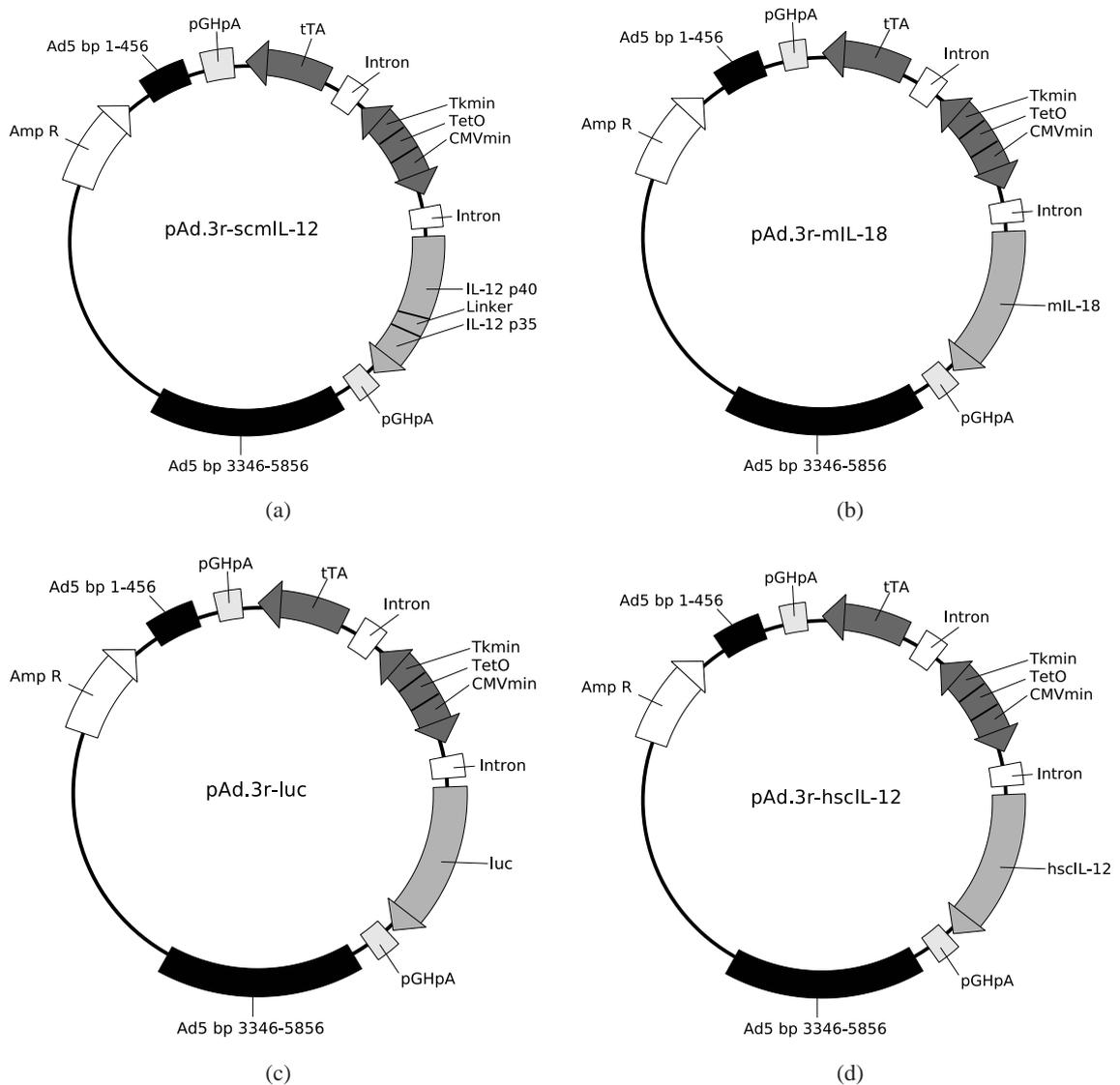


Abbildung A.1: Plasmidkarten der Expressionsplasmide des 3r-Systems. Amp R: Ampicillin-resistenz-Gen, Ad5: Adenovirus Typ 5, bGHpA: poly-A des bovinen Wachstumshormon-(GH)Gens, tTA: Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator, TKmin: minimaler Tyrosinkinase Promotor, TetO: Tet-Operator, CMVmin: minimaler Cytomegalie Virus Promotor

A.2 Abkürzungsverzeichnis

Für Abkürzungen, die aus der englischen Sprache übernommen sind und sich nur aus dieser ableiten lassen, ist die englische Erklärung angegeben, ansonsten die deutsche.

Abkürzung	Erklärung
8-Br-cAMP	8-Bromo-Adenosin-3', 5'-zyklisches-Adenosin-Monophosphat
+/-	mit und ohne
AAV	adeno-assoziierte Viren
ACC	adrenocortical cancer
ACTH	adrenocorticotropic hormone
Ad	Adenovirus
ADA-SCID	adenosine deaminase deficiency - severe combined immune deficiency
AG	Arbeitsgruppe
Amp R	Ampicillinresistenz-Gen
AP	aktivierendes Protein
APC	antigen presenting cell
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BACC	bovine adrenal cortical cells
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
β -Gal	β -Galaktosidase
bGHpA	poly-A des bovinen Wachstumshormon-(GH)Gens
bp	Basenpaar
CAR	Cocksackie/Adenovirus Rezeptor
CCLR	cell culture lysis reagent
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie Virus
CsCl	Cäsiumchlorid
CT	Computertomographie
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
d	destilliert
DC	dendritic cell
DNA	desoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	early
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FasL	Fas Ligand
FCS	fetal calf serum
FIRM-ACT	First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment
GCF	GC-rich sequence DNA-binding factor
GI	gastrointestinal
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, human
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HEK	humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure

Abkürzung	Erklärung
HGDMEM	high glucose Dulbecco's modified eagle medium
HLA	humane Leukozytenantigene
HS	horse serum
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insuline-like growth factor
IL	Interleukin
IL-18R α	IL-18 bindende Kette (des IL-18 Rezeptors)
IL-18R β	akzessorisches proteinähnliches Molekül (des IL-18 Rezeptors)
i.p.	intraperitoneal
IP	interferon-induzierbares Protein
IRAK	IL-1 Rezeptor aktivierende Kinase
ITR	invertierte terminale Repeatsequenzen
JAK	Janus Kinasen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LFA	Leukozyten-Funktions-Antigen
luc	Luciferase
m	murin, Meter, milli
MDR	multi drug resistance
MEM	modified eagle medium
MHC	major histocompatibility complex
m.o.i.	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MyD	myeloid differentiation primary response gene
NCI	National Cancer Institute
NF	nukleärer Faktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NNR	Nebennierenrinde
NO	nitric oxide
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid
p	Plasmid, pico
P450 _{scc}	P450 side chain cleavage
PBS	phosphate-buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pfu	plaque forming unit
PGE	Prostaglandin E
PS	packaging sequence
PSG	pregnancy-specific β -1-glycoprotein
RCA	replication-competent adenovirus
rlu	relative light units
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarkoma Virus
S	Sicherheitsstufe
sc	single chain
siRNA	short interfering RNA
StAR	Steroidogenic acute regulatory
STAT	signal transducer and activator of transcription

Abkürzung	Erklärung
Tc	Tetracyclin
Tet	Tetracyclin
TetO	Tet-Operator
TetR	Tet-Repressor
TIF	trans inducing factor
TGF	transforming growth factor
Th	T Helfer
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen
TPA	Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	Tetracyclin responsives Element
Treg	T regulatorisch
tTA	Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
UV	ultraviolett
VA RNA	virusassoziierte RNA
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP	Virales Protein
w/o	without
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christoph M. Bamberger für die Ermöglichung dieser Dissertation. Die verlässliche Zusammenarbeit und der positive Rückhalt während aller Projektphasen waren essentiell für den Erfolg der Arbeit.

Mein Dank gilt zudem Herrn Dr. Andreas Block für die Bereitstellung der Vektoren des 3r-Systems, die in seiner Arbeitsgruppe entstanden sind und ohne welche diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Seine Betreuung im Labor, die tatkräftige Hilfe bei allen Fragen und Problemen sowie sein positives Engagement waren mir eine große Unterstützung. In diesem Rahmen danke ich auch Herrn Dr. Florian Puls und Herrn Dr. Holger Wulff, die die Klonierung der verwendeten Viren durchgeführt haben.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Hans-Joachim Paust danken. Unsere langen Gespräche und Diskussionen, die er mit großem Interesse am Detail und gezieltem Nachhaken führte, waren stets ein Gedankenanstoß und brachten mir viel über wissenschaftliches Denken und Arbeiten bei.

Herrn Dr. Holger Wulff kommt ein besonderer Dank zu. Er führte mich nicht nur in die Arbeitstechniken mit Adenoviren ein, sondern hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen rund ums Labor. Auf seine immense Hilfsbereitschaft und die guten Ratschläge war immer Verlass.

Sehr herzlich danke ich auch Frau Doris Pankoke. Als MTA in unserem Labor brachte sie mir vieles über die grundlegenden Arbeitstechniken bei und war mir mit ihrer Erfahrung eine große Unterstützung. Trotz aller Arbeit hatte sie stets ein offenes Ohr für die kleinen und großen Probleme der Doktoranden.

Bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe sowie der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Henning Wege bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und den positiven Austausch. Dabei seien insbesondere Frau Dr. Seda Cinar, Frau Dr. Wibke Flürenbrock, Herr Dr. Björn Haker und Frau Nadine Knuth erwähnt. Ohne sie wäre der Alltag im Labor weniger abwechslungsreich gewesen.

Für ihre tolle Freundschaft und die ereignisreiche und unvergessliche Studienzeit, die wir miteinander erlebt haben, danke ich meinen Kommilitonen Anna Klein, Mareike Koch, Martin Ganssaue und Alexander von Thomsen. Viele Schritte sind einfacher, wenn man sie nicht allein gehen muss.

Schließlich gilt ein großer Dank meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Sie ermöglichten mir das Medizinstudium und gaben mir den nötigen Rückhalt und die Kraft, die mich über so manches hinweggetragen haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Sebastian. Die Abbildungen und das gesamte Layout der vorliegenden Arbeit sähen ohne ihn deutlich schlechter aus. Er hat mich auf diesem langen Weg begleitet, steht jederzeit hinter und neben mir und ist der Mensch, mit dem gemeinsam ich in eine Richtung blicken kann.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verena Boßung, geb. Pannecke

Geboren: 16. November 1980 in Stade

Schulausbildung

08/1987 – 07/1991 Grundschule Vahrendorf, Rosengarten

10/1991 – 07/1995 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg

10/1995 – 07/1997 Waldschule Schwanewede, Gymnasium, Schwanewede

08/1997 – 07/1998 Rapid City Christian High School, Rapid City, SD, USA

Austauschjahr im Rahmen eines Stipendiums des Deutschen Bundestages

08/1998 – 06/2000 Waldschule Schwanewede, Gymnasium, Schwanewede

28/06/2000 Abitur

Hochschulausbildung

10/2000 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg

05/2000 – 07/2000 Pflegepraktikum in der Pädiatrie, Krankenhaus Mariahilf, Hamburg

09/2002 Ärztliche Vorprüfung

02/2003 – 03/2003 Famulatur in der Inneren Medizin, Zentralkrankenhaus Bremen-Nord, Bremen

07/2004 – 08/2004 Famulatur in der Pädiatrie. Blackhills Pediatrics and Neonatology, Rapid City, USA

07/2005 – 08/2005 Famulatur in der Pädiatrie, Professor-Hess-Kinderklinik, Bremen

08/2005 – 09/2005 Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Marienkrankenhaus, Hamburg

02/2006 – 01/2007 Praktisches Jahr:

Innere Medizin/Gastroenterologie (Teil 1) – UKE, Hamburg

Innere Medizin/Endokrinologie (Teil 2) – Wrexham Maelor Hospital, Wales

Gynäkologie und Geburtshilfe – Marienkrankenhaus, Hamburg

Chirurgie – Spital Schwyz, Schweiz

19/06/2007 Ärztliche Prüfung

05/07/2007 Approbation als Ärztin

Erklärung

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

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

Verena Boßung