

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:  
Molekulare Zellbiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel  
Arbeitsgruppe Gentherapie

Expressionsstatus und funktionelle Analyse des  
Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptors in  
Tumoren der humanen Leber.

## **DISSERTATION**

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

**Jan Simon Dolezil**

aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 15.02.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Nashan

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. ARBEITSHYPOTHESE</b> .....	<b>6</b>
<b>B. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>I. GENTHERAPIE</b> .....	<b>8</b>
1. Vektoren in der Gentherapie .....	9
2. Adenovirale Gentherapie .....	10
3. Der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor .....	13
<b>II. HUMANE NEOPLASIEN UND THERAPIEOPTIONEN</b> .....	<b>18</b>
1. Das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) .....	18
2. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) .....	21
3. Lebermetastasen Kolorektaler Karzinome .....	23
<b>III. ZIELSETZUNG</b> .....	<b>25</b>
1. Etablierung einer Färbung auf den CAR .....	25
2. Untersuchung des CAR Expressionsstatus an Zellkulturen verschiedener Karzinome .....	26
3. Untersuchung des CAR Expressionsstatus an humanen Karzinomen	26
4. CAR Status und Infizierbarkeit humaner Tumorzelllinien .....	26
5. Kolokalisation des CAR mit dem <i>tight junction</i> Marker ZO-1 .....	27
<b>C. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
<b>I. CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN</b> .....	<b>28</b>
1. Zellkultur .....	28
2. Chemikalien .....	28
<b>II. BIOLOGISCHE REAGENZIEN</b> .....	<b>29</b>
1. Antikörper und Sera .....	29
2. Adenovirus Ad-GFP .....	30
3. Kommerzielle Testkits .....	30
<b>III. GLASWARE, PLASTIKWARE UND LABORGERÄTE</b> .....	<b>30</b>
<b>IV. VERWENDETES UNTERSUCHUNGSGUT</b> .....	<b>34</b>
1. Zellkulturen .....	34
2. Kryoblöcke von Tumorgewebe .....	34

<b>V. BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE ANALYSEN</b> .....	<b>35</b>
1. Zellkultur .....	35
a) Auftauen von Zellen .....	35
b) Einfrieren von Zellen .....	36
c) Routinekultur und Passagieren von Zellen .....	36
2. Anfertigung von Kryoschnitten .....	38
3. Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Zellen .....	38
4. Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Kryoschnitten von Tumorgewebe .....	41
5. Kolokalisation von CAR und ZO-1 .....	43
a) An Zellkulturen .....	43
b) An Kryoschnitten von Tumorgewebe.....	44
6. Infektion der Zellkulturen mit Ad-GFP .....	44
7. Quantifizierung von GFP-transfizierten Zellen mittels Durchflußzytometrie .....	48
<b>D. ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
I. ETABLIERUNG DER CAR-IMMUNLOKALISATION .....	49
II. CAR-STATUS UND INFIZIERBARKEIT HUMANER TUMORZELLINIEN .....	50
III. CAR-EXPRESSION IN HUMANEN KARZINOMEN .....	56
1. Analyse der CAR-Expression im CCC .....	56
2. Analyse der CAR-Expression im HCC .....	58
3. Analyse der CAR-Expression in Lebermetastasen Kolorektaler Karzinome .....	60
IV. KOLOKALISATION VON CAR UND ZO-1 .....	62
1. Analyse der Zelllinie HuH-7.....	62
2. Analyse an Kryoschnitten eines CCC .....	64
3. Analyse eines normalen Gallenganges .....	66
<b>E. DISKUSSION</b> .....	<b>68</b>
<b>F. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>G. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>77</b>

<b>H. ANHANG</b>	<b>83</b>
<b>I. KOMPLETTE AUFNAHMESERIEN DER KARZINOME</b>	<b>83</b>
<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>I. DANKSAGUNG</b>	<b>102</b>
<b>J. LEBENS LAUF</b>	<b>103</b>
<b>K. ERKLÄRUNG</b>	<b>104</b>

## A. Arbeitshypothese

Krebserkrankungen sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Herz- und Kreislauferkrankungen. Bei der Erforschung neuer Verfahren zur Krebsbehandlung kommt der Entwicklung gentherapeutischer Methoden eine besondere Bedeutung zu. Durch gezielten und möglichst tumorspezifischen Transfer therapeutischer Gene ergeben sich neue Möglichkeiten in der Bekämpfung des Krebses.

Als grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung mit gentherapeutischen Verfahren gilt es abzuklären, ob die jeweiligen Zielgewebe überhaupt für die Gentransfervektoren zugänglich sind.

Für den therapeutischen Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren ist die Präsenz eines speziellen Rezeptormoleküls essentiell. Der so genannte Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor (CAR) ist strukturell mit den Immunglobulinen verwandt. Er dient Zellen als Adhäsionsmolekül und ist in dieser Funktion am Aufbau der *tight junctions* beteiligt (Cohen et al. 2001).

Aus Zellkulturuntersuchungen an einer Vielzahl von Zelllinien ist bekannt, dass die Gegenwart des CAR mit der Infizierbarkeit der Zellen durch Adenovirus korreliert. Wird cDNA, die den Rezeptor kodiert, in zuvor CAR-negative Zellen verbracht, so exprimieren diese CAR und werden hierdurch adenoviral transfizierbar (Bergelson et al. 1997).

Der Fokus der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit liegt in der Überprüfung der CAR-Expression primärer und sekundärer leberständiger Neoplasien, um die prinzipielle Zugänglichkeit dieser Tumore für die adenovirale Tumorgentherapie zu evaluieren.

Ziel der Arbeit war es daher, mit Immunlokalisationstechniken die Expression des CAR-Rezeptors in primären und sekundären Tumoren der Leber zu beschreiben.

Hierfür wurden Gewebeproben eingesetzt, die von der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, aus deren Tumorgewebedatenbank zur Verfügung gestellt wurden.

Zieltumore waren das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das cholangiozelluläre Karzinom (CCC), sowie Lebermetastasen kolorektaler Karzinome.

## B. Einleitung

### I. Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das Einschleusen von Genen in Zellen oder Gewebe mit der Absicht, durch Expression eines Transgens, beziehungsweise mehrerer Transgene, einen therapeutischen Effekt zu erzielen (Hallek et al. 2001).

Zielindikationen für die Gentherapie sind vor allem Krebserkrankungen, vaskuläre und monogenetische Erkrankungen sowie Infektionskrankheiten.

Abbildung 1 zeigt, wie viele gentherapeutische klinische Studien bis zum Jahr 2006 durchgeführt wurden, aufgeschlüsselt nach der jeweiligen Indikation. Krebserkrankungen stellen mit 67 Prozent (n=762) zahlenmäßig die mit Abstand bedeutsamste Indikation in der gentherapeutischen klinischen Forschung dar.

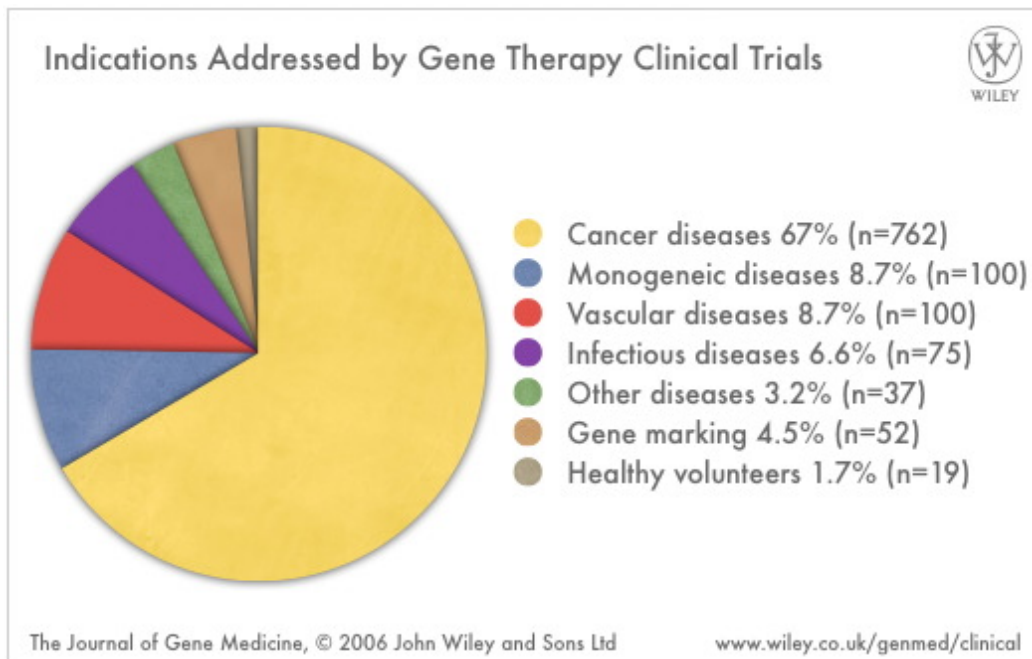


Abbildung 1:

**Zielindikationen gentherapeutischer klinischer Studien.**

Die Hauptindikation, bezogen auf die Zahl der Studien, bei klinischen Studien zur Gentherapie stellen Krebserkrankungen dar.



## 1. Vektoren in der Gentherapie

Zum therapeutischen Gentransfer in Zellen, beziehungsweise das jeweilige Zielgewebe, kommen ganz unterschiedliche Genfähren zur Anwendung.

So werden zum Beispiel Goldpartikelkanonen (*gene guns*), bakterielle Plasmide oder nackte DNA (Transfektion), Liposomen (Lipofektion) und eine Vielzahl verschiedener viraler Vektoren eingesetzt.

Virale Vektoren, insbesondere Adenoviren und Retroviren, wurden im Jahre 2001 in mehr als 70 Prozent aller klinischen Gentherapiestudien eingesetzt (Hallek et al. 2001).

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der bis zum Jahre 2006 registrierten gentherapeutischen klinischen Studien, aufgeschlüsselt nach den verwendeten Vektoren. Adenoviren (25 Prozent, n=287) und Retroviren spielen zahlenmäßig gegenüber anderen viralen und nicht-viralen Vektoren die größte Rolle.

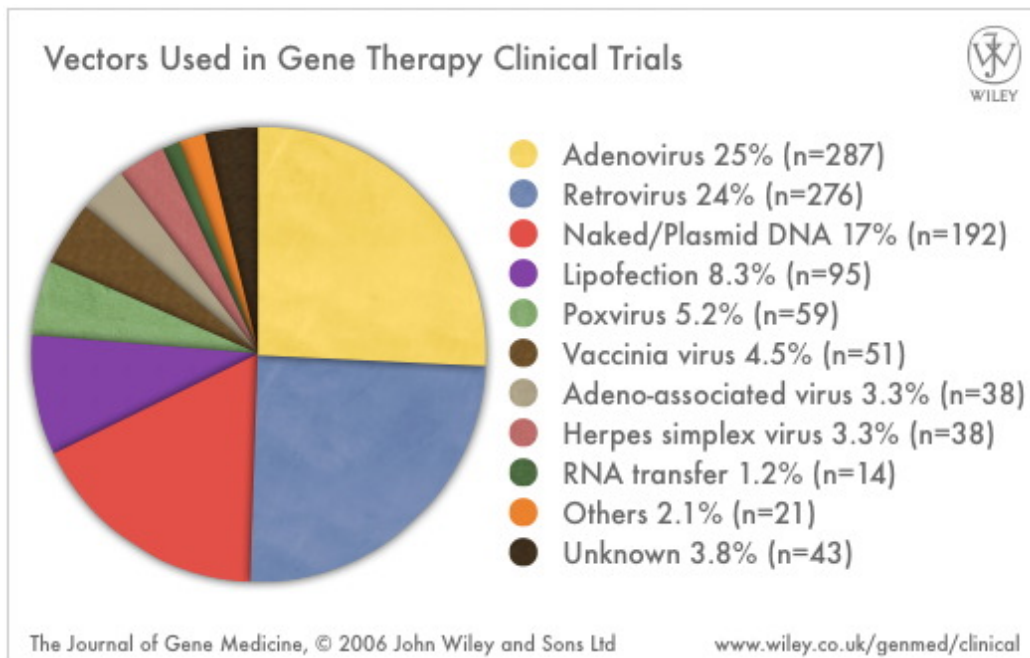


Abbildung 2:

**Prozentuale Verteilung der in klinischen Gentherapiestudien eingesetzten Vektoren.**

Adenovirale Vektoren sind in klinischen Studien zur gentherapeutischen Anwendung zahlenmäßig die bedeutsamsten Genvehikel.

## 2. Adenovirale Gentherapie

Adenoviren sind hüllenlose, ikosaedrische DNA-Viren, von denen seit ihrer Isolation aus adenoidem Rachengewebe und Erstbeschreibung 1953 (Rowe et al. 1953) mehr als 50 humanpathogene Serotypen beschrieben wurden.

Sie verursachen bei immunkompetenten Patienten im Wesentlichen Infektionen der Atemwege, Gastroenteritiden, sowie die durch Adenovirus definierte *Keratokonjunctivitis epidemica*, eine hochansteckende Infektion der Augenbindehaut (Modrow u. Falke 1997).

Adenoviren integrieren nach überwiegender Lehrmeinung nicht in das Wirtszellgenom, sondern ihr Genom und damit gegebenenfalls vorhandene Transgene liegen episomal vor.

Adenovirale Vektoren können Transgene von mehr als 30 Kilobasen (Kb) beherbergen und *in vitro* in hohen Titern hergestellt werden, weswegen sie sich besonders für die Gentherapie eignen (Volpers u. Kochanek 2004).

Das Genom der Typen 2 und 5, welche am häufigsten als adenovirale Vektoren verwendet werden, setzt sich aus linearer, doppelsträngiger (ds) DNA mit einer Länge von etwa 36 Kb zusammen (Chroboczek et al. 1992).

Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau eines Adenovirus, der Durchmesser beträgt 80 bis 110 nm (Modrow u. Falke 1997, Russell 2000).

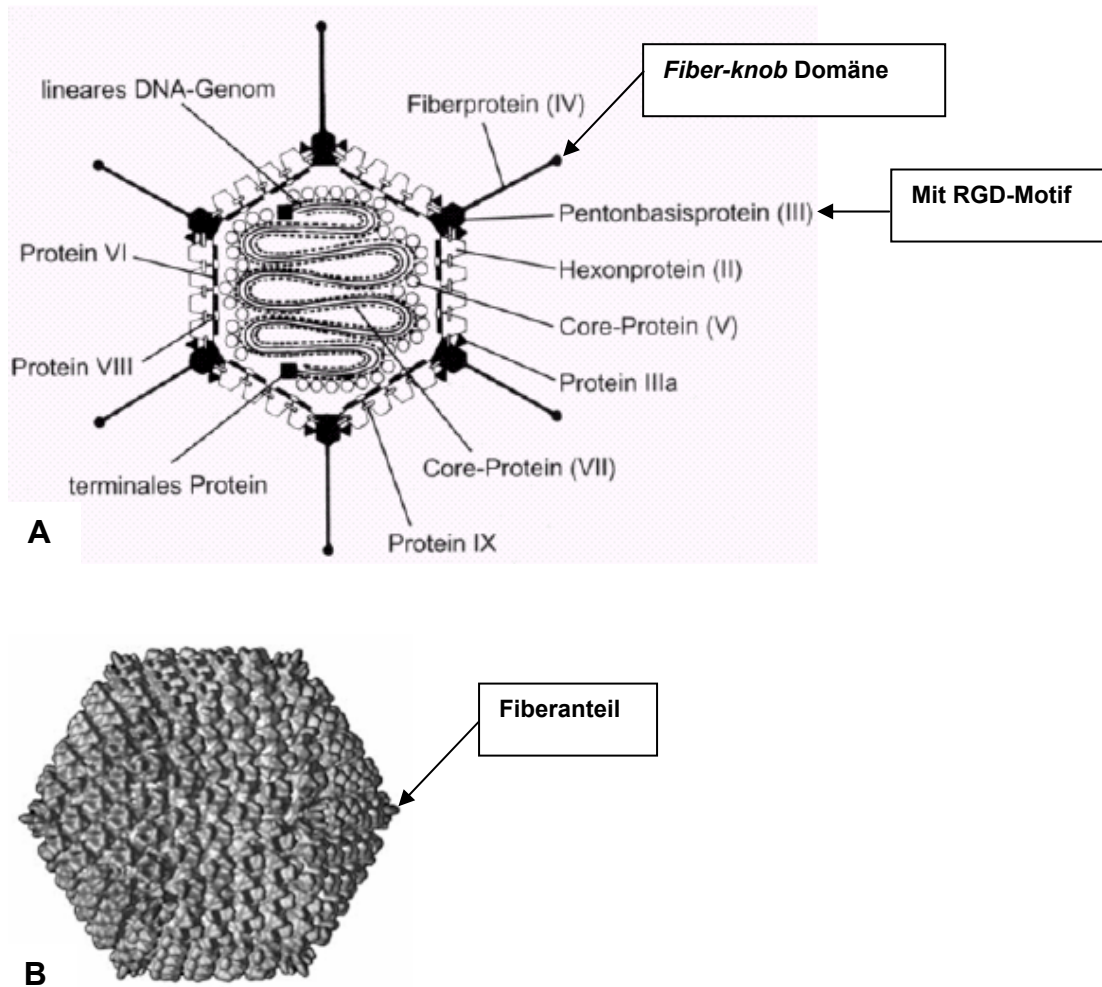


Abbildung 3:  
**Schematische Darstellung (A) und Kryo-EM-Aufnahme (B) eines Adenovirus.** A) Modifiziert nach Modrow (1997), Seite 393. B) Aus (Rux u. Burnett 2004).

Bei der gentherapeutischen Applikation von Adenoviren zur Tumorbehandlung kommen unterschiedliche Strategien zur Anwendung. Nachfolgend sind exemplarisch einige grundlegende Prinzipien aufgeführt.

Beim *Prodrug-Approach* werden mit den adenoviralen Vektoren so genannte Suizidgene in die Tumorzellen eingebracht, die eine inaktive Zytostatika-Vorstufe aktivieren. Werden Tumorzellen mit Adenoviren transfiziert, welche etwa als Transgen das Enzym *Herpes simplex Virus*-Thymidinkinase (HSV-TK) kodieren, so wandelt die HSV-TK, nach systemischer Gabe der Vorläufersubstanz Ganciclovir, dieses in das zytotoxisch wirksame Nukleosidanalogon Ganciclovirtriphosphat um, welches die Tumorzellen abtötet (Martin et al. 1997).

Wird nach adenoviraler Infektion das Enzym Cytosindeaminase als Transgen in Tumorzellen exprimiert, so katalysiert es die Umwandlung der Vorläufersubstanz 5-Fluorocytosin in das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU). Das 5-FU wirkt dann toxisch auf die Tumorzellen (Ohwada et al. 1996).

Beiden Ansätzen ist gemeinsam, dass durch Diffusionsvorgänge der toxischen Metaboliten im Zielgebiet benachbarte Gewebe ebenfalls getroffen werden, also Tumorgewebe oder aber Normalgewebe. Dieses bezeichnet man als *bystander-effect*.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von onkolytischen Adenoviren, die sich idealerweise nur im Tumor selbst replizieren, so genannte CRADs (*conditionally replicative adenovirus*, Curiel 2000). Das Adenovirus Onyx-015 etwa kann sich nur in Zellen vermehren, welche einen Ausfall im p53 Signalweg haben, was für die Mehrzahl der maligne entarteten Zellen zutrifft (Ries u. Korn 2002).

Alternativ kann man Viren einsetzen, bei denen ein für die Replikation essentielles Gen unter der Kontrolle eines tumorspezifischen Promotors steht, z.B. alpha-Fetoprotein für das HCC (Hallenbeck et al. 1999).

In beiden Fällen erfolgt die Tumorzellelimination durch virusinduzierte Zelllyse. Bei diesem Ansatz muss jeder Tumorherd einzeln behandelt werden, inklusive eventuell vorhandener Metastasen, was sich limitierend auf den praktischen klinischen Einsatz auswirken kann.

Der immunstimulatorische Ansatz schließlich verwendet als Transgene unterschiedliche Zytokine, wie die Interleukine (z.B. IL-12, IL-2), Interferone (z.B. IFN- $\gamma$ ) oder T-Zell Kostimulatoren wie B7.1, CD40 Ligand oder 4-1BBL, mit der Absicht, durch Expression der Faktoren im Tumorgewebe, das Wirtsimmunsystem zu stimulieren und so eine Zerstörung der Tumorzellen zu bewirken.

Dieser Ansatz wird auch in unserer Arbeitsgruppe verfolgt und bietet die Vorteile, dass nicht alle Tumorzellen getroffen werden müssen, was die zu applizierende Virusdosis und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens potentiell unerwünschter Wirkungen verringert.

Außerdem können durch die globale Aktivierung einer Immunantwort auch Metastasen erreicht werden, ohne dass diese separat behandelt werden müssten (Waehler et al. 2005). Eine mögliche Komplikation ist die Induktion von autoimmunen Reaktionen, wie etwa einer Vitiligo bei der Immuntherapie des malignen Melanoms.

Ein generelles Problem bei der adenoviralen Gentherapie kann im Auslösen einer Immunreaktion des Wirtes gegen Vektorepitope bestehen, was eine erneute erfolgreiche systemische Applikation des Vektors unmöglich machen kann, sofern neutralisierende Antikörper gebildet werden.

### **3. Der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor**

Der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor (CAR) ist der primäre zelluläre Rezeptor für Adenoviren. Er wurde 1997 von Bergelson als der gemeinsame zelluläre Rezeptor für Coxsackie B Viren und die Adenoviren vom Typ 2 und 5 beschrieben (Bergelson et al. 1997).

Inzwischen konnte für sämtliche Serotypen, mit Ausnahme der Adenoviren der Gruppe B, gezeigt werden, dass sie CAR als den primären Rezeptor für die Virusadsorption (*Virusattachment*) verwenden (Volpers u. Kochanek 2004).

CAR ist ein membranständiges Protein von 46 KDa Größe, verfügt über intrazelluläre, transmembranöse und extrazelluläre Domänen und gehört strukturell zur Immunglobulinsuperfamilie (Russell 2000).

Die physiologische Funktion von CAR ist noch nicht vollständig verstanden. CAR beteiligt sich am Aufbau und Erhalt von *tight junctions* und lässt sich mit dem *tight junction* Protein ZO-1 kolokalisieren (Cohen et al. 2001).

Die CAR-Expression variiert mit der Integrität und Polarität der dreidimensionalen Anordnung epithelialer Zellen. Die Auflösung dieser Organisation durch Veränderungen in der Umgebung, inklusive maligner Transformation, kann die adenovirale Infizierbarkeit einer Zelle durch Hochregulierung des CAR erhöhen (Anders et al. 2003).

Ein ungleich bedeutsamerer Aspekt kann aber im Verlust der CAR-Expression in Tumoren bestehen. Im Verlauf von Invasion und Metastasierung, während der Progression von soliden Tumoren, kommt es im Rahmen der so genannten epithelial-mesenchymalen Transition unter anderem zu einer Herunterregulierung von Zelladhäsionsstrukturen, zu denen der CAR gehört und an deren Aufbau er beteiligt ist (Hartwell et al. 2006).

Insofern muss die prä-interventionelle Abklärung des CAR-Status eines Zieltumors eine entscheidende Determinante bei der Patientenselektion sein.

Weiterhin fungiert der Rezeptor offenbar selbst als Zell-Zell Adhäsionsmolekül. CAR hat zwei extrazelluläre, immunglobulinähnliche (*Ig-like*) Domänen, D1 und D2. Von diesen kann die D1-Domäne Homodimere zwischen CAR-Molekülen auf benachbarten Zellen ausbilden. Durch diese D1 Wechselwirkungen kann CAR als Zell-Zell Adhäsionsmolekül agieren.

Ebenso kommt dem Rezeptor in diesem Zusammenhang eine Funktion bei der Virusfreisetzung zu. Werden Adenoviren nach Vermehrung und Zellyse freigesetzt, so werden auch Fiberanteile von defekten Viren in großer Menge frei. Die *fiber-knob* Domäne dieser Hüllenfragmente bindet CAR und durchbricht somit die D1 Homodimere, welche die Zelladhäsion benachbarter Zellen vermitteln und erlaubt so das parazelluläre Entkommen der Adenoviren (Abbildung 4, Walters et al. 2002).

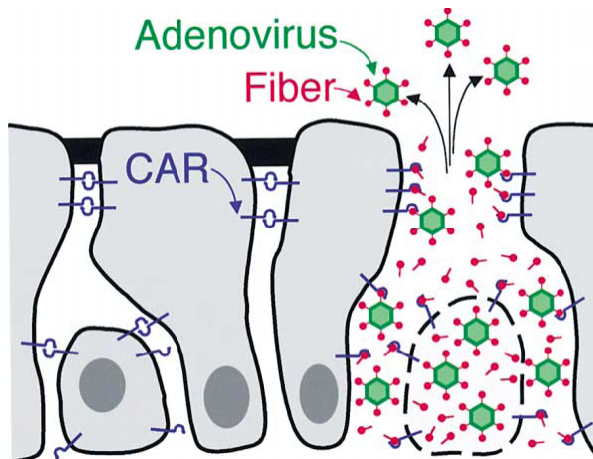


Abbildung 4:

**Modell der Adenovirusfreisetzung durch Fiber-CAR Interaktion.**

Benachbarte Epithelzellen sind durch CAR (blau) miteinander verbunden. Nach erfolgreicher Infektion werden Viren (grün) und Fiberprotein (rot) basolateral freigesetzt. Das Fiberprotein durchbricht, durch kompetitive Bindung, die durch CAR vermittelten Zell-Zell Kontakte und erlaubt so die Virusfreisetzung an die apikale Oberfläche. Aus (Walters et al. 2002).

Das Vorhandensein des CAR ist von wesentlicher Bedeutung für den Erfolg adenovirusbasierter Krebstherapien, der Verlust der CAR Expression auf der Zelloberfläche führt zu einer enormen Reduktion der Infizierbarkeit (Anders et al. 2003, Hemmi et al. 1998).

Anhand eines Modells, bei dem ein replikationskompetentes, onkolytisches Adenovirus sowie zwei Tumorzelllinien, die sich lediglich in ihrer CAR Expression unterschieden, verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass der CAR *in vitro* und *in vivo* kritisch für eine effiziente intratumorale Ausbreitung und Lyse ist (Douglas et al. 2001).

Weiterhin besitzen einige Zelltypen, etwa Leukozyten, physiologischerweise keine Zell-Zell Adhäsionsmoleküle, wie *tight junctions*, auf ihrer Zelloberfläche, oder der Rezeptor kann, etwa bei bereits fortgeschrittenen Tumorleiden im Stadium der Fernmetastasierung, herunterreguliert sein (Hemminki et al. 2003).

Diese Aspekte verdeutlichen die Notwendigkeit, potentielle Zieltumoren für die adenovirale Gentherapie auf die Präsenz des CAR hin zu untersuchen.

Nachfolgend sollen die Ereignisse zu Beginn des adenoviralen Infektionszyklus überblickend dargestellt werden.

Am Anfang der Infektion steht die hochaffine Bindung des Fiberproteinknopfes (*Fiber knob domain*) an den CAR-Rezeptor der Wirtszelle (Bergelson et al. 1997). Im Anschluss tritt das RGD-motif des viralen Pentonbasisproteins mit zellulären Integrinen, welche Co-Rezeptoren darstellen, in Wechselwirkung (Abbildung 5). Die Virusadsorption an die Zielzelle ist somit vollzogen.

Es folgt sodann die Clathrin-abhängige, rezeptorvermittelte Endozytose (Virusinternalisation). Im Endosom wird das Virus durch Ansäuerung teilweise aufgelöst, das Capsid wird abgebaut. Es kommt zur Virusfreisetzung aus dem Endosom und die Adenoviren gelangen durch das Zytoplasma zum Kern. Hier dringt die virale DNA durch Kernporen in das Nukleoplasma vor, es beginnt die Transkription von viralen Genen und damit die Virusreplikation (Russell 2000, Volpers u. Kochanek 2004).

Bis zur Freigabe an das Zytosol vergehen etwa 15 Minuten, die Expression von Transgenen ist nach circa 18 Stunden nachweisbar und gipfelt nach 48 bis 72 Stunden (Greber et al. 1993).

Am Ende des adenoviralen Infektionszyklus steht die Lyse und Freisetzung der neuen Viren. Eingeleitet wird die Zelllyse vom so genannten *Adenovirus death protein* ADP (Gen E3-11.6K, Tollefson et al. 1996).



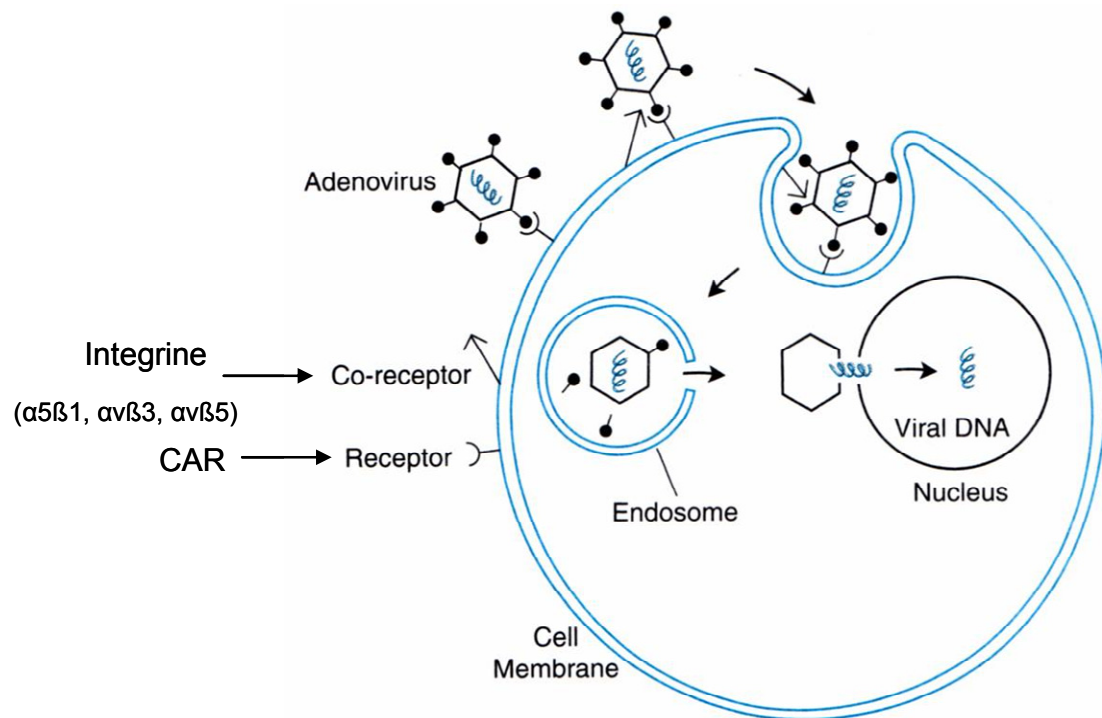


Abbildung 5:

**Adenovirale Infektion einer Zielzelle.**

CAR ist der primäre zelluläre Rezeptor für das Adenovirus, Integrine stellen Co-Rezeptoren dar. Nach Clathrin-abhängiger, rezeptorvermittelter Endozytose wird das Virus im Endosom teilweise aufgelöst. Nach Freisetzung aus dem Endosom gelangt es zum Kern, wo die virale DNA durch Kernporen das Nukleoplasma erreicht und die Virusreplikation beginnt. Modifiziert nach (Sompayrac 2002), S. 41.

## **II. Humane Neoplasien und Therapieoptionen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche leberständige Tumoren untersucht. Lebertumoren können der Dignität nach in benigne und maligne Prozesse eingeteilt werden, letztere wiederum können entweder primär hepatischen oder sekundär metastatischen Ursprungs sein. In den westlichen Ländern liegen überwiegend sekundäre Lebermetastasen vor, in Teilen Afrikas und in Asien hingegen dominieren primäre Malignome.

Die primären Neoplasien der Leber können epithelialer Herkunft sein, d.h. sie gehen von den Hepatozyten oder Gallengangsepithelzellen aus, oder sie sind mesenchymalen oder gemischtzelligen Ursprungs (Moradpour et al. 2002).

Stellvertretend für die primären Lebertumore wurden das cholangiozelluläre und das hepatozelluläre Karzinom analysiert. Aus der Gruppe der sekundären Lebertumore wurden Metastasen kolorektaler Karzinome untersucht.

### **1. Das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC)**

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist ein hochmaligner Tumor, der von Epithelzellen der Gallengänge ausgeht.

Das CCC ist der zweithäufigste primäre hepatobiliäre Tumor und aufgrund eines Mangels an effektiven Therapiemöglichkeiten mit einer schlechten Prognose und hohen Mortalität behaftet (Berthiaume u. Wands 2004).

Die Tumoren werden anatomisch eingeteilt in intrahepatische, perihiläre und distale extrahepatische Neubildungen der Gallengänge. Das Gallenblasenkarzinom ist eine eigenständige Entität (de Groen et al. 1999).

Die perihilären CCC werden zusätzlich nach Bismuth in die Typen I bis IV eingeteilt (Bismuth et al. 1992) und diejenigen, welche die Hepatikusgabel involvieren, werden auch Klatskin-Tumore genannt (Klatskin 1965).

Etwa ein Drittel der Tumore sind intrahepatische und zwei Drittel sind perihiläre und distale extrahepatische CCC (Gores 2003).

Das CCC tritt in der Regel jenseits der 5. bis 6. Lebensdekade auf.

Während die Inzidenz des CCC weltweit insgesamt variiert, können steigende Inzidenzen für das intrahepatische CCC verzeichnet werden. So stieg die Inzidenz in den USA von 0,32 pro 100000 Einwohner in den Jahren von 1975 bis 1979 auf 0,85 pro 100000 in den Jahren von 1995 bis 1999, was einem Anstieg von 165 Prozent entspricht. Die Fünfjahresüberlebensrate hat sich in diesem Zeitraum nicht signifikant verändert und blieb bei unter 5 Prozent (Shaib u. El-Serag 2004).

Insgesamt ist in den USA in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Inzidenz und Mortalität des primären intrahepatischen CCC festzuhalten, bei persistierend schlechter Prognose (Patel 2001). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass diese Entwicklung nicht auf Reklassifikationen oder einer verbesserten Tumordetektion beruht, sondern am ehesten ein tatsächlicher Anstieg zu beobachten ist (Shaib et al. 2004). In Europa, etwa in Schottland, sind ähnliche Tendenzen registriert worden, wobei auch hier der gestiegenen Inzidenz wahrscheinlich eine tatsächliche Erhöhung des Risikos in der Population gegenübersteht (Wood et al. 2003). Die kausalen Faktoren, die diesem Trend zugrunde liegen, bleiben kryptisch.

Die vollständige (R0) Resektion ist die einzige Therapie, die ein Langzeitüberleben ermöglicht, jedoch sind die meisten Patienten bei Diagnose nicht für eine kurative Resektion geeignet. Patienten mit inoperablem CCC haben ein mittleres Überleben von im Allgemeinen weniger als 12 Monaten nach Diagnose (Khan et al. 2005, Sirica 2005).

Die meisten Patienten haben keine identifizierbaren Risikofaktoren, es konnten aber eine Reihe von Risikofaktoren ermittelt werden, die ätiologisch von Bedeutung sind. Dieses sind die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), parasitäre Leberegelinfektionen (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*),

zystische Erkrankungen der Gallengänge (Caroli Syndrom, kongenitale Choledochuszysten), chronische intrahepatische Lithiasis sowie eine Belastung mit Thoriumdioxid (Thorotrast) und verschiedenen anderen Radionukliden.

Pathogenetisch scheinen u. a. eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren (z.B. iNOS, NO, IL-6, COX-2) eine Rolle zu spielen (Angulo u. Lindor 1999, Gores 2003, Olnes u. Erlich 2004, Sirica 2005). Die maligne Transformation biliärer Epithelzellen läuft im Rahmen einer chronischen Cholestase, Entzündung oder der Kombination beider Prozesse ab. Die resultierenden molekularen Veränderungen sind vielfältig, es konnten unter anderem die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nachgewiesen werden (Berthiaume u. Wands 2004).

Klinisch tritt das primär intrahepatische CCC wie eine Lebermassenbildung in Erscheinung. Die Patienten können unspezifische Symptome, wie abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und ein allgemeines Krankheitsgefühl haben, oder aber gänzlich asymptomatisch sein.

Die Klinik des duktales CCC ist hingegen geprägt von schmerzlosem Ikterus, hellem Stuhl, dunklem Urin und Pruritus. Die Klinik wird ergänzt durch erhöhte Cholestaseparameter (alkalische Phosphatase, Bilirubin, gamma-Glutamyltransferase), sowie einen Anstieg der Tumormarker CA 19-9 und CEA im Laborprofil (Gores 2003, Khan et al. 2005).

Bezüglich der Therapie des CCC ist die chirurgische Resektion die einzige kurative Behandlung, die mittlere Fünfjahresüberlebensrate bei Operation liegt jedoch nur bei 9 bis 18 Prozent für proximale und bei 20 bis 30 Prozent für distale Tumoren. Ansätze zur Chemotherapie waren häufig 5-FU basiert und konnten keine Verbesserung der Gesamtmortalität erzielen. Die postoperative Bestrahlung zeigt keine Verbesserung von Lebensqualität oder Überleben.

Lediglich die Kombination von neoadjuvanter Radiochemotherapie und aggressivem chirurgischem Vorgehen, einschließlich Lebertransplantation, scheint eine relativ effektive Therapieoption für wenige, selektierte Patienten darzustellen, größere Studien stehen aber noch aus.

An palliativen Behandlungskonzepten stehen die endoskopische, perkutane oder chirurgische Gallengangsdrainage, Stents, sowie die photodynamische Therapie zur Verfügung. Bei der photodynamischen Therapie wird, nach systemischer Gabe eines Photosensitisers (Porfimer-Na), im Rahmen einer ERCP lokal mit Laserlicht entsprechender Wellenlänge bestrahlt (Olmes u. Erlich 2004).

Im Angesicht der äußerst begrenzten und ineffektiven Therapiemöglichkeiten, sowie der sehr schlechten Prognose, ist es dringend geboten, neue Strategien für die Behandlung des CCC zu entwickeln. Hier kann die adenovirale Gentherapie neue Behandlungsansätze eröffnen.

## **2. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)**

Das hepatozelluläre Karzinom geht von den Hepatozyten aus und ist das häufigste primäre Malignom der Leber. Weltweit beträgt die angenommene Zahl der Neuerkrankungen eine Million pro Jahr (Ameis 2000).

Das Vorkommen des HCC variiert weltweit erheblich. In Teilen Afrikas und Südostasiens sind deutlich höhere Inzidenzen als in Australien, Nordamerika und Europa festzuhalten. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Bosch et al. 1999). Die Inzidenz des histologisch gesicherten HCC lag in den USA bei 2,4 pro 100.000 Einwohner in den Jahren von 1991 bis 1995 und hat in den letzten zwei Jahrzehnten zugenommen. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt weniger als 5 Prozent (El-Serag u. Mason 1999).

Die Pathogenese des HCC ist multifaktoriell. Ein HCC entsteht, im Laufe von vielen Jahren, im Rahmen einer chronischen Hepatitis und fast immer auf der Basis einer zirrhotisch umgebauten Leber. Eine chronische Leberschädigung und die damit verbundenen, regenerativen Umbauprozesse führen zu einem pathologisch erhöhten Hepatozytenturnover. Dieses kann, im Verbund mit oxidativen DNA-Schäden, eine maligne Transformation durch chromosomale Rearrangements, Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken.

Die chronische ethanoltoxische Schädigung der Leber, chronische Virushepatitiden, vor allem HBV und HCV, sowie hereditäre Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose,  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel) können auf diese Weise ein HCC verursachen. Aflatoxine können durch Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen ein HCC auslösen (Moradpour et al. 2002).

Das HCC tritt klinisch zumeist unspezifisch in Erscheinung und kann lange asymptomatisch verlaufen. Oft dominieren lediglich die Symptome der Grunderkrankung, beispielsweise einer Leberzirrhose. Betroffene Patienten können über Druckgefühl und Schmerzen im Oberbauch, Appetitlosigkeit, Müdigkeit und Abgeschlagenheit klagen. Gelegentlich tritt Fieber auf. Die Patienten werden häufig erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Krankheit symptomatisch, spätestens dann können auch ein Ikterus sowie Ascites auftreten (Ameis 2000, Moradpour et al. 2002).

Das HCC ist mit einer schlechten Prognose behaftet. Patienten ohne spezifische Therapie haben, entsprechend dem Tumorstadium bei Diagnose, eine mittlere Überlebenszeit von 1 bis 9 Monaten (Okuda et al. 1985).

Die Monochemotherapie erzielt keine signifikanten Ergebnisse in der Behandlung des HCC (Moradpour et al. 2002). Radiotherapeutische Verfahren haben hier ebenso praktisch keinen Stellenwert.

Lediglich die chirurgischen Verfahren (Resektion oder Transplantation) können einen kurativen Ansatz, für Patienten mit singulären größeren oder bis zu drei kleineren Tumorherden, ohne extrahepatische Filiae, bieten. Hier kann durch neoadjuvante Verfahren (z. B. präoperative TACE) ein Downstaging erzielt werden, was die Rezidivraten senkt.

Polychemotherapien können, im Rahmen von Studien, bei metastasierten und weit fortgeschrittenen Prozessen versucht werden. Bei insgesamt aber stark eingeschränkter Lebensqualität und limitiertem Effekt ist der Stellenwert unklar, die Indikation ist sorgfältig zu stellen.

Bei Patienten, die nicht mehr kurativ behandelt werden können, kommen lokale, perkutane oder offene Therapieverfahren zum Einsatz, insbesondere die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die Radiofrequenzablation (RFA). Andere Modalitäten umfassen die transarterielle Chemoembolisation (TACE) mit Doxorubicin und Lipiodol, sowie kryoablative und lasertherapeutische Verfahren (Dietrich et al. 2003).

### **3. Lebermetastasen Kolorektaler Karzinome**

Kolorektale Karzinome sind ein häufiger Ursprung für sekundäre hepatische Metastasen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Metastasierung vom Portalvenen-Typ, bedingt durch die venöse Drainage der unpaarigen Bauchorgane durch die Pfortader.

Fernmetastasen sind die Haupttodesursache bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Je nach Stadium des Primärtumors finden sich in 20 bis 70 Prozent der Patienten Lebermetastasen und in 10 bis 20 Prozent Lungenmetastasen. Im Unterschied zu vielen anderen Tumoren schließen Fernmetastasen beim kolorektalen Karzinom einen kurativen Therapieansatz nicht aus. Lediglich die Resektion kann ein Langzeitüberleben und Heilung sicherstellen, jedoch ist nur ein Teil der Lebermetastasen einer chirurgischen Therapie zugänglich (Penna u. Nordlinger 2002).

Die Leberresektion stellt im Rahmen eines interdisziplinären Managements den Mittelpunkt der kurativen Therapie dar. Patienten mit resektablen hepatischen Metastasen können primär reseziert werden. Diejenigen mit primär irresektablen Befunden können, nach neoadjuvanten Regimen, gegebenenfalls sekundär einer kurativen Resektion zugeführt werden.

Stellt sich ein zu erwartendes inadäquates Leberrestvolumen nach Resektion als Limitierung dar, kann bei einer Vielzahl von Patienten mittels selektiver Pfortaderembolisation des tumortragenden Anteils und nachfolgender Hypertrophie der gesunden Abschnitte, eine sekundäre Operabilität erreicht werden. In anderen Fällen kann eine neoadjuvante systemische Chemotherapie

die sekundäre Resektabilität herstellen. Der Stellenwert einer adjuvanten systemischen Chemotherapie nach Resektion ist gegenwärtig Untersuchungsgegenstand kontrollierter, randomisierter klinischer Studien, deren Ergebnisse abzuwarten bleiben. Etablierte primäre Polychemotherapien bei fortgeschrittenen Tumorstadien, mit hepatischer Absiedelung, verwenden 5-FU in Kombination mit Leucovorin (Folinsäure) und Irinotecan (Kohne et al. 2005).

Lokal ablativ Methoden kommen in der palliativen Situation zum Einsatz und umfassen die Kryo-, Laser- und Radiofrequenz-Ablation der Tumorherde (Oechsle et al. 2007).

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Spontanverlauf liegt bei lediglich 2 Prozent, nach kurativer Resektion bei bis zu 40 Prozent.

Das kolorektale Karzinom selbst zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen überhaupt. Es tritt in westlichen Ländern, bei Inzidenzen um 15 pro 100.000 Einwohnern und Jahr, am häufigsten auf, Männer sind häufiger betroffen. Ursächlich werden genetische und umweltbedingte Faktoren angeschuldete, insbesondere die *Western-style-Diet*, mit ihrem hohen Anteil an Fett sowie *trans*-Fettsäuren und ihrem niedrigen Ballaststoffanteil. Ebenso müssen nahrungsmittelassoziierte Karzinogene, wie Nitrosamine und Acrylamid, als Verursacher erwogen werden.

Risikofaktoren für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms sind die familiäre adenomatöse Poliposis coli, adenomatöse Kolonpolypen, eine positive Familienanamnese sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, darunter vor allem die Colitis ulcerosa.

Die klinische Symptomatik umfasst Anämie, Gewichtsverlust, Meteorismus, abdominelle Schmerzen und Stuhlunregelmäßigkeiten, darunter Obstipation, Diarrhoe, Blutbeimengungen und Schleimabgang. Fortgeschrittene Prozesse können eine Ileussyptomatik verursachen, ebenso Symptome durch Infiltration von Nachbarorganen, etwa Harnstau durch Befall der Ureteren (Hirner und Weise 2004).



### **III. Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der CAR Expression primärer und sekundärer leberständiger Karzinome, namentlich des CCC, des HCC und kolorektaler Lebermetastasen, um so die prinzipielle Zugänglichkeit dieser Neoplasien für eine Tumorgentherapie mit Adenoviren zu untersuchen.

Darüber hinaus soll die Überprüfbarkeit der Präsenz des CAR-Rezeptors als prognostischer Marker für adenovirusbasierte Therapien dienen.

Der CAR-Status eines Primärtumors soll, für zukünftige klinische Studien der Phasen I, II und III herangezogen werden, um als so genannter Biomarker bei der Patientenselektion zur Anwendung zu kommen und somit die Studien abzusichern.

Das zu entwickelnde Färbeprotokoll soll es also erlauben, als eine Art *Triage*-Methode, im klinischen Setting nach Biopsie und Analyse festzulegen, ob die Grundvoraussetzung für den Einsatz adenoviraler Vektoren, nämlich CAR im Zielgewebe, gegeben ist.

#### **1. Etablierung einer Färbung auf den CAR**

Um den Expressionsstatus des CAR-Rezeptors an Zellen und Tumorgewebe erfassen zu können, soll eine Immunlokalisation etabliert werden. Mit einem Antikörper gegen den humanen CAR sollen geeignete Versuchsbedingungen ermittelt werden, um den CAR-Rezeptor in Zellen und Gewebeschnitten darstellen und beschreiben zu können.

## **2. Untersuchung des CAR Expressionsstatus an Zellkulturen verschiedener Karzinome**

Zellkulturen (Zelllinien) von verschiedenen humanen Karzinomen sollen auf ihre Expression des CAR hin untersucht werden und die Ergebnisse mit den Daten korrespondierender humaner Tumorgewebeschnitte verglichen werden.

## **3. Untersuchung des CAR Expressionsstatus an humanen Karzinomen**

Der Expressionsstatus des humanen CAR im CCC, HCC und hepatischen kolorektalen Metastasen soll immunhistologisch, an Gewebeschnitten der jeweiligen Tumore, erfasst werden. Dieses ist entscheidend um festzustellen, ob diese Neoplasien prinzipiell mit einer auf Adenoviren basierenden Gentherapie angegangen werden können. Der ermittelte CAR Status soll mit dem der entsprechenden Zelllinien verglichen werden.

## **4. CAR Status und Infizierbarkeit humaner Tumorzelllinien**

In einem weiteren Schritt sollen Infektionsversuche mit GFP-kodierenden Adenoviren an den humanen Tumorzelllinien durchgeführt werden und die Ergebnisse anschließend dem zuvor ermittelten CAR Status gegenübergestellt werden. Die Zellen sollen, nach Infektion mit Ad-GFP, durchflußzytometrisch analysiert und die gemessenen Infektionsraten mit der jeweiligen CAR Expression verglichen werden.

Gleichzeitig soll die Entwicklung des Versuchsablaufs für die Infektion von Tumorzellen mit Ad-GFP, der Etablierung eines *in vitro* Modellsystems für die Analyse von humanen Tumoren dienen. Mit einem solchen Protokoll könnte in Zukunft Tumormaterial, welches im Rahmen von Biopsien oder Resektionen gewonnen wird, nach Disaggregation infiziert werden, um funktionell die Transfizierbarkeit mit therapeutischen Vektoren zu evaluieren.

**5. Kolokalisation des CAR mit dem *tight junction* Marker ZO-1**

Für den CAR Rezeptor wurde eine Kolokalisation mit ZO-1 in *tight junctions* beschrieben (Cohen et al. 2001). Zur weiteren Absicherung der Befunde in Zelllinien, sowie auch in Tumorgewebe, sollen CAR und ZO-1 exemplarisch kolokalisiert werden.

## **C. Material und Methoden**

### **I. Chemikalien und Biochemikalien**

#### **1. Zellkultur**

DMEM +4500 mg/L Glucose , + GlutaMAX I, + Pyruvate  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 31966-021

DMSO Dimethyl sulfoxide > 99.9 % for molecular biology  
Fa. Sigma D 8418

D-PBS - CaCl<sub>2</sub>, - MgCl<sub>2</sub>  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 14190-094

Foetal Bovine Serum (Heat inactivated)  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 10500-064

MEM Amino Acids (50x) – L-Glutamine  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 11130-036

MEM Non-Essential Amino Acids (100x)  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 11140-035

Penicillin-Streptomycin (100x)  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 15140-122

RPMI 1640 Medium +GlutaMAX I  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 61870-010

Trypan blue solution 0.4%  
Fa. Sigma-Aldrich T 8154

Trypsin-EDTA (1x)  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 25300-054

#### **2. Chemikalien**

Ammonium-Cl (NH<sub>4</sub>-Cl)  
Fa. Merck 1145.1000

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V)  
Fa. PAA Laboratories GmbH K41-001-100

DAPI

Fa. Sigma D8417

Glucose

Fa. Merck 1.08337.5000

Glycin

Fa. Roth 3908.2

KCl

Fa. Sigma P-5405

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat)

Fa. Merck 4873.1000

Mowiol 4.88

Fa. Calbiochem 475904

NaCl

Fa. J.T.Baker 7647-14-5

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)

Fa. Merck 1.06580.100

p-Phenylenediamine (PPD, 1,4-Benzenediamine hydrochlorid)

Fa. Sigma P1519

Saponin

Fa. Sigma S7900

Tissue Tek O.C.T Compound

Fa. Sakura via Vogel GmbH & Co KG SA 4583

## **II. Biologische Reagenzien**

### **1. Antikörper und Sera**

#### **Antikörper**

Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)

Fa. Molecular Probes A21206

Anti-CAR (clone RmcB) Mouse anti-Human IgG1

Fa. Upstate Biotechnology 05-644

Anti-ZO-1 Rabbit Ig, polyclonal

Fa. Zymed Laboratories 61-7300

Cy3-labeled Donkey anti-Mouse IgG  
Jackson ImmunoResearch Laboratories via Fa. Dianova 715-166-151

### **Sera**

Donkey Serum  
Jackson ImmunoResearch Laboratories via Fa. Dianova 017-000-121

Horse Serum  
Fa. Gibco Invitrogen Corporation 26050-088

## **2. Adenovirus Ad-GFP**

Ad-GFP, Type 5 Vektor, Titer:  $5,0424 \times 10^7$  VP/ $\mu$ L  
Dr. Roland Vogel (Max-Planck-Einheit für Stukturbiologie, Hamburg)

## **3. Kommerzielle Testkits**

Adeno-X Rapid Titer Kit  
Fa. Clontech K1653-1

VenorGeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR  
Fa. Minerva Biolabs VGM-250

## **III. Glasware, Plastikware und Laborgeräte**

### **Zellkulturflaschen**

T25	Fa. Biochrom (TPP) P90250
T75	Fa. Biochrom (TPP) P90760
T150	Fa. Biochrom (TPP) P90151
T300	Fa. Biochrom (TPP) P90301

T25	Fa. NUNC 136196
T80	Fa. NUNC 178891
T175	Fa. NUNC 178883

### **Multischalen**

6-well	Fa. Biochrom (TPP) P92060
12-well	Fa. Biochrom (TPP) P92120
24-well	Fa. Biochrom (TPP) P92240

### **Multischalen, ohne Oberflächenbehandlung**

6-well	Fa. NUNC 150239
12-well	Fa. NUNC 150200
24-well	Fa. NUNC 144530

### **Serologische Pipetten**

1 mL in 1/100 mL	Fa. BD Falcon 356521
2 mL in 1/100 mL	Fa. BD Falcon 356507
5 mL in 1/10 mL	Fa. BD Falcon 356543
10 mL in 1/10 mL	Fa. BD Falcon 356551
25 mL in 1/4 mL	Fa. BD Falcon 356525

### **Filter Tips**

Biosphere Filter Tips 10 µL  
Fa. Sarstedt 70.1115.210

Biosphere Filter Tips 1000 µL  
Fa. Sarstedt 70.762.211

SafeSeal Tips 20 µL  
Fa. BIOzym 692151

SafeSeal Tips 200 µL  
Fa. BIOzym 692069

### **Reaktionsgefäße**

BLUE MAX Polypropylene Conical Tube 50 mL  
Fa. BD Falcon 352070

BLUE MAX Jr. Polypropylene Conical Tube 15 mL  
Fa. BD Falcon 352096

Nunc CryoTubes  
Fa. Nunc 377367

PE micro test tube 250 µL Beckman type with stopper  
Fa. Beckman 844110016

Rundbodenröhrchen 5 mL  
Fa. BD Falcon 352052

Safe-Lock Tubes 1.5 mL  
Fa. Eppendorf 0030 121.848

Safe-Lock Tubes 2.0 mL  
Fa. Eppendorf 0030 120.094

### **Glasware**

Adhäsionsobjektträger 75x25x1 mm  
Fa. Marienfeld 901236

Deckgläser 13 mm Ø  
Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht KG 1001/13

Deckgläser 24x46 mm  
Fa. Marienfeld

Peel-a-way Disposable Embedding Molds (S22)  
Fa. Polysciences, Inc. 18646A

### **Standzentrifuge**

SIGMA 6K15 Rotor 11156/13127 (Swing out)

SIGMA 6K15 Rotor 12169

### **Tischzentrifuge**

SIGMA 1-15K

### **Laborgeräte**

Automaticpipetten 0,5 – 10  $\mu$ L  
Fa. Abimed

Automaticpipetten 2 – 20  $\mu$ L  
Fa. Abimed

Automaticpipetten 20 – 200  $\mu$ L  
Fa. Abimed

Automaticpipetten 100 – 1000  $\mu$ L  
Fa. Abimed

Brutschrank  
Fa. Binder GmbH

Cryotom HM 560 M  
Fa. Microm GmbH

Durchflußzytometer CYTOMICS FC500  
Fa. Beckman-Coulter

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100  
Fa. Carl Zeiss

Konfokales Mikroskop LSM 510 meta  
Fa. Carl Zeiss

Kühlschrank (4 °C / -20 °C)  
Fa. Liebherr glassline

Mikrowelle  
Fa. Bosch



Pipetus akku  
Fa. Hirschmann-Laborgeräte A41585G

Rührtisch MR 82  
Fa. Heidolph

Sicherheitswerkbank Hera safe  
Fa. Heraeus

Thermomixer compact  
Fa. Eppendorf

Tiefkühler (-20 °C)  
Fa. Liebherr comfort

Tiefkühler (-80 °C)  
Fa. Kryotec

Vortex Reax 1D R  
Fa. Heidolph

Waage BP410S  
Fa. Sartorius

Wasserbad SW-20C  
Fa. Julabo

Zählkammer Neubauer  
Fa. Optik Labor

## **IV. Verwendetes Untersuchungsgut**

### **1. Zellkulturen**

Für die verschiedenen Immunlokalisationen und Infektionsexperimente wurde eine Reihe von kommerziell erhältlichen Zelllinien verwendet, korrespondierend zu den entsprechenden humanen Tumoren.

Die Gallengangskarzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1, sowie die Kolonkarzinomzelllinie SW-480, wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurde vom Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), zur Untersuchung bereitgestellt.

Des Weiteren wurden die humane Leberkarzinomzelllinie HuH-7 von PD Dr. Jörg Heeren, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie (UKE), überlassen, sowie die Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu von PD Dr. J. Dahm-Daphi, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (UKE) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### **2. Kryoblöcke von Tumorgewebe**

Primäre humane Proben wurden von Prof. Dr. Dr. h.c. Xavier Rogiers, ehem. Direktor der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des UKE, aus deren Tumorgewebedatenbank zur Analyse zu Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben wurden vollständig anonymisiert, lediglich mit einer Gewebekblocknummer versehen und nach Tumorentität geordnet, als Kryoblöcke entgegengenommen.

Im Einzelnen stellten 6 cholangiozelluläre Karzinome, 7 hepatozelluläre Karzinome und 13 Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen das Untersuchungsgut dar.

### **V. Biochemische und zellbiologische Analysen**

#### **1. Zellkultur**

##### **a) Auftauen von Zellen**

Sämtliche Zelllinien wurden nach Erhalt, vor dem Wegfrieren von Kryostocks, sowie vor Versuchsreihen auf die Absenz von Mykoplasmen mittels eines PCR-basierten Tests (VenorGeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR, Fa. Minerva Biolabs) nach den Herstellerangaben untersucht.

Zum Auftauen der Zellen wurden die jeweiligen Kryoröhrchen, unter Beachtung der Sicherheitsvorschriften (Schutzkleidung, Schutzbrille), aus ihrem Lagerort in der Gasphase von flüssigem Stickstoff entnommen. Unmittelbar danach wurden die Röhrchen mit einem Kunststoffschwimmer in einem 37 °C warmen Wasserbad 2 Minuten lang erwärmt. Die aufgetaute Zelllösung wurde alsdann in eine, mit dem jeweiligen Nährmedium gefüllte, Kulturflasche pipettiert.

Nach etwa 2 bis 4 Stunden, beziehungsweise wenn der Großteil der Zellen adhärent war, wurde das Kulturmedium vollständig ausgetauscht, um das für die kryogene Lagerung beigefügte Dimethylsulfoxid (DMSO) aus der Kultur zu entfernen.

**b) Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die jeweiligen Zellen propagiert, bis geeignete Mengen subkonfluenten, sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Zellen vorhanden waren. Sodann wurden die Zellrasen vorsichtig in PBS (D-PBS - CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub>, Fa. Gibco Invitrogen Corporation) gewaschen, mit Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA, Fa. Gibco Invitrogen Corporation) im Inkubator bei 37 °C und unter Klopfen abgelöst und die Reaktion mit komplettem Medium gestoppt.

Die Zellen aus verschiedenen Flaschen wurden vereint und ein Aliquot zur Zählung entnommen. Es wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau (Sigma, 0,4%) angesetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Im Anschluss wurden die Zellen in ein 50 ml Gefäß (BLUE MAX Polypropylene Conical Tube, Fa. BD Falcon) überführt und bei 500 g zentrifugiert (SIGMA 6K15 Zentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet in einem derartigen Volumen des jeweiligen Gefriermediums aufgenommen, dass die Zellkonzentration  $2 - 5 \times 10^6$  pro ml betrug.

Das jeweilige Gefriermedium bestand aus dem entsprechenden kompletten Kulturmedium und zusätzlich DMSO in einer Endkonzentration von 10 Prozent. Aliquote von je 1 ml wurden in Kryoröhrchen (Fa. NUNC) langsam auf -80 °C gebracht und nach 24 bis 48 Stunden dann in die Gasphase von flüssigem Stickstoff, zur Lagerung bei -175 bis -185 °C verbracht.

**c) Routinekultur und Passagieren von Zellen**

Die Zellkulturen wurden in sterilen Zellkulturgefäßen der Firmen Nunc und TPP angezchtet, in Kultur gehalten und bei Bedarf entsprechend propagiert.

Die Zellen wurden in speziellen Brutschränken (Fa. Binder) bei 37 °C, 5 Prozent Kohlendioxidgehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Die genannten Parameter wurden laufend überwacht und die Inkubatoren in regelmäßigen Abständen einem Sterilisationsprogramm unterzogen.

Sämtliche Manipulationen an einer sich in Züchtung befindlichen Kultur wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe S2/L2 (Hera safe, Fa. Heraeus) durchgeführt. Für alle Pipettiervorgänge wurden ein Pipetus akku (Fa. Hirschmann Laborgeräte) und sterile serologische Pipetten (Fa. BD Falcon) oder Pipetten unterschiedlicher Volumenbereiche (Fa. Abimed) und entsprechende sterile Einmalspitzen (Fa. Sarstedt, Fa. Biozym) benutzt.

Kulturmedien wurden je nach Bedarf, spätestens aber nach drei Tagen ausgetauscht. Im Einzelnen wurden die unterschiedlichen Zellen mit den im Folgenden beschriebenen Medien ernährt:

Die HuH-7 und FaDu Zellen erhielten DMEM, welches bereits 4500 mg/L Glukose, GlutaMAX I und Natriumpyruvat enthielt (Fa. Gibco Invitrogen Corporation). Das Medium wurde durch Zugabe von fötalem bovines Serum (Hitzeinaktiviert, Fa. Gibco Invitrogen Corporation) in einer Endkonzentration von 10 Prozent und den Antibiotika Penicillin G und Streptomycinsulfat (Fa. Gibco Invitrogen Corporation), Endkonzentration 100 U/ml und 100 µg/ml respektive, vervollständigt.

Die Zelllinien SW-480, HT-29 und TFK-1 wurden in dem Medium RPMI 1640 kultiviert, welches ebenfalls bereits Glukose, Pyruvat und GlutaMAX I enthielt (Fa. Gibco Invitrogen Corporation). Das Medium wurde analog zu oben unter Verwendung von fötalem bovines Serum, Penicillin G und Streptomycinsulfat (Konzentrationen, Hersteller s.o.) komplettiert.

Die Zelllinie EGI-1 erhielt Dulbecco's MEM Medium mit den Zusätzen wie oben beschrieben und ergänzt durch zwei Aminosäurekonzentrate (MEM Essential Amino Acids (50x) - L-Glutamine, MEM Non-Essential Amino Acids (100x), Fa. Gibco Invitrogen Corporation).

Sobald die Zellen in einer Kulturflasche annähernd konfluent wuchsen, wurden diese passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen für einige Minuten mit PBS (D-PBS -CaCl<sub>2</sub>, -MgCl<sub>2</sub>, Fa. Gibco Invitrogen Corporation)

gespült und die Zellen dann unter Einsatz von Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA, Fa. Gibco Invitrogen Corporation) bei 37 °C und unter Klopfen über etwa 2 Minuten von der Wachstumsoberfläche abgelöst. Anschließend wurde komplettes Medium hinzugegeben, um die Proteasereaktion zu stoppen.

Die Zellen wurden dann, je nach Bedarf, im Verhältnis von 1:2 bis zu 1:12 in frischem Medium neu ausgesäht. Lediglich bei den EGI-1 Zellen war eine intensivere Ablösebehandlung nötig. Da diese Zellen stark adhärent wachsen, wurde das PBS für 20 Minuten auf dem Zellrasen belassen und anschliessend für 10 bis 12 Minuten trypsiniert.

### **2. Anfertigung von Kryoschnitten**

Die Kryoblöcke von humanen Karzinomen wurden zunächst von ihrer Langzeitlagerung bei -80 °C im Tiefkühlfach auf -20 °C gebracht. Im Anschluss wurden die zu schneidenden Blöcke, unter Verwendung von Tissue Tek OCT Compound (Fa. Sakura über Fa. Vogel), auf Trägerplättchen aufgefroren und dann in einem Kryostaten mit einem Kryotom (Fa. Microm GmbH) bei -20 °C geschnitten. Die Schichtdicke betrug in der Regel 5 µm.

Die so angefertigten Kryoschnitte wurden auf Histobond-Adhäsionsobjektträger (Fa. Marienfeld) aufgezogen und sofort für etwa zwei Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -20 °C im Tiefkühlfach gelagert.

### **3. Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Zellen**

Für die Immunlokalisation an Zellkulturen wurden die jeweiligen Zellen zunächst frisch aus der Kultur durch Trypsinierung (s. o.) geerntet, einer Vitalfärbung mit Trypanblau unterzogen und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Diese Zellen wurden dann, mindestens 48 Stunden vor der geplanten Immunfärbung, in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^4$  pro well, in einer sterilen 12-well Multischale (Fa. Nunc) auf runden Deckgläschen (*Coverslips*, Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht KG) ausgesät.

Sobald die Zellen, nach etwa zwei Tagen, einen ausreichend dichten Zellrasen ausgebildet hatten, wurden die Deckgläschen entnommen, kurz in PBS getaucht und sofort mit einer 37 °C warmen Fixierungslösung für 30 Minuten überschichtet. Die Fixierungslösung enthielt 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS.

Das Paraformaldehyd war zunächst als 8%-ige konzentrierte Lösung in zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest) hergestellt (Harlow und Lane 1988, S. 374) und Portionsweise bei -20 °C eingefroren worden. Die Gebrauchslösung wurde dann durch Erwärmen des Konzentrates und Hinzufügen eines entsprechend gleichen Volumens von zweifach konzentriertem PBS frisch hergestellt.

Nach dem Fixierungsschritt wurden die Deckgläschen mehrere Male in jeweils frischem PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte ein fünfminütiges Bad in PGS-Lösung (0,5 % Glycin, 0,05 % Saponin in PBS pH 7,4) zur Permeabilisation der Zellmembranen.

Sodann wurde die Lösung durch Tupfen auf Löschpapier entfernt und die Deckgläschen mit je 60 µL Donkey/Horse/BSA-Mixtur überschichtet. Diese enthielt 10% Eselserum (Fa. Dianova), 5% Pferdeserum (Fa. Gibco Invitrogen Corporation) und 1% bovines Serumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin Fraction V, Fa. PAA Laboratories), und wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) belassen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (sogenanntes *Blockieren*).

Nach erneutem Abtupfen wurden die Deckgläschen mit 60  $\mu$ L einer 1:200 Verdünnung des monoklonalen Maus anti-human CAR Antikörpers RmcB (Fa. Upstate Biotechnology), in Donkey/Horse/BSA-Mixtur, überschichtet und für eine Stunde im Brutschrank (Fa. Binder) bei 37 °C inkubiert. Es folgten mehrere Waschgänge in PBS und PGS-Lösung.

Als nächstes wurden je 60  $\mu$ L eines 1:500 in Donkey/Horse/BSA-Mixtur Verdünnten, Indocarbocyanin-markierten (Cy3, Exzitationsmaximum 550 nm, Emissionsmaximum 570 nm), affinitätsgereinigtem Esel anti-Maus Zweitantikörpers (Jackson Immunoresearch via Fa. Dianova) auf die Deckgläschen pipettiert und für 45 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Es folgten abermals Waschungen in PBS und eine Gegenfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in PBS. Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen unter Verwendung von neun Teilen Mowiol (2,4 g Mowiol 4.88, 6 g Glycerol, 6 ml ddH<sub>2</sub>O, 12 ml 0.2M Tris pH 8,5), einem Teil PPD (p-Phenylendiamin, 1% Lösung in PBS) und Nagellack auf Objektträgern fixiert (Vanes u. Brandt 1985).

Für jede Zelllinie wurde jeweils eine Negativkontrolle im selben Färbevorgang mitgeführt. Die Negativkontrollen wurden exakt wie die Verumfärbungen behandelt, lediglich der Primärantikörper RmcB wurde weggelassen. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert und die Fluorophore mit einem Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop (Fa. Carl Zeiss) visualisiert.

Nachstehend ist das genaue Protokoll stichwortartig dargestellt:



01. Coverslips in 4% PFA in 1X PBS, 30' @ RT fixieren
02. PBS, pH 7,4, 5 x 5', dann 1 x 5' in PGS waschen
03. Blockieren mit Donkey/Horse/BSA-Mix, 20' @ RT
  - 10% (v/v) Donkey Serum, 5% (v/v) Horse Serum, 1% (w/v) BSA in PGS
  - PGS (0,5% Glycin, 0,05% Saponin in PBS, pH 7,4)
04. Anti – hCAR (RmcB) mAb in Donkey/Horse/BSA-Mix, 1h @ 37 °C
  - Verdünnung: 1:200
05. 2 x in PBS dippen, 2 x 5' in PGS waschen
06. 2° Cy3-labeled Donkey anti-Mouse Ab, 45' @ 37 °C
  - 1 : 500 in Donkey/Horse/BSA-Mix
07. 2 x in PBS dippen, 3 x 5' in PBS waschen
08. DAPI, 5' @ RT
  - 5 µL DAPI Stock-Lösung (5 mg DAPI / 20 mL @ 4 °C) auf 100mL PBS
09. 3 x 5' in PBS waschen
10. in MOWIOL mit PPD (anti-fading reagent) eindeckeln
  - MOWIOL (Stock @ -20 °C)
  - 1 : 10 PPD (1% in PBS Stock @ -20 °C, auf 0,1%)

---

Tabelle 1:

**Laborprotokoll Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Zellen.**

#### **4. Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Kryoschnitten von Tumorgewebe**

Die Darstellung des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors in Gewebeproben erfolgte ebenfalls mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Die wie oben beschrieben hergestellten Kryoschnitte wurden aus der Tiefkühlagerung entnommen und die Gewebeanschnitte sofort mit einer 37 °C warmen, 4 %-igen PFA-Lösung (s. o.) für 30 Minuten zur Fixierung überschichtet. Im Anschluss hieran wurden mehrere Waschschrte in PBS und einer in PGS-Lösung durchgeführt.

Es folgte ein Blockierschritt mit der Donkey/Horse/BSA-Mixtur, wie unter V.3 beschrieben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Diese wurde dann abgetupft und 70 µL einer 1:200 Verdünnung des monoklonalen Maus anti-human CAR Antikörpers RmcB, in Donkey/Horse/BSA-Mixtur, auf die Gewebeanschnitte gegeben. Der Primärantikörper wurde über Nacht, für circa 20 Stunden bei 4 °C in der feuchten Kammer, auf den Schnitten belassen.

Nach mehreren Waschschritten in PBS und PGS-Lösung wurden je 70 µL eines 1:500 in Donkey/Horse/BSA-Mixtur verdünnten, Indocarbocyanin-markierten (Cy3), affinitätsgereinigtem Esel anti-Maus Zweitantikörpers (Jackson Immunoresearch via Fa. Dianova) auf die Kryoschnitte pipettiert und für 90 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Es folgten wiederum PBS-Waschschrritte und eine Anfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte, unter Verwendung eines Gemisches aus neun Teilen Mowiol (s. o.) und einem Teil PPD (p-Phenylendiamin, 1% Lösung in PBS), mit Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Für jede Tumorgewebeprobe wurde jeweils eine Negativkontrolle im selben Färbeporgang mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde exakt wie die Verumfärbung behandelt, lediglich der Primärantikörper RmcB wurde weggelassen.

Die gefärbten Schnitte wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert und die Fluorophore mit einem Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop (Fa. Carl Zeiss) visualisiert.

Im Folgenden ist das genaue Protokoll stichwortartig wiedergegeben:

01. Kryoschnitte in 4% PFA in 1X PBS 30' @ RT fixieren
02. PBS, pH 7,4, 3 x 5', dann 1 x 5' in PGS waschen
03. Blockieren mit Donkey/Horse/BSA-Mix, 30' @ RT
  - 10% (v/v) Donkey Serum, 5% (v/v) Horse Serum, 1% (w/v) BSA in PGS
  - PGS (0,5% Glycin, 0,05% Saponin in PBS, pH 7,4)
04. Anti – hCAR (RmcB) mAb in Donkey/Horse/BSA-Mix, 20h @ 4 °C (über Nacht)
  - Verdünnung: 1:200
05. 2 x in PBS, 2 x 5' in PGS waschen
06. 2° Cy3-labeled Donkey anti-Mouse Ab, 90' @ 37 °C
  - 1 : 500 in Donkey/Horse/BSA-Mix
07. 1 x spülen, 3 x 5' in PBS waschen
08. DAPI, 10' @ RT
  - 5 µL DAPI Stock-Lösung (5 mg DAPI / 20 mL @ 4 °C) auf 100mL PBS
09. 3 x 5' in PBS waschen
10. in MOWIOL mit PPD (anti-fading reagent) eindeckeln
  - MOWIOL (Stock @ -20 °C)
  - 1 : 10 PPD (1% in PBS Stock @ -20 °C, auf 0,1%)

---

Tabelle 2:

**Laborprotokoll Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Kryoschnitten.**

## **5. Kolokalisation von CAR und ZO-1**

### **a) An Zellkulturen**

Die Immunlokalisation erfolgte weitestgehend analog zur CAR-Färbung. Zusätzlich zu dem monoklonalen Antikörper RmcB (anti-human CAR) war jedoch, als weiterer Primärantikörper, ein polyklonaler, affinitätsgereinigter Hase anti-human ZO-1 Antikörper (Fa. Zymed Laboratories Inc.) in einer Verdünnung von 1 : 500, bei der Inkubation zur simultanen Bindung vorhanden.

Ebenso war bei der Inkubation der Sekundärantikörper zusätzlich ein Alexa Fluor 488-markierter (Exzitationsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 519 nm), affinitätsgereinigter Esel anti-Hase IgG Antikörper (Fa. Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1 : 500 vorhanden.

Die Visualisierung der Fluoreszenzfarbstoffe und die Kolokalisation der Signale erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 meta (Fa. Carl Zeiss).

**b) An Kryoschnitten von Tumorgewebe**

Die Immunlokalisation erfolgte analog zur CAR-Darstellung.

Außer dem monoklonalen Antikörper RmcB (anti-human CAR) war jedoch, als weiterer Primärantikörper, noch ein polyklonaler, affinitätsgereinigter Hase anti-human ZO-1 Antikörper (Fa. Zymed Laboratories Inc.) in einer Verdünnung von 1 : 150, bei der Inkubation zur simultanen Bindung vorhanden.

Ebenso war bei der Inkubation der Zweitantikörper zusätzlich ein Alexa Fluor 488-markierter, affinitätsgereinigter Esel anti-Hase IgG Antikörper (Fa. Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1 : 500 vorhanden.

Die Visualisierung der Fluoreszenzfarbstoffe und die Kolokalisation der Signale erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 meta (Fa. Carl Zeiss).

**6. Infektion der Zellkulturen mit Ad-GFP**

Für die Arbeiten mit Adenoviren galten besondere Vorsichtsmaßnahmen und Verhaltensregeln. In der Natur vorkommende Adenoviren sind an sich bereits oft hochinfektiös. So stellt zum Beispiel Adenovirus, als Erreger der *Keratokonjunctivitis epidemica*, betroffene Einrichtungen vor außergewöhnliche Herausforderungen bei der Eindämmung.

Experimentell, als Genföhren verwendete Adenoviren stellen auöerdem gentechnologisch verönderte Organismen (GVO) dar, bei deren Verwendung besondere Sicherheitsvorschriften zum Tragen kommen.

Alle Arbeiten unterlagen der Sicherheitsstufe S2 und wurden ausschlieölich in dafür abgenommenen Laboren durchgeföhrt. Es wurde eine Reinluftarbeitsbank der Stufe S2/L2 (Hera safe, Fa. Heraeus) benutzt. Bei allen Arbeiten wurde Aerosolbildung vermieden. Es kamen keine Ethanol-Sprayflaschen, sondern formalinhaltige Desinfektionslösungen zum Einsatz. Für alle Pipettierarbeiten wurden aerosolfeste Einmalspitzen verwendet. Feste und flüssige Abfälle wurden, getrennt voneinander, unter der Arbeitsbank in geeigneten Gefößen gesammelt und vor dem Entsorgen autoklaviert. Für die Arbeiten wurde ein ausschlieölich hierfür reservierter Brutschrank (Fa. Binder) benutzt und dieser, vor und nach den Arbeiten, dem integrierten Sterilisationsprogramm unterzogen.

Sämtliche untersuchten Zelllinien wurden, zusätzlich zur Erhebung ihres CAR-Status, auf ihre Infizierbarkeit mit einem, das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) als Transgen codierenden Adenovirus (Ad-GFP), hin untersucht. Das verwendete Adenovirus vom Serotyp 5 (Ad-5 Standardvektor) war durch Deletionen in den adenoviralen Genregionen E1 und E3 replikationsinkompetent gemacht worden ( $\Delta E1$  und  $\Delta E3$ ) und enthielt das GFP-Transgen unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV)-Promoters.

Das Virus ist, als laboreigene Präparation, auf N52.E6 Zellen (humane Amniozyten-Zelllinie (Schiedner et al. 2000)) aufgezogen (stellen E1 *in trans* zur Verfügung), über Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugationen aufgereinigt und mit dem Adeno-X Rapid Titer Kit (Fa. Clontech) nach Herstellerangaben titriert worden.

Ad-GFP stand für meine Experimente als fertige Viruslösung mit einer Konzentration von  $5,0424 \times 10^7$  Viruspartikeln pro  $\mu\text{L}$ , in Lagerpuffer für Adenoviren (10 mM TrisCl pH 8,0, 135 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% Glycerol) zur Verfügung.

Der ursprüngliche Vektor Ad-GFP war der Arbeitsgruppe von Dr. Roland Vogel (Max-Planck-Einheit für Stukturbiologie, Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Für die adenovirale Transfektion wurden die jeweiligen Zellen zunächst in oberflächenbehandelten 6-well Multischalen (Fa. TPP via Biozym), in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well, ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen aus einem Well gelöst und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer, stellvertretend für alle Wells, bestimmt, um die adenovirale Infektionsdosis berechnen zu können.

Jede Zelllinie wurde mit einer *multiplicity of infection* (MOI, Viruszahl pro zu infizierende Zelle) von 10 und 100 transfiziert, jeweils als Vierfachbestimmung. Für die Quadruplikatbestimmungen wurde dann, für jede MOI und Zelllinie, die Menge an benötigten infektiösen Viruspartikeln (ifu, *infectious unit*) berechnet und für jedes Well 800  $\mu$ L Viruslösung, eingestellt auf die entsprechende MOI, in 1,5 mL Safe-Lock Tubes (Fa. Eppendorf) bereitgestellt.

Um den Pipettierfehler im Angesicht der hohen Virustiter möglichst gering zu halten, wurden zwei Viruskonzentrate angesetzt, die sich um genau eine Zehnerpotenz unterschieden, so dass beim Zusammenmischen der 800  $\mu$ L Viruslösung für die MOI 10 und 100 exakt die gleichen Volumina pipettiert werden konnten (siehe unten). Das Kulturmedium wurde sodann aus den Wells abgesaugt und durch jeweils 800  $\mu$ L der entsprechenden Viruslösung ersetzt. Die Multischalen wurden dann für 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um eine hinreichende Virusadsorption (*attachment*) zu gewährleisten.

Die Viruslösung wurde dann vollständig abgenommen und mit 3 mL komplettem Nährmedium pro Well aufgefüllt.

Nach 24 Stunden erfolgte dann die Analyse der transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflußzytometrie.

Das Arbeitsprotokoll ist nachstehend tabellarisch angeführt.

Tag 0:

01. Zellen in 6-well Multischalen aussäen,  $4 \times 10^5$  / well

02. Pro Zelllinie 1 well für Negativkontrolle einplanen

→ keine Infektion, Hintergrundfluoreszenzbestimmung Durchflußzytometrie

Tag 1:

03. Zellzahl bestimmen in Neubauer-Zählkammer

04. Ad-GFP Viren für MOI 10 und 100 berechnen

05. Medium vollständig abnehmen

06. Pro Well 800  $\mu$ L Viruslösung (eingestellt auf die jeweilige MOI) hinzugeben

→ Für jedes Well die jeweilige Verdünnung aus den entsprechend angesetzten Stocklösungen (s. u.) und warmem komplettem Medium ansetzen

07. 3h bei 37 °C im Inkubator belassen (*Virus-attachment*)

08. Virus komplett abnehmen und mit 3 mL Medium / Well auffüllen

09. 24h inkubieren

Tag 2:

10. Analyse der Transgenexpression mittels Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Ad-GFP Titer:  $5,0424 \times 10^{10}$  ifu/mL, 20  $\mu$ L in Lagerpuffer für Adenoviren

Viruslösung A:  $10^7$  ifu/ $\mu$ L =  $10^{10}$  ifu/mL → 20  $\mu$ L Ad-GFP + 80  $\mu$ L Medium

Viruslösung B:  $10^6$  ifu/ $\mu$ L =  $10^9$  ifu/mL → 10  $\mu$ L Viruslösung A + 90  $\mu$ L Medium

Rechenbeispiel: Zellzahl =  $1,2 \times 10^6$  / Well

d.h. für MOI 10  $1,2 \times 10^7$  ifu nehmen, also 12  $\mu$ L Viruslösung B

d.h. für MOI 100  $1,2 \times 10^8$  ifu nehmen, also 12  $\mu$ L Viruslösung A

---

Tabelle 3:

**Laborprotokoll Infektion der Zellkulturen mit Ad-GFP.**

## 7. Quantifizierung von GFP-transfizierten Zellen mittels Durchflußzytometrie

Die mit Ad-GFP transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden zunächst mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100, unter Verwendung einer digitalen Kamera AxioCam (beides Fa. Carl Zeiss), aufgenommen.

Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der das GFP exprimierenden Zellen im Durchflußzytometer Cytomics FC 500 (Fa. Beckman-Coulter). Hierzu wurde in den 6-well Multischalen das Kulturmedium abgesaugt, mit PBS gespült und der Zellrasen dann mit Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Gibco Invitrogen Corporation) abgelöst.

Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in 2 mL Safe-Lock Tubes (Fa. Eppendorf) bei 500 g zentrifugiert (SIGMA 1-15K Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in PBS aufgenommen.

Für jede Zelllinie und MOI entstanden so vier Proben für die Quadruplikatbestimmungen. Die Proben wurden im Durchflußzytometer gemessen, dabei wurden je Probe  $2 \times 10^4$  Ereignisse erfasst und die GFP-Positiven Zellen (Fluoreszenz größer oder gleich  $10^0$  im GFP-Kanal) als prozentualer Wert ermittelt.

Die so ermittelten Infektionsraten der vier Proben pro MOI und Zelllinie wurden in Microsoft EXCEL tabellarisch erfasst. Mit den entsprechenden Funktionen wurden dann jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet und die Daten in Balkendiagrammen mit Fehlerindikatoren graphisch dargestellt.



## **D. Ergebnisse**

### **I. Etablierung der CAR-Immunlokalisation**

Die immunologische Färbung auf den Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor wurde schrittweise, in Versuchsreihen und zunächst an Zellkulturen entwickelt.

Der monoklonale Maus anti-human CAR Antikörper RmcB (Fa. Upstate Biotechnology) wurde kommerziell erworben. Zunächst musste die geeignete Arbeitskonzentration ermittelt werden. Hierfür wurde ein vollständig im Labor etabliertes, immunzytochemisches Färbeprotokoll verwendet, um an einem bestehenden System zunächst selektiv eine geeignete Primärantikörperverdünnung zu ermitteln.

An HuH-7 Zellen wurden serielle Verdünnungen des Primärantikörpers RmcB ausgetestet, wobei alle anderen Bedingungen bei der Immunzytochemie identisch waren. So wurde eine RmcB-Verdünnung von 1 : 200 ermittelt, die ein gutes Färbeergebnis lieferte.

Mit dieser Verdünnung des Antikörpers RmcB wurde dann ein Protokoll für eine Immunfluoreszenzdarstellung an HuH-7 Zellen adaptiert, das im Ergebnis dem oben angegebenen Protokoll entspricht. Von der Immunfluoreszenz wurde nicht nur eine optimale Auflösung erwartet, sie war auch entscheidend für die Möglichkeit zur Kolokalisation am konfokalen Mikroskop.

Die derart ermittelten Reaktionsbedingungen stellten dann auch die Basis für die Adaptierung des Färbeprotokolls an Gewebekryoschnitte dar.

Die optimale Verdünnung für den Primärantikörper RmcB wurde nochmals überprüft und bestätigt. Die Inkubationszeiten für die Antikörper wurden variiert, bis zufrieden stellende Ergebnisse erzielt wurden. Gleichzeitig wurde die Spezifität der Immunfluoreszenz anhand von Negativkontrollen ohne Primärantikörper überprüft.

Das auf diesem Wege ermittelte Protokoll für die CAR-Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten entspricht dem in Abschnitt C angegebenenem.

## **II. CAR-Status und Infizierbarkeit humaner Tumorzelllinien**

Die Leberkarzinomzelllinie HuH-7, die Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu, die Gallengangskarzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1, sowie die Kolonkarzinomzelllinien SW-480 und HT-29 wurden in Kultur propagiert und für die CAR-Färbung auf Deckgläschen ausgesät.

Die Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors erfolgte exakt nach dem in Abschnitt C genannten Färbeprotokoll. Für die Infektionsexperimente wurden die Zellkulturen in oberflächenbehandelten 6-well Multischalen (Fa. TPP via Biozym) aufgezogen und nach dem oben beschriebenen Verfahren mit einem GFP-kodierenden Adenovirus (Ad-GFP) transfiziert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 100, ausgestattet mit der Digitalkamera AxioCam, aufgenommen.

Im Anschluss hieran erfolgte die durchflußzytometrische Quantifizierung der GFP-positiven Zellen mit einem Cytomics FC 500 Durchflußzytometer (Fa. Beckman-Coulter).

Die Ergebnisse der Färbung und Infektion sind in den folgenden Abbildungen tabellarisch dargestellt. Die Aufnahmen der GFP-Infektionen und der indirekten Immunfluoreszenz wurden nicht an den jeweils gleichen Zellpräparaten durchgeführt und weisen daher unterschiedliche Muster (Zellcluster) auf.

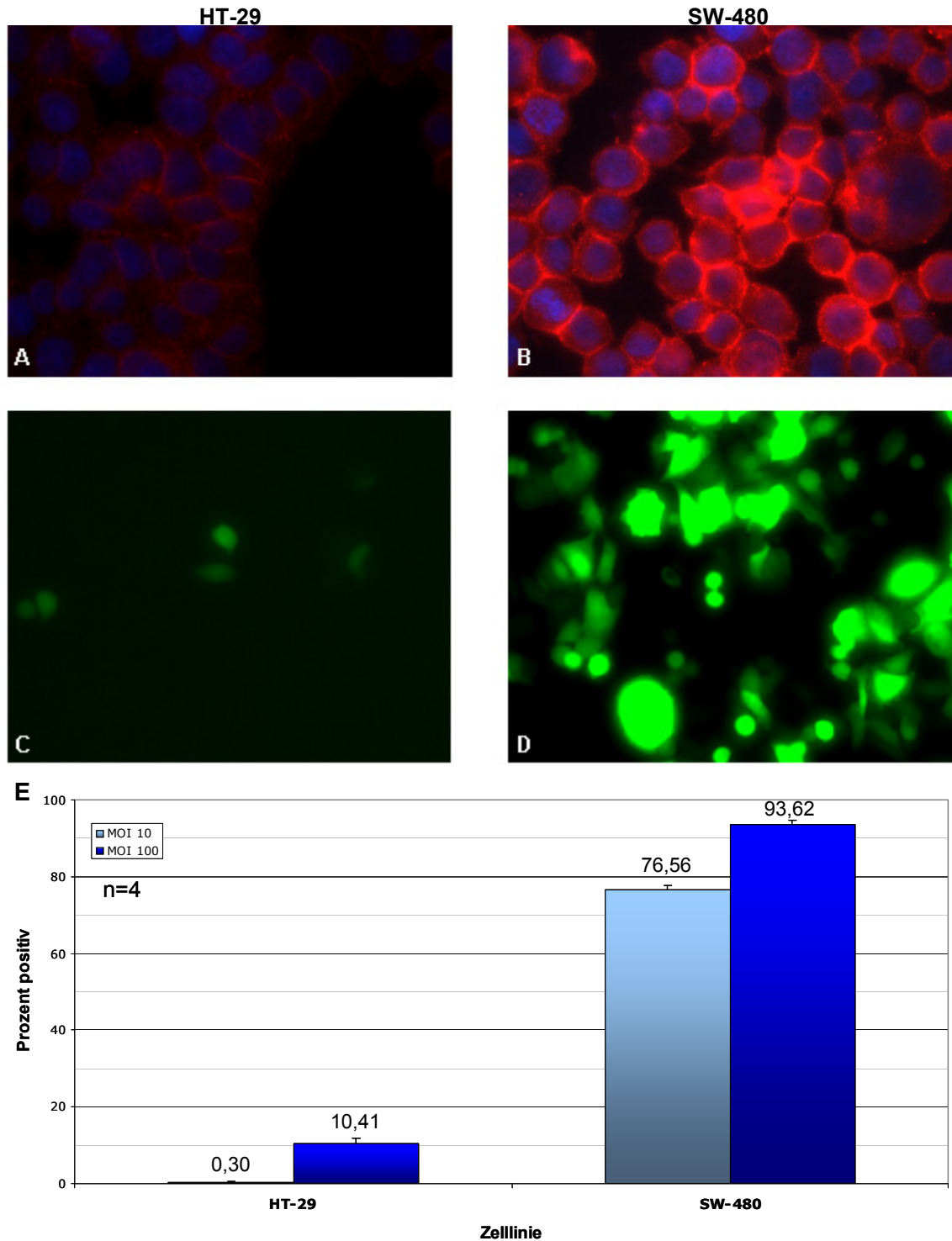


Abbildung 6:

**Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.**  
 A und B: CAR-Expression (rot, Cy3) der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW-480. Vergrößerung 400X. C und D: GFP-Signale (grün) nach Infektion mit Ad-GFP (*multiplicity of infection* [MOI] 100). Vergrößerung 200X. E: Transfektionsrate der Zelllinien nach Ad-GFP Infektion (MOI 10 und 100). Die Balken geben den Mittelwert (n=4), die Fehlerbalken die Standardabweichung der Infektionsraten wieder.

Präparat: A und B: Zellen auf Coverslips, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI. C und D: Monolayer-Infektion mit Ad-GFP (MOI 100). E: Infektion der Zelllinien mit Ad-GFP (MOI 10 und 100) im Monolayer, Bestimmung der Transfektionsrate durchflußzytometrisch.

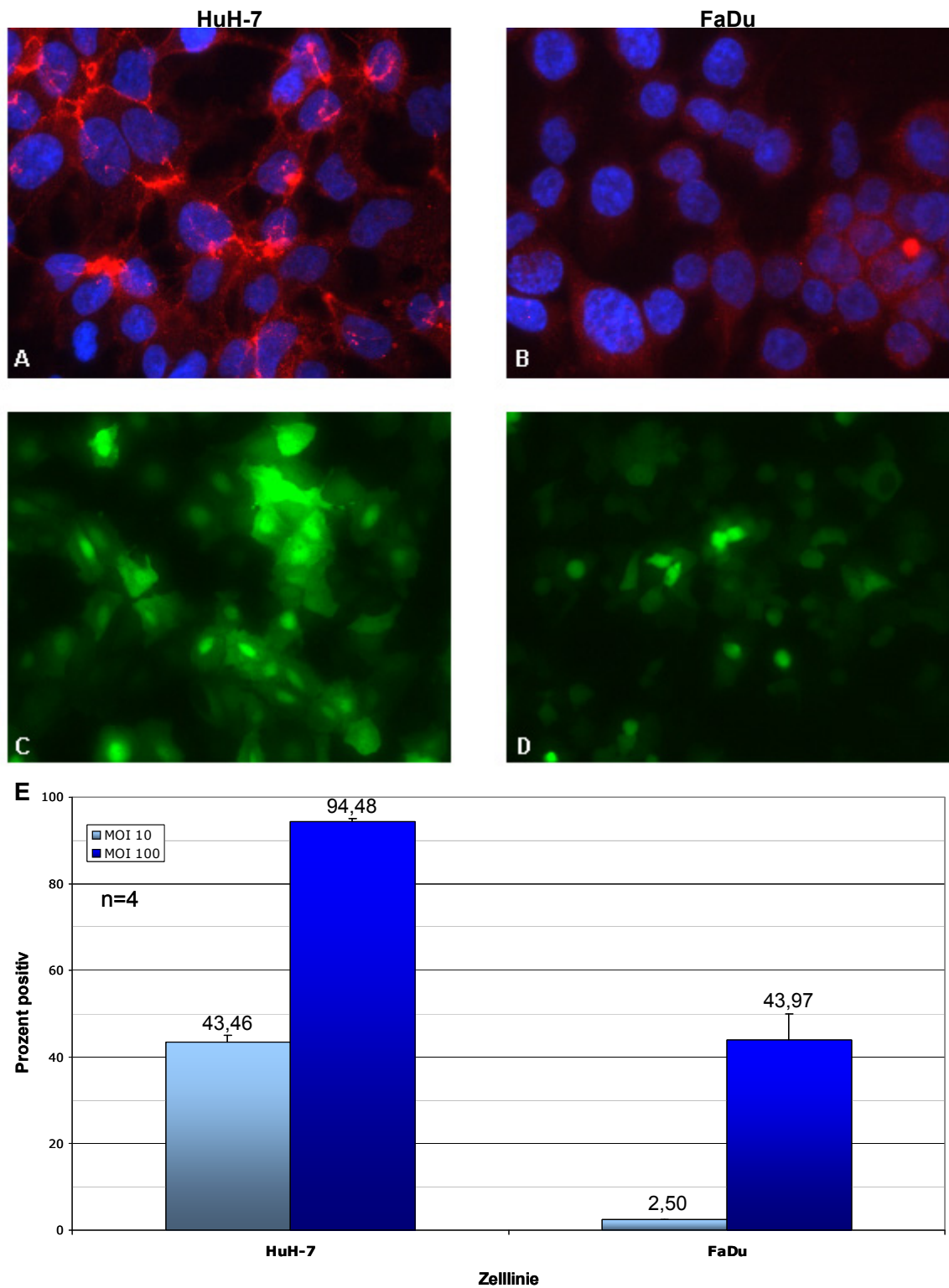


Abbildung 7:

**Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.**

A und B: CAR-Expression (rot, Cy3) der Zelllinien HuH-7 (HCC) und FaDu (Plattenepithel-Ca). Vergrößerung 400X. C und D: GFP-Signale (grün) nach Infektion mit Ad-GFP (*multiplicity of infection* [MOI] 100). Vergrößerung 200X. E: Transfektionsrate der Zelllinien nach Ad-GFP Infektion (MOI 10 und 100). Die Balken geben den Mittelwert (n=4), die Fehlerbalken die Standardabweichung der Infektionsraten wieder.

Präparat: A und B: Zellen auf Coverslips, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI. C und D: Monolayer-Infektion mit Ad-GFP (MOI 100). E: Infektion der Zelllinien mit Ad-GFP (MOI 10 und 100) im Monolayer, Bestimmung der Transfektionsrate durchflußzytometrisch.

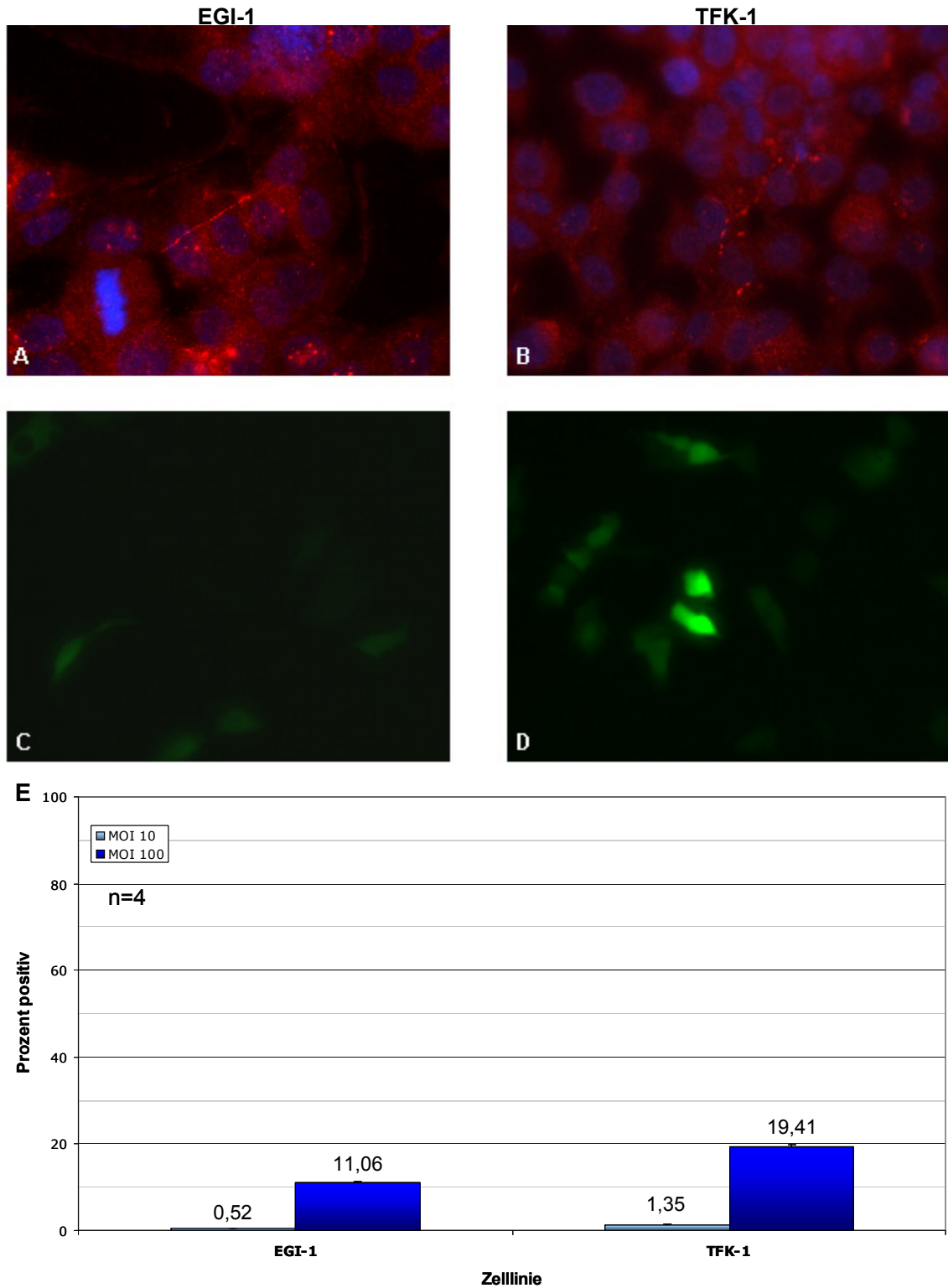


Abbildung 8:

**Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.**

A und B: CAR-Expression (rot, Cy3) der Cholangiokarzinom-Zelllinien EGI-1 und TFK-1. Vergrößerung 400X. C und D: GFP-Signale (grün) nach Infektion mit Ad-GFP (*multiplicity of infection* [MOI] 100). Vergrößerung 200X. E: Transfektionsrate der Zelllinien nach Ad-GFP Infektion (MOI 10 und 100). Die Balken geben den Mittelwert (n=4), die Fehlerbalken die Standardabweichung der Infektionsraten wieder.

Präparat: A und B: Zellen auf Coverslips, Primäntikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundäntikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI. C und D: Monolayer-Infektion mit Ad-GFP (MOI 100). E: Infektion der Zelllinien mit Ad-GFP (MOI 10 und 100) im Monolayer, Bestimmung der Transfektionsrate durchflußzytometrisch.

Die Resultate der Färbung auf CAR und der Infektionsexperimente mit Ad-GFP bei den beiden Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW-480 sind in Abbildung 6 gezeigt.

Dabei steht einer erkennbar höheren CAR Expression (A und B) bei den SW-480 Zellen ebenfalls eine höhere Transfektionseffizienz bei der Infektion mit Ad-GFP (C und D) und eine höhere Transfektionsrate in der Durchflußzytometrie (E, 93,62 Prozent [bei MOI 100] versus 10,41 Prozent GFP-positiver Zellen bei HT-29 Zellen, n=4), im Vergleich mit den HT-29 Zellen gegenüber.

Bei der MOI 10 sind die erzielten Transfektionsraten noch stärker divergierend, nämlich 76,56 Prozent bei den SW-480 Zellen gegenüber 0,3 Prozent GFP-positiver HT-29 Zellen. Ursächlich für den geringeren Anstieg der, sich ohnehin auf hohem Niveau befindlichen, Transfektionsraten bei den SW-480 Zellen, obwohl die Viruslast pro Zelle eine Zehnerpotenz höher lag, ist am Ehesten eine Sättigungskinetik bei der Virusadsorption am CAR-Rezeptor.

Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der HuH-7 Leberzellkarzinomzelllinie im Vergleich mit den FaDu Zellen (Plattenepithelkarzinomzellen). Von den FaDu Zellen war schon aus Versuchen einer anderen Arbeitsgruppe um PD Dr. J. Dahm-Daphi, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (UKE), eine relative schlechte Infizierbarkeit mit Adenoviren bekannt.

So imponieren in Abbildung 7 die HuH-7 Zellen mit einer höheren CAR-Expression in der Immunfluoreszenz (A und B), intensiveren GFP Signalen, nach Transfektion mit Ad-GFP, in der Fluoreszenzmikroskopie (C und D) und schließlich auch mit der höheren Transfektionsrate in der Durchflußzytometrie (E, 94,48 Prozent [bei MOI 100] versus 43,97 Prozent GFP-positiver FaDu Zellen, n=4).

Die Gallengangskarzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1 zeigen hingegen recht homogene Resultate. Wie in Abbildung 8 erkennbar, zeigen beide Zelllinien in der Immunfluoreszenz geringe CAR-Signale (A und B), ebenso bieten beide nur sporadische GFP-Fluoreszenz nach Transfektion mit Ad-GFP mit einer MOI von 100 (C und D), wobei die TFK-1 Zellen etwas intensivere Signale liefern.

Dieses spiegelt sich dann auch in den durchflußzytometrisch ermittelten Transfektionsraten wieder, wo die TFK-1 Zellen besser zu infizieren waren, wenn auch auf niedrigem Niveau (E, 19,41 Prozent [bei MOI 100] gegenüber 11,06 Prozent GFP-positiver EGI-1 Zellen, n=4).

### III. CAR-Expression in humanen Karzinomen

Der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor wurde in Gewebeproben humaner Karzinome mit einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

Kryoschnitte der Tumoren wurden in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung 30 Minuten lang fixiert und dann dem Färbeprotokoll unterzogen, wie unter Abschnitt C beschrieben. Die fertig gefärbten Schnitte wurden dann mit einem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 100, unter Verwendung der Digitalkamera AxioCam, analysiert und aufgenommen.

Die Resultate sind nachfolgend aufgeführt, für jedes Karzinom exemplarisch ein Fall. Die jeweils kompletten Aufnahmeserien der Karzinome sind im Anhang beigefügt.

#### 1. Analyse der CAR-Expression im CCC

Alle untersuchten Kryoschnitte von Gewebeproben der cholangiozellulären Karzinome (n=6) zeigten intensive CAR-Signale in der Immunfluoreszenz. Im gesamten Tumorbereich ließ sich regelhaft der CAR-Rezeptor nachweisen.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch den Fall Nummer 0005.

Der Car-Rezeptor ist hier besonders intensiv an den Zellmembranen, auch im Bereich der basolateralen Zell-Zell-Kontakte, nachzuweisen (D, Pfeile), was weitestgehend seiner beschriebenen physiologischen Lokalisation in *tight junctions* von Normalgewebe entspricht.

Ergänzend hierzu ist der CAR-Rezeptor in diesen maligne veränderten Gallengangsepithelien auch im apikalen, adluminalen Bereich darstellbar (D, Pfeilspitzen, Pfeile).



Das im CCC reichlich vorhandene Tumorstroma (Bindegewebe) ist in allen untersuchten Fällen weitestgehend signalfrei (siehe A, B), die Negativkontrollen zeigen nur die Zellkerne im DAPI-Kanal (C), bei vereinzelt minimaler Hintergrundfluoreszenz.

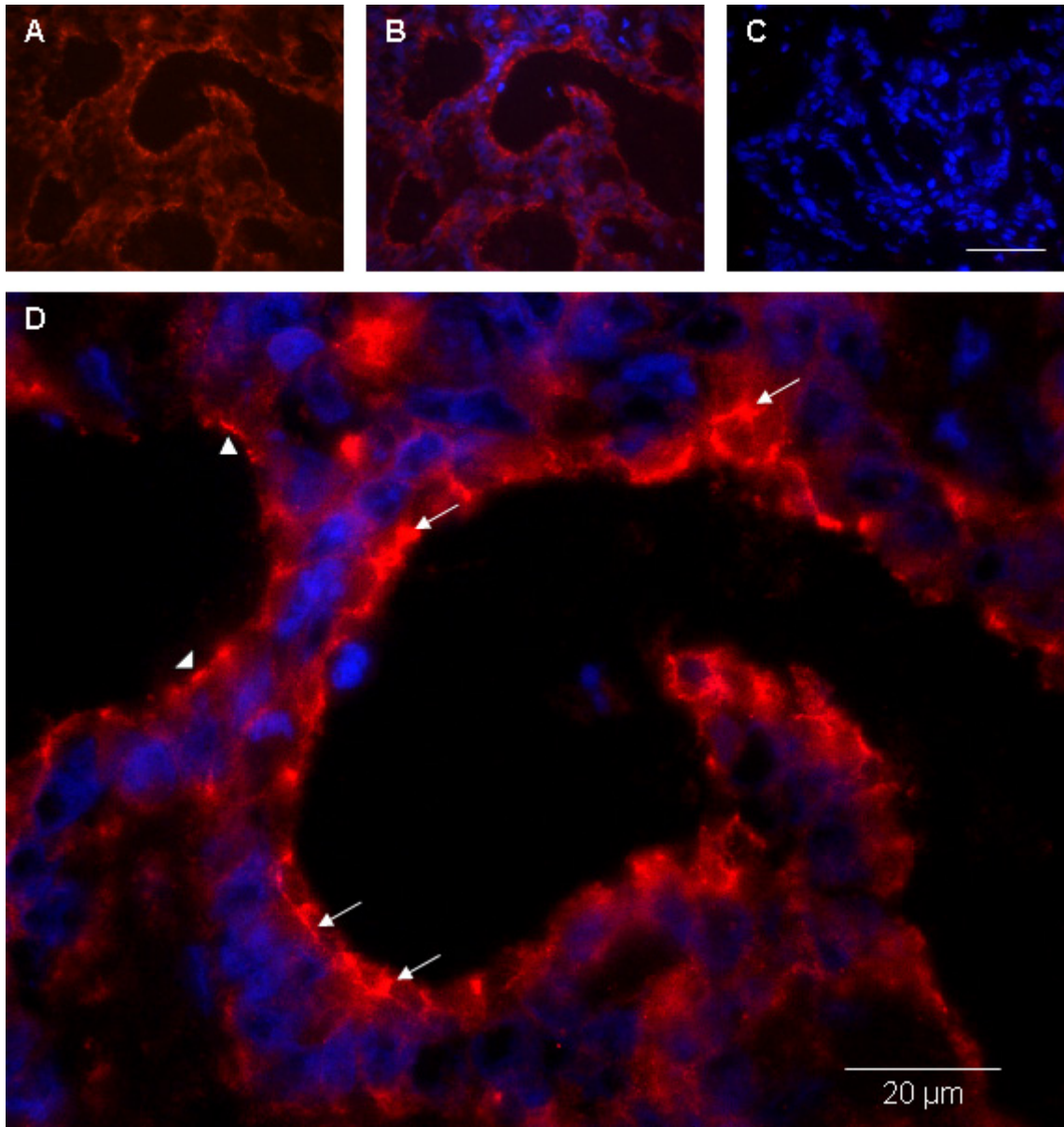


Abbildung 9:

**Darstellung des Cox sackie- und Adenovirus Rezeptors im cholangiozellulären Karzinom (CCC, Fall 0005) mittels indirekter Immunfluoreszenz.**

Deutliche CAR-Signale (rot, Cy3) sind im Bereich der Interzellularkontakte (Pfeile) und im adluminalen, apikalen Bereich (Pfeilspitzen, Pfeile) der Tumorzellen des Karzinoms zu sehen.

A: Cy3-Kanal (CAR), B: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), C: Negativkontrolle. Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm. D: Cy3-Kanal (CAR) und DAPI-Kanal (Zellkerne). Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primäntikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-human CAR [hCAR]), Sekundäntikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).

## 2. Analyse der CAR-Expression im HCC

Die untersuchten Kryoschnitte von Gewebeblöcken der hepatozellulären Karzinome (n=7) zeigten eine sehr heterogene CAR-Expression in der Immunfluoreszenz.

CAR-Signale ließen sich nicht regelhaft in allen Präparaten nachweisen, sondern entweder gar nicht oder teils auch nur sporadisch.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch den Fall Nummer 0017. Der Virusrezeptor ist hier intermittierend an den Zellmembranen, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte nachzuweisen (D, Pfeile), jedoch nur in Teilen des Präparates.

Von den 7 untersuchten Gewebeproben zeigten nur 3 intensive CAR-Signale, in 2 weiteren Proben konnte der Rezeptor nur vereinzelt und in den anderen beiden Gewebeproben gar nicht nachgewiesen werden.

Die Negativkontrollen waren, bis auf die Kerndarstellung mit DAPI, weitestgehend signalfrei, bei vereinzelt minimaler, unspezifischer Hintergrundfluoreszenz (C).

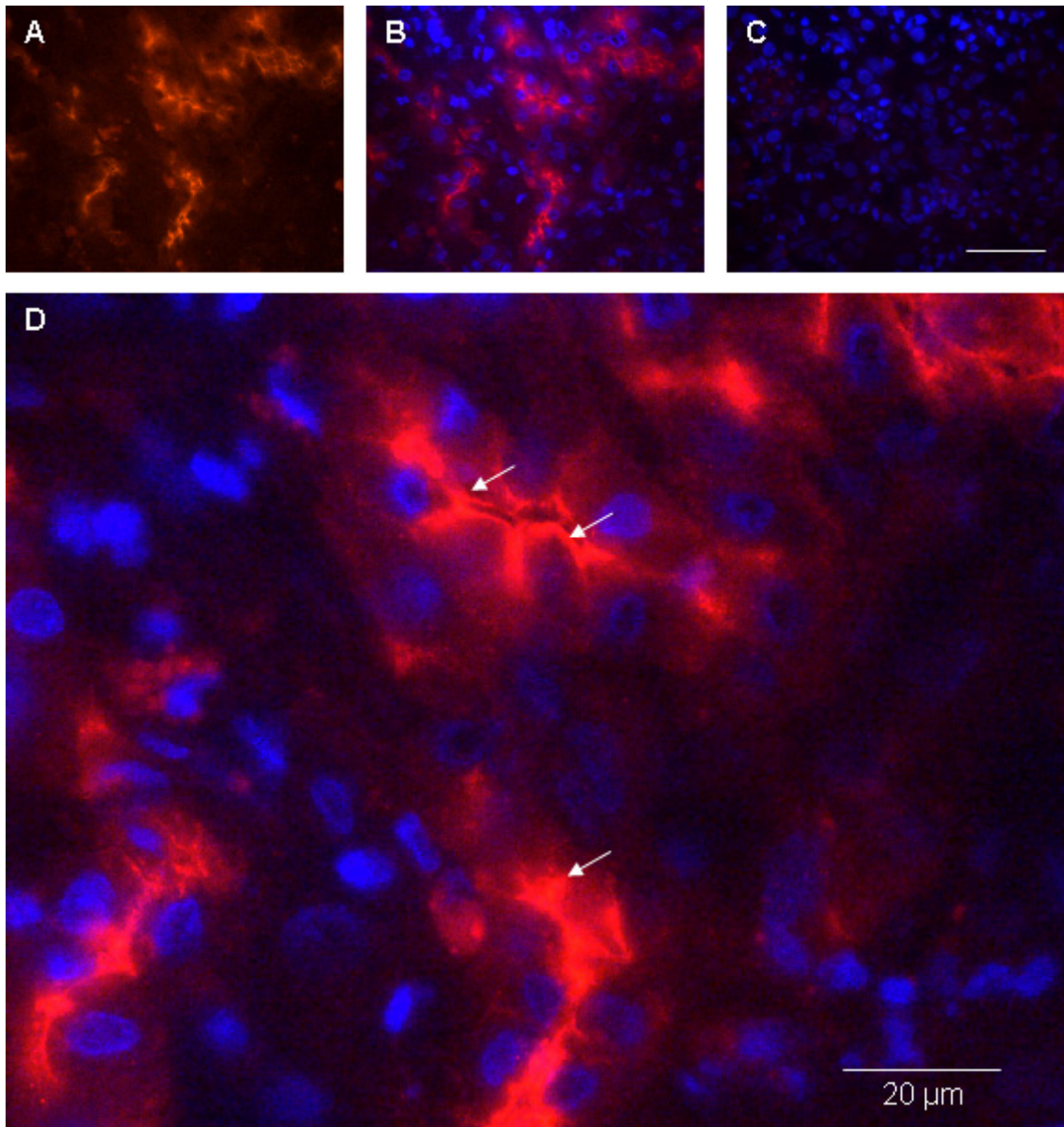


Abbildung 10:

**Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors im hepatozellulären Karzinom (HCC, Fall 0017) mittels indirekter Immunfluoreszenz.**

Intermittierende CAR-Signale (rot, Cy3) sind im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Pfeile) von Tumorzellsträngen des Karzinoms zu sehen.

A: Cy3-Kanal (CAR), B: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), C: Negativkontrolle. Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm. D: Cy3-Kanal (CAR) und DAPI-Kanal (Zellkerne). Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-human CAR [hCAR]), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).

### 3. Analyse der CAR-Expression in Lebermetastasen Kolorektaler Karzinome

Sämtliche analysierten Kryoschnitte von Gewebeproben der hepatischen Metastasen kolorektaler Karzinome (n=13) zeigten eine starke CAR-Expression in der Immunfluoreszenz.

Im gesamten Tumorbereich ließ sich in regelhafter Art und Weise der CAR-Rezeptor darstellen.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch den Fall Nummer 0124.

Signale des CAR-Rezeptors sind hier besonders intensiv an den Zellmembranen, im Bereich der Interzellularkontakte nachzuweisen (D, Pfeile), was wiederum seiner beschriebenen physiologischen Lokalisation in *tight junctions* von Normalgewebe (zum Beispiel in Alveolarepithelzellen) entspricht.

Ergänzend hierzu ist der CAR-Rezeptor in den drüsenartig imponierenden Tumoranteilen auch am apikalen Zellpol darstellbar (D, Pfeilspitzen).

Die Negativkontrollen zeigen lediglich die Zellkerne im DAPI-Kanal (C), bei vereinzelt minimaler Hintergrundfluoreszenz.

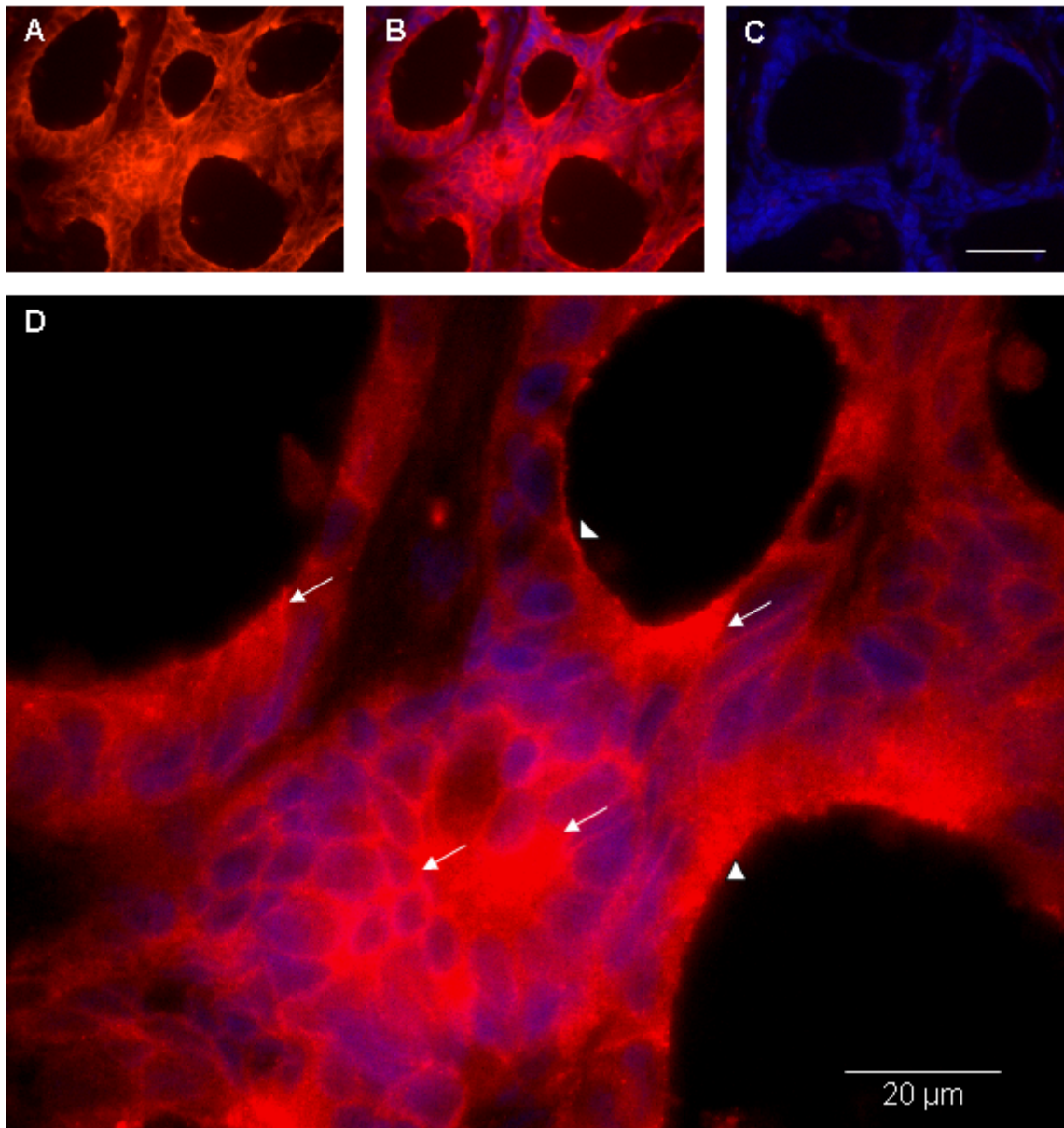


Abbildung 11:

**Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors in der Lebermetastase eines kolorektalen Karzinoms (Fall 0124) mittels indirekter Immunfluoreszenz.**

Intensive CAR-Signale (rot, Cy3) sind im Bereich der Interzellularkontakte (Pfeile), sowie im apikalen Bereich (Pfeilspitzen) der Tumorzellen des Karzinoms zu sehen.

A: Cy3-Kanal (CAR), B: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), C: Negativkontrolle. Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm. D: Cy3-Kanal (CAR) und DAPI-Kanal (Zellkerne). Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-human CAR [hCAR]), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).

#### **IV. Kolokalisation von CAR und ZO-1**

Der Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor wurde in der Zelllinie HuH-7, einem cholangiozellulären Karzinom und in Normalgewebe mit dem *tight junction* Marker ZO-1, in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung, kolokalisiert.

Die Kryoschnitte wurden in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung 30 Minuten lang fixiert und dann dem Kolokalisationsfärbeprotokoll für Kryoschnitte unterzogen, wie unter Abschnitt C beschrieben.

Die HuH-7 Zellen wurden auf Deckgläschen gezüchtet und nach Fixierung in Paraformaldehyd gefärbt. Die Kolokalisation der CAR und ZO-1 Signale erfolgte dann an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510 meta (Fa. Carl Zeiss).

Die Resultate sind nachstehend aufgeführt.

##### **1. Analyse der Zelllinie HuH-7**

In der konfokalen Aufnahme lassen sich CAR und ZO-1 in bestimmten Arealen von konfluenten HuH-7 Zellen kolokalisieren.

Abbildung 12 zeigt eine Laserabtastung derselben optischen Ebene (optische Schichtdicke  $< 0,7 \mu\text{m}$ , Pinhole 1 Airy Unit), aufgeteilt nach CAR-Signalen (A, Cy3), DNA-Fluoreszenz in den Kernen (B, DAPI), ZO-1-Signalen (C, AlexaFluor-488) und schließlich die Projektion aller erfassten Muster (D).

Die gelben Areale in der Projektion (D, Pfeile) zeigen Areale, in denen CAR und ZO-1 sich in engster Proximität befinden. Hier, im Bereich der *tight junctions*, kolokalisieren die beiden Moleküle.

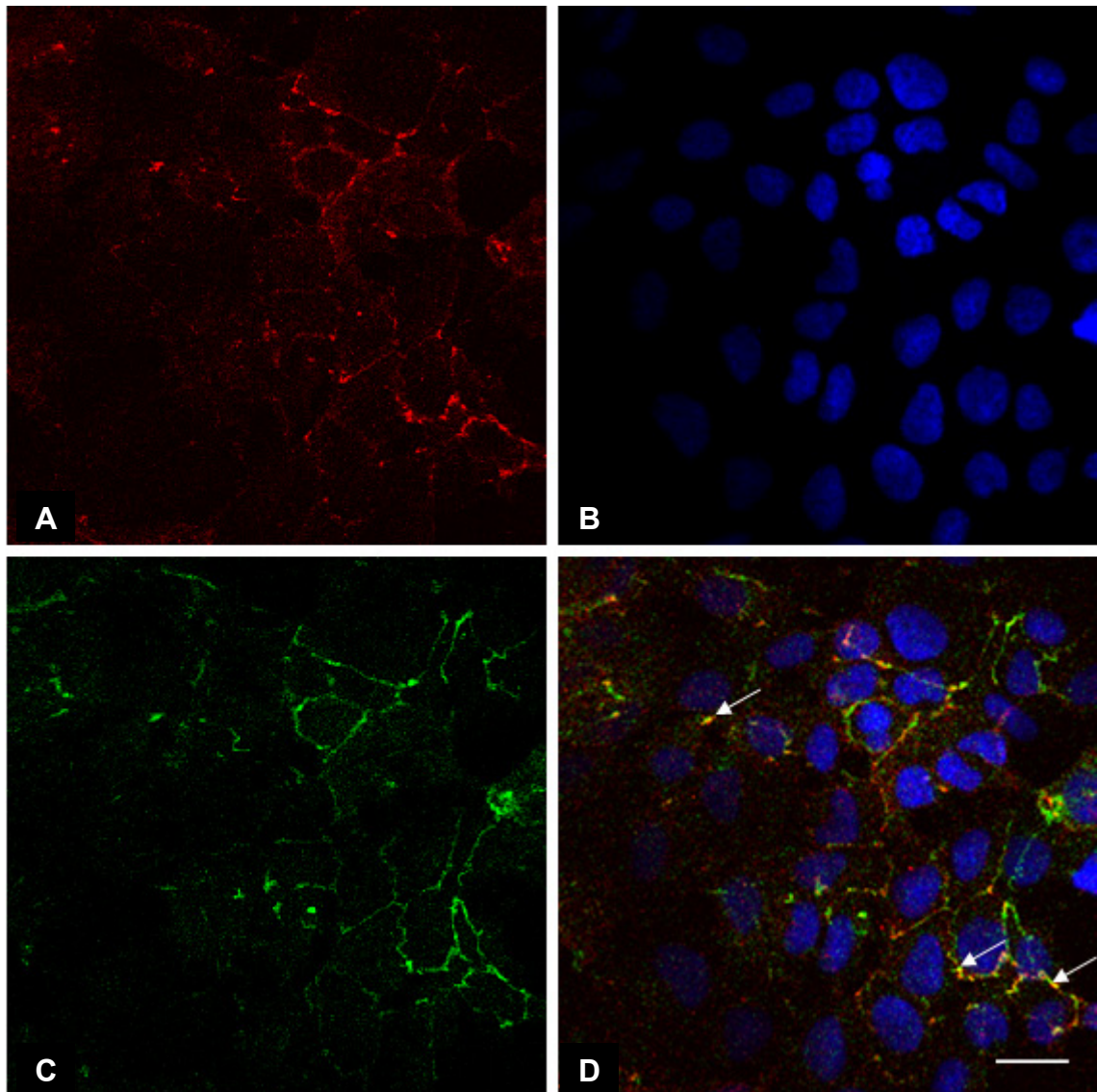


Abbildung 12:

**Kolokalisation von CAR und dem *tight junction* Marker ZO-1 in HuH-7 Zellen.** CAR und ZO-1 kolokalisieren in HuH-7 Zellen in spezifischen Arealen, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Pfeile, gelbe Signale).

Konfokale Aufnahme mit dem Zeiss LSM 510 meta Mikroskop. A: Cy3-Kanal (CAR, rot), B: DAPI-Kanal (Zellkerne, blau), C: AlexaFluor-488-Kanal (ZO-1, grün), D: Alle Kanäle in der Projektion. Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Präparat: HuH-7 Zellen auf Coverslips, Primärantikörper: Monoklonaler Maus anti-hCAR Antikörper RmcB, Monoklonaler Hase anti-ZO-1 Antikörper, Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Esel anti-Hase, AlexaFluor-488-markiert, Kernfärbung: DAPI.

## 2. Analyse an Kryoschnitten eines CCC

Die vorliegende konfokale Aufnahme zeigt, dass sich CAR und ZO-1 in begrenzten Anteilen des Tumorgewebes kolokalisieren lassen.

Abbildung 13 zeigt eine Laserabtastung derselben optischen Ebene eines CCCs (Fall 0005, optische Schichtdicke  $< 0,7 \mu\text{m}$ , Pinhole 1 Airy Unit), aufgeteilt nach CAR-Signalen (A, Cy3), DNA-Fluoreszenz in den Kernen (B, DAPI), ZO-1-Signalen (C, AlexaFluor-488) und schließlich die Projektion aller erfassten Muster (D).

Die gelben Areale in der Projektion (D, Pfeile) zeigen Areale, in denen CAR und ZO-1 im Bereich der *tight junctions* kolokalisieren.



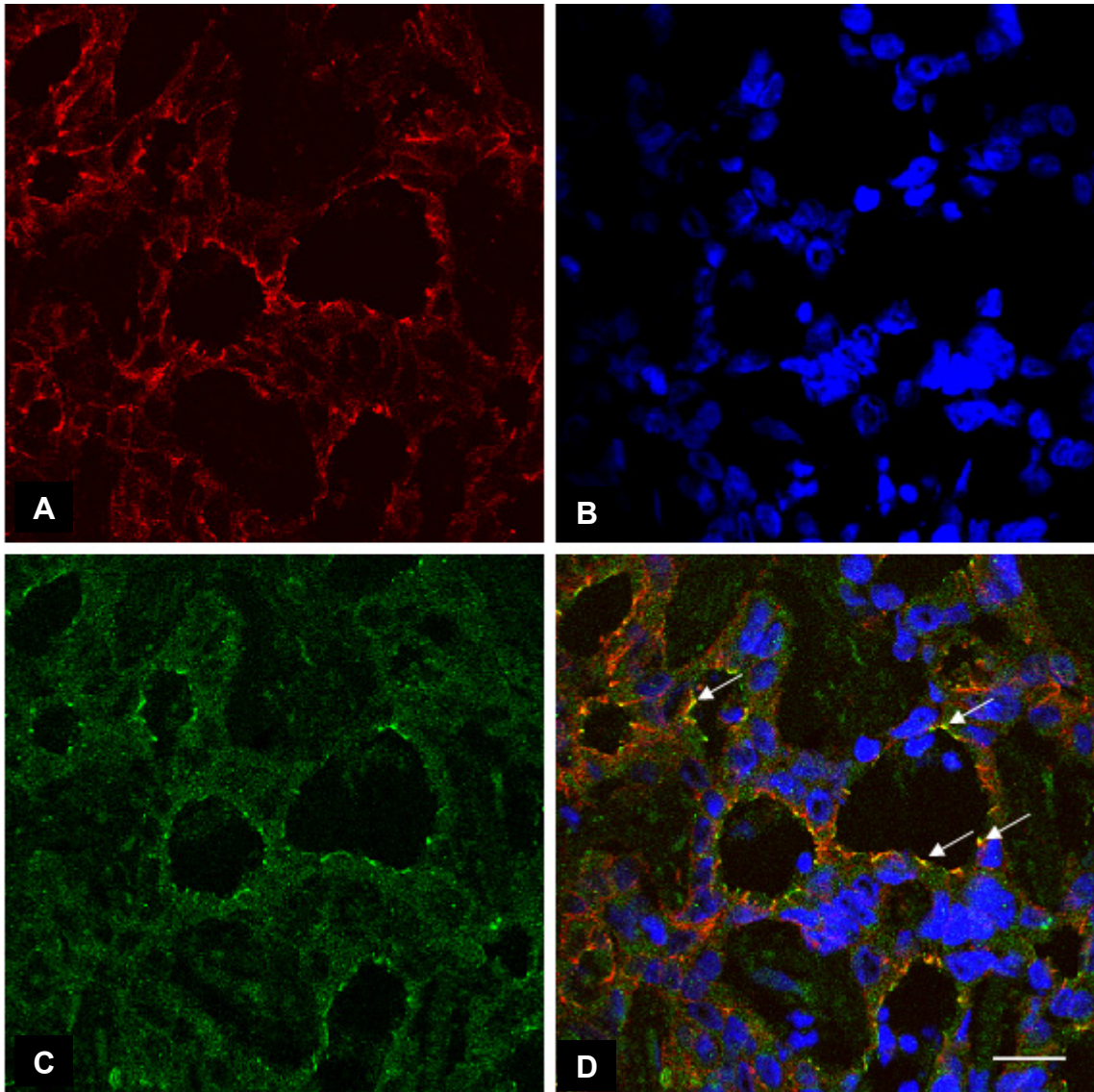


Abbildung 13:

**Kolokalisation von CAR und dem *tight junction* Marker ZO-1 im CCC (Fall 0005).**

CAR und ZO-1 kolokalisieren im CCC in spezifischen Arealen, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (D, Pfeile, gelbe Signale).

Konfokale Aufnahme mit dem Zeiss LSM 510 meta Mikroskop. A: Cy3-Kanal (CAR, rot), B: DAPI-Kanal (Zellkerne, blau), C: AlexaFluor-488-Kanal (ZO-1, grün), D: Alle Kanäle in der Projektion. Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Maus anti-hCAR Antikörper RmcB, Monoklonaler Hase anti-ZO-1 Antikörper, Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Esel anti-Hase, AlexaFluor-488-markiert, Kernfärbung: DAPI.

### 3. Analyse eines normalen Gallenganges

Um Vergleiche mit der Situation im Normalbefund ziehen zu können, wurde die doppelte Immunlokalisation an einem Kryoschnitt von normalem, tumorfreiem Lebergewebe durchgeführt.

Die vorliegende konfokale Aufnahme zeigt, dass sich CAR und ZO-1 in bestimmten Gebieten eines regelrechten Gallenganges kolokalisieren lassen.

Abbildung 14 zeigt eine Laserabtastung derselben optischen Ebene einer Gewebeprobe (Fall 2907, optische Schichtdicke < 0,7  $\mu\text{m}$ , Pinhole 1 Airy Unit), aufgeteilt nach CAR-Signalen (A, Cy3), DNA-Fluoreszenz in den Kernen (B, DAPI), ZO-1-Signalen (C, AlexaFluor-488) und schließlich die Projektion aller erfassten Muster (D).

Die gelben Areale in der Projektion (D, Pfeile) zeigen Areale, in denen CAR und ZO-1 im Bereich der *tight junctions* kolokalisieren.

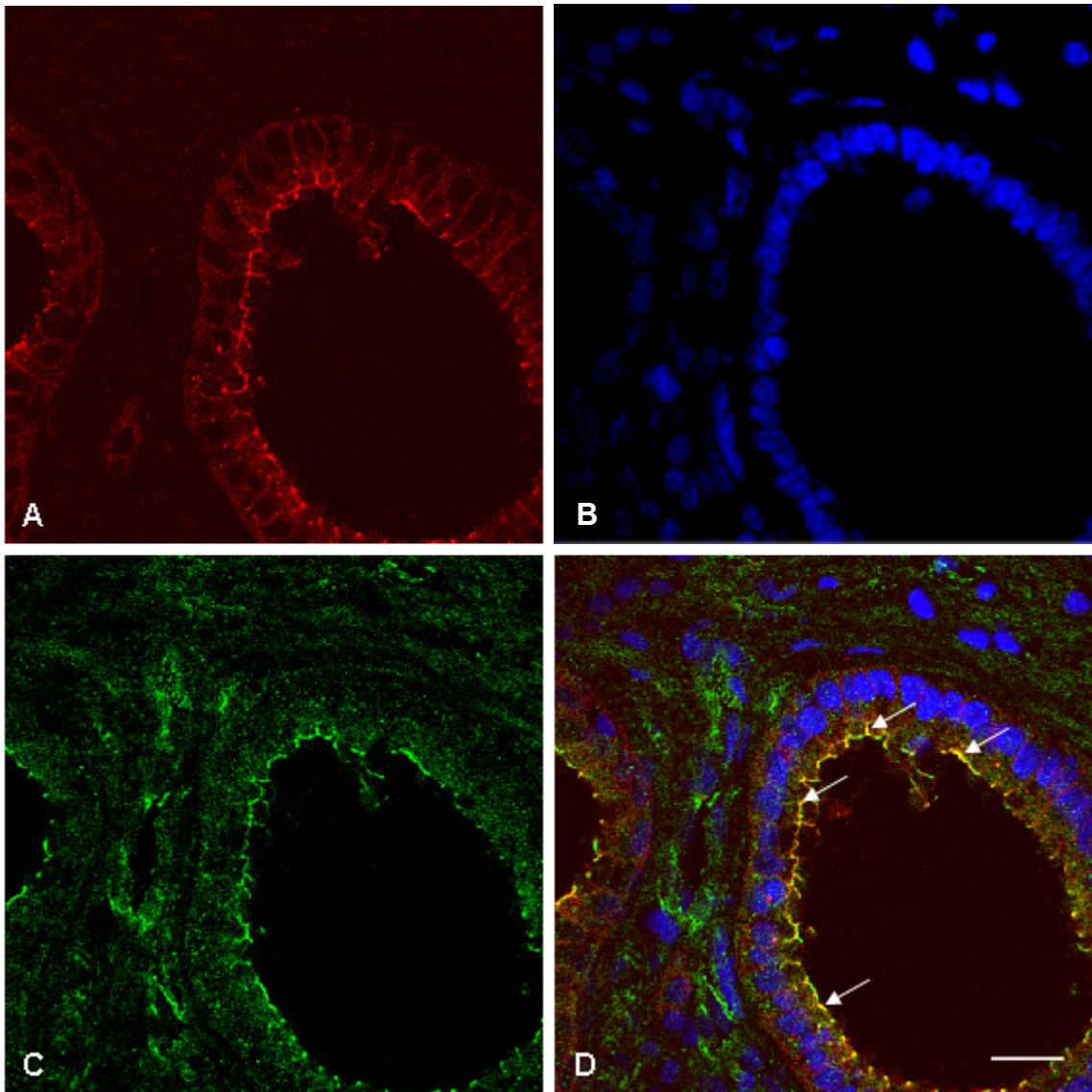


Abbildung 14:

**Kolokalisation von CAR und dem *tight junction* Marker ZO-1 im Gallengang (Fall 2907, tumorfrei).**

CAR und ZO-1 kolokalisieren in spezifischen Arealen, im Bereich der Zell-Zell-Kontakte, sowie adluminal. (Pfeile, gelbe Signale).

Konfokale Aufnahme mit dem Zeiss LSM 510 meta Mikroskop. A: Cy3-Kanal (CAR, rot), B: DAPI-Kanal (Zellkerne, blau), C: AlexaFluor-488-Kanal (ZO-1, grün), D: Alle Kanäle in der Projektion. Vergrößerung 630X. Die Linie entspricht 20  $\mu$ m.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Maus anti-hCAR Antikörper RmcB, Monoklonaler Hase anti-ZO-1 Antikörper, Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Esel anti-Hase, AlexaFluor-488-markiert, Kernfärbung: DAPI.

## **E. Diskussion**

Krebserkrankungen stellen für Kliniker und Patienten nach wie vor eine immense Herausforderung dar. Die heute eingesetzten pharmazeutischen Therapeutika sind häufig unspezifisch, stellen oftmals eine gravierende Belastung für den Patienten dar und sind, nicht zuletzt, zuweilen ineffektiv. Eine stetig zunehmende Lebenserwartung wird in Zukunft die Problematik der steigenden Inzidenzen maligner Erkrankungen aggravierend. Neuartige innovative Therapieoptionen werden daher in Zukunft eine zentrale Rolle im Kampf gegen den Krebs einnehmen.

Ungleich jeder anderen Krankheit, stellt Krebs für die Betroffenen durch eine besondere Perfidität eine vitale Bedrohung dar. Das Besondere dieser Erkrankung liegt in der Entartung und Proliferation körpereigener Zellen des Patienten. Durch diesen Sachverhalt ist das Wirtsimmunsystem oftmals nicht in der Lage, adäquat die Bedrohung zu erkennen und ihr entgegenzutreten.

Gleichsam sind Klinikern immer wieder Fälle bekannt, bei denen an sich „austherapierte“ und moribunde Patienten spontan genesen. Ursächlich wird hier das plötzliche Erkennen der Tumorzellen, durch die Komponenten des Immunsystems, als „körperfremde“ Invasoren diskutiert.

Adenoviren besitzen viele Eigenschaften, die sie im Kontext der Tumorgentherapie als ideale Vektoren erscheinen lassen. Sie sind relativ einfach und in hohen Titern herzustellen und zeichnen sich durch überlegene Transduktionsraten aus. Weiterhin integriert ihr Genom nicht ins Wirtszellgenom, die Transgenexpression ist temporär und somit steuerbar.

Ziel der immunstimulatorischen adenoviralen Tumorgentherapie, im Kontext dieses Projektes, ist es nun, nach intratumoraler Applikation die Tumorzellen selbst zur Produktion der jeweiligen humanen Zytokine zu stimulieren. So sollen Effektorzellen des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen lokal im Tumor rekrutiert werden, um dann eine globale, Systemweite Immunantwort gegen den Tumor auszulösen.

Vorteil der lokalen Applikation ist die geringere notwendige Dosis und die damit verbundene geringere systemische Toxizität. Vorteil des Induzierens einer globalen Immunantwort ist die Tatsache, dass auf diesem Wege auch Filiae erreicht werden können, solange diese eine ausreichende Remineszenz mit dem Primarius haben.

Der CAR ist der primäre zelluläre Rezeptor für Adenoviren und seine Präsenz im Zielgewebe ist für eine effiziente intratumorale Ausbreitung und Infektion unabdingbar. Dies konnte vielfach *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden (Douglas et al. 2001).

Vor diesem Hintergrund sollte als Vorarbeit für eine mögliche klinische Studie am Menschen ein Verfahren entwickelt werden, das den CAR Status im Zielgewebe beschreiben kann. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen den humanen CAR wurde ein Protokoll an humanen Zelllinien entwickelt, verifiziert und dann für den Einsatz an humanen Gewebeproben aus OP-Material adaptiert und modifiziert.

Das nun vorliegende Protokoll erlaubt es, innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung, etwa im Rahmen einer ERCP oder diagnostischen Laparoskopie bzw. Laparotomie, den CAR Status eines soliden Tumors genau zu erfassen und zu beschreiben. Somit ist ein Verfahren zur Hand, mit dem Patienten vor einem Therapieversuch auf den CAR gescreent werden können.

Als eine Art Biomarker kann der CAR Status nun zur Entscheidungsfindung, den Patienten mit adenoviralen Vektoren zu behandeln oder anderen (palliativen) Therapien zuzuführen, herangezogen werden.

Weiterhin sollten im Rahmen der Arbeit potenzielle Zieltumoren für eine adenovirale Immuntherapie identifiziert werden. So wurden humane Gewebeproben des HCC, CCC und Lebermetastasen kolorektaler Karzinome analysiert.

Während bei den HCC Proben CAR nicht regelhaft, sondern nur vereinzelt nachgewiesen wurde, konnte der CAR in sämtlichen CCC Proben und in allen hepatischen Metastasen kolorektaler Karzinome ausnahmslos dargestellt werden.

Die Befunde in Zellen, wie auch im Tumor- und Normalgewebe, konnten durch die exemplarische Kolo-kalisation mit dem *tight junction* Marker ZO-1 in der konfokalen Mikroskopie abgesichert werden.

Somit konnten das cholangiozelluläre Karzinom und kolorektale Lebermetastasen, in diesem Probenkollektiv, als Zieltumoren bzw. Zielgewebe für adenovirusbasierte Therapien ermittelt werden.

Erwähnenswert ist auch die deutliche Diskrepanz, bezüglich CAR Status und Infizierbarkeit mit Ad-GFP, die zwischen einigen Zelllinien humaner Tumore und dem CAR Status der korrespondierenden Gewebeprobe beobachtet werden konnte. So zeigten die beiden untersuchten Gallengangskarzinomzelllinien EGI-1 und TFK-1 jeweils geringe CAR-Signale und eine schlechte Transfizierbarkeit mit Ad-GFP. Dem gegenüber steht jedoch die regelhafte und reichlich vorhandene CAR Expression in den untersuchten humanen Tumorgeweben des CCC.

Dieses war zunächst unerwartet, überrascht jedoch nicht. So kann man sich gut vorstellen, dass nicht nur während der Isolation von Zellen aus dem Primärgewebe, sondern auch im Rahmen der mitunter jahrelangen Passagierung von Zellkulturen *in vitro*, erhebliche Veränderungen im Vergleich zur Ausgangssituation im Primärtumor stattfinden.

Eine Forschungsgruppe konnte erst kürzlich einen ganz ähnlichen Sachverhalt bei der Analyse und Infektion von kommerziellen Zelllinien, im Vergleich zu frisch isolierten Zellen und Gewebe im Verband nachweisen. Kommerzielle Brustkrebszelllinien hatten einen niedrigeren CAR Status in der RT-PCR und waren schlechter adenoviral transfizierbar, als frisch aus Patientengewebe isolierte Zellen. Am ehesten konnte die reale Situation an 250 µm dicken

Gewebeschnitten abgebildet werden, die *in vitro* in Kultur gehalten wurden und nach adenoviraler Infektion Reportergene herstellen (Stoff-Khalili et al. 2005).

Die beschriebene Methode der Analyse an vitalen Gewebeschnitten ist sicherlich sehr interessant, weil die dreidimensionale Struktur des Tumorgewebes erhalten wird und gerade diese ja für die Ausbildung des CAR entscheidend sein kann (Anders et al. 2003). Dieses Verfahren erlaubt zudem eine funktionelle Analyse des CAR und kann bei besonderen Fragestellungen, etwa bei unklaren oder heterogenen Befunden, wertvolle Informationen liefern.

Es müsste jedoch überprüft werden, ob diese Methode auch bei anderen Tumoren als dem Mammakarzinom anwendbar ist. Außerdem ist sie in der klinischen Routine sicherlich schwer zu etablieren, da die Bearbeitung unmittelbar nach Explantation eines Tumorkerns erfolgen muss.

Weltweit wird in der Humanmedizin eine intensive Forschung an Nagetiermodellen betrieben, allen voran die Maus (*Mus musculus*). Dies hat durchaus seine Berechtigung und bringt viele Vorteile mit sich. So kann auf Versuche am Menschen weitgehend verzichtet werden, Mausmodelle sind gut etabliert und einfach zu standardisieren, die Maus und andere Nager haben eine kurze Generationszeit und können kostengünstig gehalten werden.

Erwähnt sei hier auch die relativ leichte und ethisch vertretbare Manipulation an murinen Embryonen bzw. embryonalen Stammzellen, um so genannte *Knock-out* Mäuse zu generieren und die Bedeutung von Genen und ihren Produkten im Kontext der Entwicklung und Funktion eines Gesamtindividuums zu erfassen.

Auch in unserer Arbeitsgruppe werden Nagetiermodelle verwendet, so konnte an einem HCC Modell der Ratte (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) erfolgreich eine immunologische Krebstherapie mit rekombinanten Adenoviren dokumentiert werden (Waehler et al. 2005).

Bei aller Eignung darf aber nicht übersehen werden, dass nicht selten am Ende aufwendiger Forschungsbemühungen die nüchterne Erkenntnis steht, dass der Mensch kein Nagetier ist.

Ich erwähne dieses Problem, um darauf hinzuweisen, dass eine jede potenzielle Therapieoption, im Kontext der Behandlung von menschlichen Patienten, mit ihrer klinischen Signifikanz steht und fällt.

Entscheidender Maßstab für die Effektivität einer Behandlung muss ihr Abschneiden in einer kontrollierten klinischen Studie, mit harten Endpunkten wie: Zeit bis zur Progression, Überleben und geeigneten Verlaufsparemtern sowie Verträglichkeit (dosislimitierende Toxizität) sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die untersuchten Tumorentitäten, vor allem das CCC, aber auch hepatische kolorektale Metastasen, die Mindestvoraussetzung für eine Tumorgentherapie mit Adenoviren erfüllen.

In allen untersuchten Proben der beiden genannten Untergruppen war der CAR Rezeptor im Tumor vorhanden.

Vor allem das CCC sticht in der getroffenen Auswahl hervor. Hier kann der deutlichen Mehrzahl der Patienten schon bei der Erstdiagnose nicht mehr mit einer Heilungsabsicht begegnet werden, oft kommen lediglich Verfahren mit palliativem Charakter zur Anwendung.

Während für Patienten mit HCC oder kolorektalen Lebermetastasen multimodale Behandlungsoptionen vorhanden sind, sind Patienten mit einem fortgeschrittenen CCC in aller Regel mit einer infausten Prognose konfrontiert.

Wenn auch für die beiden erstgenannten Neoplasmen eine Tumorgentherapie mit Adenoviren wohl nie eine *First-Line* Therapie darstellen wird, so ist dies beim fortgeschrittenen CCC durchaus vorstellbar.



Weiterhin wäre eine klinische Pilotstudie der Phase I oder II an CCC Patienten auch ethisch durchaus vertretbar, denn die Prognose ist in der Regel derart schlecht und die zur Verfügung stehenden Methoden so limitiert, dass man bei faktisch nicht mehr kurativ zu behandelnden CCC-Patienten durchaus einen Therapieversuch mit adenoviralen Vektoren erwägen kann.

Auch für dieses klinische Setting hat die vorliegende Arbeit Vorarbeiten geleistet. Das entwickelte Färbeprotokoll erlaubt es, bei jedem einzelnen Patienten innerhalb von 24 Stunden den CAR Status im Tumorgewebe zu erheben. Die Patienten würden prä-interventionell auf den CAR gescreent und, bei Vorhandensein, auf die entsprechenden Patientengruppen und Therapiemodalitäten randomisiert werden.

Dem Nachweis von CAR im Zielgewebe käme hierbei die Funktion eines verifizierbaren Biomarkers zu. Diese Möglichkeit relativiert auch in gewisser Weise die verhältnismäßig geringe Stichprobenzahl der CCC Gewebeproben, denn der CAR Status eines Primärtumors würde in jedem einzelnen Fall vor einer Behandlung mit rekombinanten Adenoviren erfasst werden.

Die Ergebnisse dieser vorgelegten Arbeit bilden nun die Grundlage für eine weitere statistische Absicherung, in einer retrospektiven Studie, an asservierten Gewebeproben. Das Hauptproblem hierbei wäre, dass die Reaktion des RmcB-Antikörpers auf den gängigen Paraffinschnitten ohne Aussagekraft ist. Diesem Hindernis könnte durch die Etablierung paraffingängiger Antikörper gegen den CAR begegnet werden.

Eine spanische Arbeitsgruppe um Sangro und Prieto hat 2004 die Ergebnisse einer Pilotstudie am Menschen, unter Verwendung eines Interleukin-12 kodierenden Adenovirus, veröffentlicht. Der verwendete Virusvektor entspricht vom Typ her dem von uns benutzten Vektorsystem.

Bei der überwiegend ultraschallgesteuerten intratumoralen Applikation an Patienten mit weit fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren (vor allem HCC, kolorektales Karzinom und Pancreas-CA), traten selbst bei extrem hohen

Virusdosen von  $3 \times 10^{12}$  Viruspartikeln keine schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen auf, eine dosislimitierende Toxizität wurde nicht erreicht. Die antitumoralen Effekte waren insgesamt mäßig ausgeprägt, 29 Prozent der Patienten erfuhren aber wenigstens keine Tumorprogression.

Unglücklicherweise verstarb der einzige CCC Patient vor dem *Follow-Up* an einer ausgeprägten, vorbestehenden Peritonealkarzinose, zuvor waren seine Serumentumormarker jedoch dramatisch rückläufig.

Als ein mögliches Problem wurde von den Autoren ein eventueller Mangel an immunologischen Effektorzellen nach vorangegangenen Chemotherapien, sowie der schlechte Ausgangsstatus der Patienten insgesamt, erachtet (Sangro et al. 2004).

In einer solchen Situation würde die vorherige Abklärung des CAR Status, mit dem hier beschriebenen Protokoll, sicherlich einen entscheidenden Vorteil erbringen.

Bezüglich einer möglichen eingeschränkten immunologischen Kompetenz könnte ich mir in diesem Zusammenhang eine „prä-Konditionierung“ einer Sub- oder Kontrollgruppe von Patienten, mit etwa G-CSF oder GM-CSF (beispielsweise Pegfilgrastim bzw. Molgramostim), vorstellen.

Denkbar wäre auch die Verwendung von, schon aus Impfstoffen bekannten, Adjuvantien, wie etwa Aluminiumhydroxid, um eine unspezifische lokale Immunreaktion zu triggern.

Weiterhin verfügt unsere Arbeitsgruppe über gute Erfahrungen mit der MRT-basierten Darstellung von Tumoren, sowie dem therapeutischen Effekt an ihnen, sollte er denn auftreten.

Hier würde es sich anbieten, die adenoviralen Vektoren MRT-gesteuert zu applizieren. Der Viruslösung könnte man ein geeignetes Kontrastmittel, etwa

Gadolinium, hinzufügen, um so unter der Applikation die Verteilung der Viruslösung im Zielgebiet und gegebenenfalls darüber hinaus zu erfassen.

Es wäre lediglich im Voraus abzuklären, ob Gadoliniumhaltige Kontrastmittel 1. nicht die Transduktionseffizienz des Virusvektors herabsetzen und 2. ob die Transgenexpression unbeeinflusst bleibt. Beides ist relativ einfach und ohne großen Zeitaufwand zu bewerkstelligen.

Insgesamt sind also durchweg gute Rahmenbedingungen gegeben. Die Tumorgentherapie hat durchaus das Potenzial, in der Hand des Arztes ein wirksames Werkzeug bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen darzustellen.

Es verbleibt mir zu hoffen, dass die Bemühungen im Rahmen dieser Untersuchungen nicht allein dem akademischen Interesse gedient haben, sondern dass sie tatsächlich Einfluss in die Klinik finden können und so eventuell Patienten zu Gute kommen, für die ansonsten keine Hoffnung mehr besteht.

## **F. Zusammenfassung**

Diese Promotionsarbeit beschreibt die Entwicklung und Etablierung eines Protokolls zur Darstellung des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors, mittels einer indirekten Immunlokalisation, an Zellen und primären humanen Geweben.

Das vorliegende Protokoll erlaubt es, den CAR Status eines Primärtumors oder seiner Metastasen, innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung zu erfassen und zu beschreiben.

Im Rahmen eines Screeningverfahrens können aus einem Patientenpool nun die in Frage kommenden Kandidaten für eine adenovirale Tumorgentherapie ermittelt werden.

Weiterhin wurden drei leberständige solide Tumoren auf ihre CAR Expression hin analysiert, um hierdurch potenzielle Zieltumoren für eine adenovirusbasierte immunologische Krebstherapie zu identifizieren.

Während beim HCC das Bild sehr heterogen war, konnten das cholangiozelluläre Karzinom, sowie Lebermetastasen kolorektaler Karzinome, als vom CAR Status her geeignete Kandidaten für die adenovirale Genthherapie ausgemacht werden.

Die ermittelten Tumorentitäten, vor allem das CCC, sollten nun in einer klinischen Pilotstudie auf ihre Therapierbarkeit mit adenoviralen Vektoren hin untersucht werden.

## **G. Literaturverzeichnis**

Ameis D (2000) Ansätze zur Genterapie des hepatozellulären Karzinoms. Internist (Berl) 41(2 Pt 2): 208-212.

Anders M, Hansen R, Ding RX, Rauen KA, Bissell MJ, Korn WM (2003) Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 100(4): 1943-1948.

Angulo P, Lindor KD (1999) Primary sclerosing cholangitis. Hepatology 30(1): 325-332.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275 (5304): 1320-1323.

Berthiaume EP, Wands J (2004) The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. Semin Liver Dis 24(2): 127-137.

Bismuth H, Nakache R, Diamond T (1992) Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. Ann Surg 215(1): 31-38.

Bosch FX, Ribes J, Borrás J (1999) Epidemiology of primary liver cancer. Semin Liver Dis 19(3): 271-285.

Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B (1992) The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. Virology 186(1): 280-285.

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. Proc Natl Acad Sci U S A 98(26): 15191-15196.

Curiel DT (2000) The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 6(9): 3395-3399.

De Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM (1999) Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 341(18): 1368-1378.

Dietrich CG, Geier A, Tacke J, Garton C, Matern S (2003) Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Dtsch Arztebl* 100(12): 772-782.

Douglas JT, Kim M, Sumerel LA, Carey DE, Curiel DT (2001) Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors. *Cancer Res* 61(3): 813-817.

El-Serag HB, Mason AC (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 340(10): 745-750.

Gores G (2003). Cholangiocarcinoma: Current concepts and insights. *Hepatology* 37(5): 961-969.

Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75(3): 477-486.

Hallek M, Buening H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendtner CM (2001) Grundlagen der Gentherapie. Prinzipien und Stand der Entwicklung. *Internist (Berl)* 42(10): 1306-1308, 1311-1313.

Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, Phipps S, Chiang YL (1999) A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 10(10): 1721-1733.

Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA (2006) The Spemann organizer gene, Gooseoid, promotes tumor metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(50): 18969-18974.

Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I, Dummer R (1998) The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. Hum Gene Ther 9(16): 2363-2373.

Hemminki A, Kanerva A, Liu B, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT (2003) Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression. Cancer Res 63(4): 847-853.

Hirner und Weise (2004) Chirurgie Schnitt für Schnitt. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD (2005) Cholangiocarcinoma. Lancet 366(9493): 1303-1314.

Klatskin G (1965) Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. Am J Med 38: 241-256.

Kohne CH, van Cutsem E, Wils J, Bokemeyer C, El-Serafi M, Lutz MP, Lorenz M, Reichardt P, Ruckle-Lanz H, Frickhofen N, Fuchs R, Mergenthaler HG, Langenbuch T, Vanhoefer U, Rougier P, Voigtman R, Muller L, Genicot B, Anak O, Nordlinger B: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group (2005) Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. J Clin Oncol 23(22): 4856-4865.

Martin LA, Vile R, Lemoine NR, Sikora K, Pandha HS (1997) Genetic prodrug activation therapy. *Lancet* 350(9094): 1793-1794.

Modrow S und Falke F (1997) Adenoviren. *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.: 391-411.

Moradpour D, Allgaier H-P, Linhart HG, Blum HE (2002) *Hepatozelluläres Karzinom*. Berlin, Springer-Verlag.

Oechsle K, Koops A, Hillert C, Schuch G, Rogiers X, Bokemeyer C (2007) Aktuelle interdisziplinäre Therapiekonzepte bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. *Hamburger Ärzteblatt* 02/2007: 72-73.

Ohwada A, Hirschowitz EA, Crystal RG (1996) Regional delivery of an adenovirus vector containing the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum Gene Ther* 7(13): 1567-1576.

Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K (1985) Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56(4): 918-928.

Olnes MJ, Erlich R (2004) A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology* 66(3): 167-179.

Patel T (2001) Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 33(6): 1353-1357.

Penna C, Nordlinger B (2002) Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am* 82(5): 1075-1090, x-xi.

Ries S, Korn WM (2002) ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer* 86(1): 5-11.



Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84(3): 570-573.

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

Rux JJ, Burnett RM (2004) Adenovirus structure. *Hum Gene Ther* 15(12): 1167-1176.

Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olague C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J (2004) Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 22(8): 1389-1397.

Schiedner G, Hertel S, Kochanek S (2000) Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther* 11(15): 2105-2116.

Shaib Y, El-Serag HB (2004) The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 24(2): 115-125.

Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB (2004) Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol* 40(3): 472-477.

Sirica AE (2005) Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 41(1): 5-15.

Sompayrac L (2002) *How Pathogenic Viruses Work*. Boston, Toronto, London, Singapore, Jones and Bartlett Publishers.

Stoff-Khalili MA, Stoff A, Rivera AA, Mathis JM, Everts M, Wang M, Kawakami Y, Waehler R, Mathews QL, Yamamoto M, Rocconi RP, Siegal GP, Richter DF, Dall P, Zhu ZB, Curiel DT (2005) Gene transfer to carcinoma of the breast with fiber-modified adenoviral vectors in a tissue slice model system. *Cancer Biol Ther* 4(11): 1203-1210.

Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS (1996) The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 70(4): 2296-22306.

Valnes K, Brandtzaeg P (1985) Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J Histochem Cytochem* 33(8): 755-761.

Volpers C, Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S164-171.

Waehler R, Ittrich H, Mueller L, Krupski G, Ameis D, Schnieders F (2005) Low-dose adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12. *Hum Gene Ther* 16(3): 307-317.

Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, Zabner J (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem* 274(15): 10219-10226.

Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110(6): 789-799.

Wood R, Brewster DH, Fraser LA, Brown H, Hayes PC, Garden OJ (2003) Do increases in mortality from intrahepatic cholangiocarcinoma reflect a genuine increase in risk? Insights from cancer registry data in Scotland. *Eur J Cancer* 39(14): 2087-2092.

## **H. Anhang**

### **I. Komplette Aufnahmeserien der Karzinome**

Auf den folgenden Seiten sind die vollständigen Aufnahmeserien der untersuchten Gewebeprobe des CCC, HCC und kolorektaler Lebermetastasen, in einer Übersicht aufgeführt.

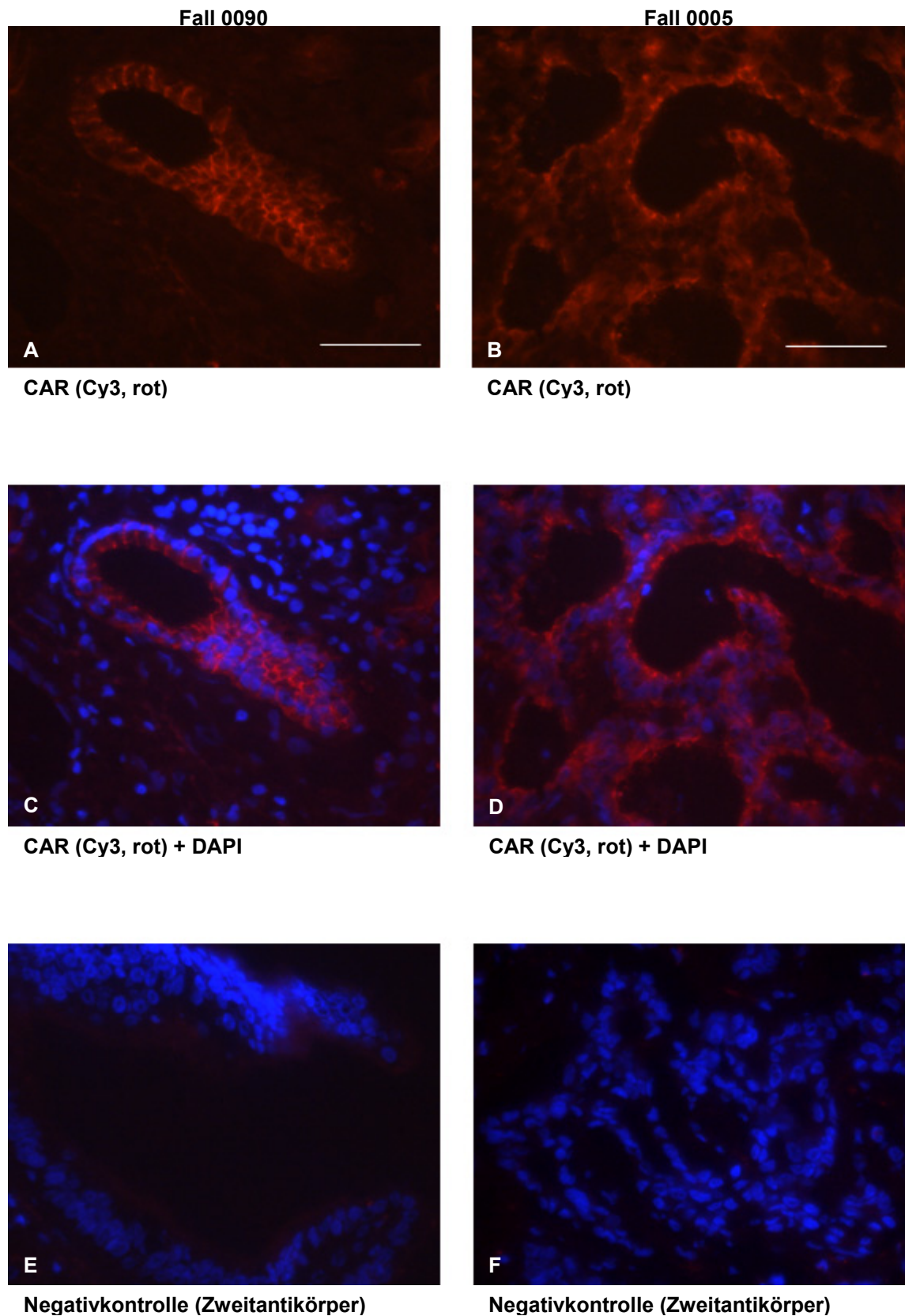


Abbildung 15:

**Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 0090 und 0005.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

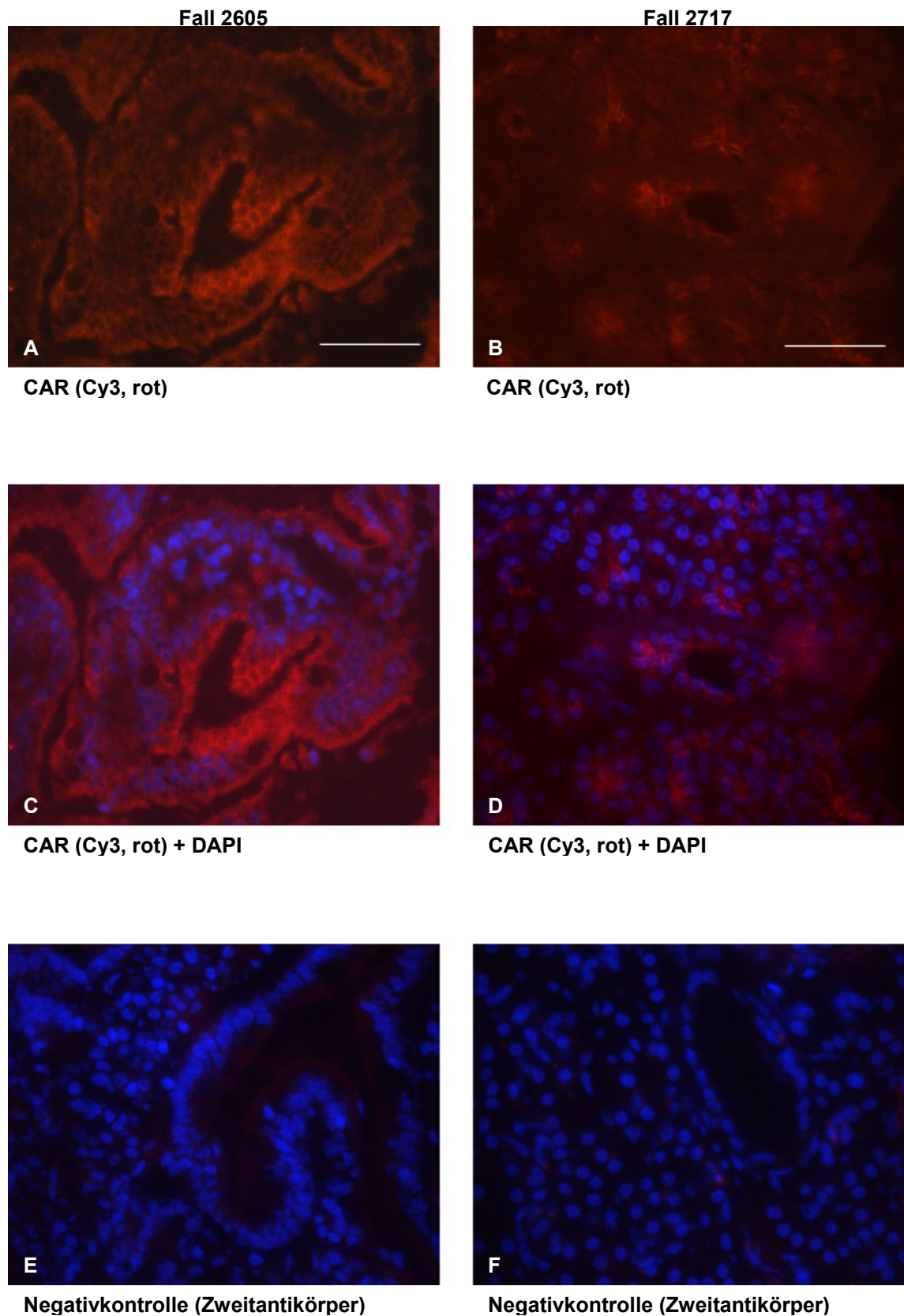


Abbildung 16:

**Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 2605 und 2717.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

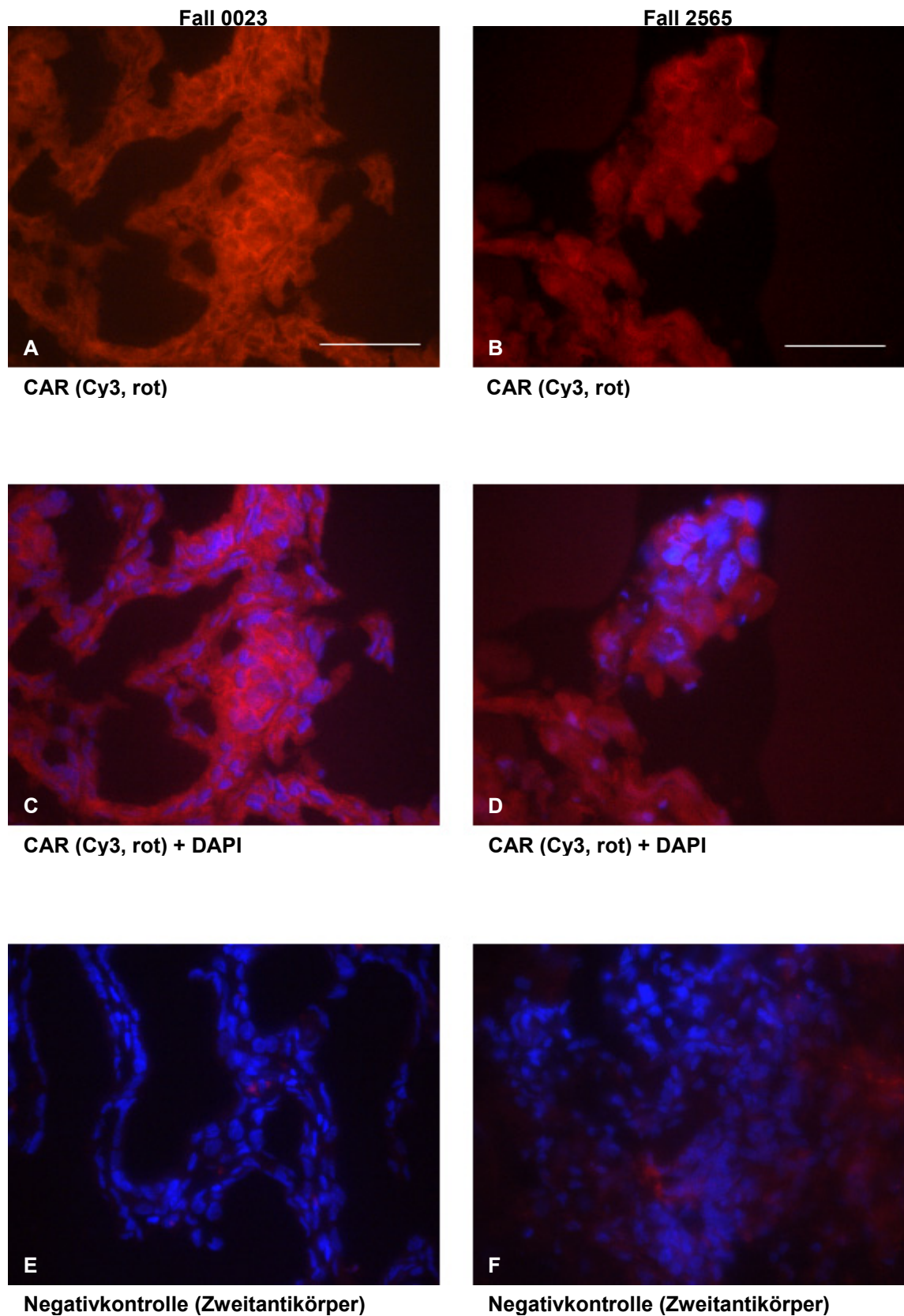


Abbildung 17:

**Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 0023 und 2565.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

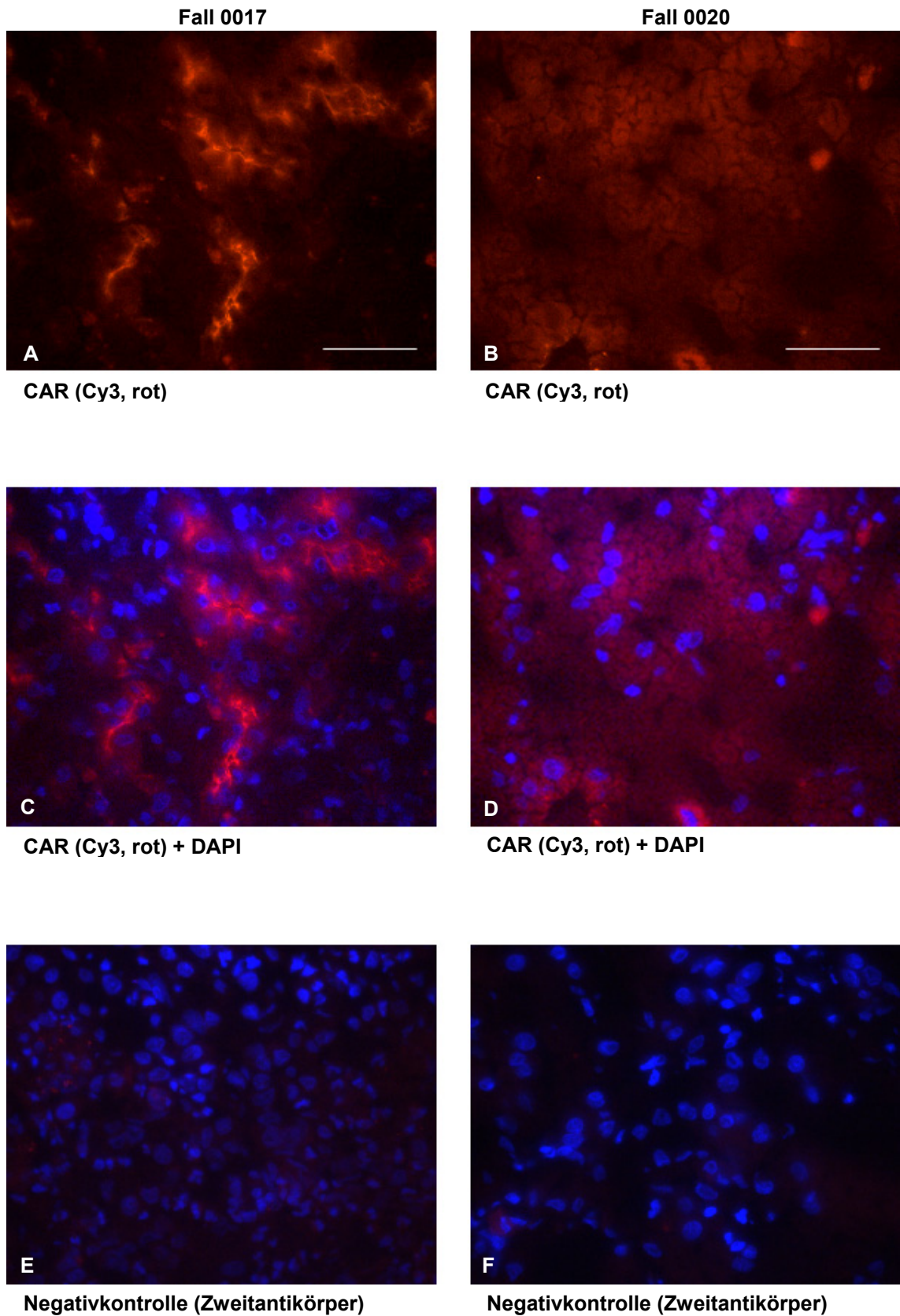


Abbildung 18:

**Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0017 und 0020.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

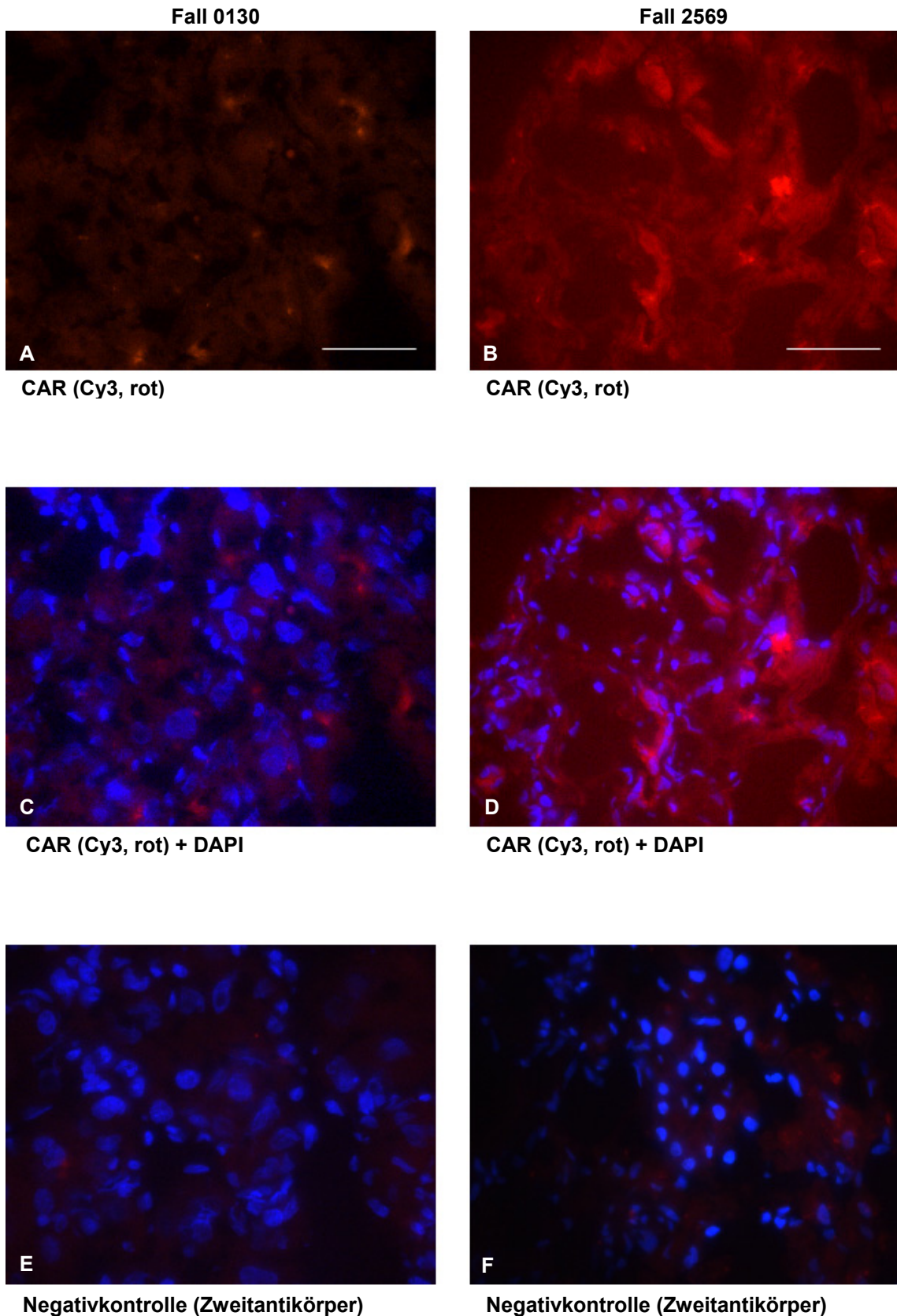


Abbildung 19:

**Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0130 und 2569.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.



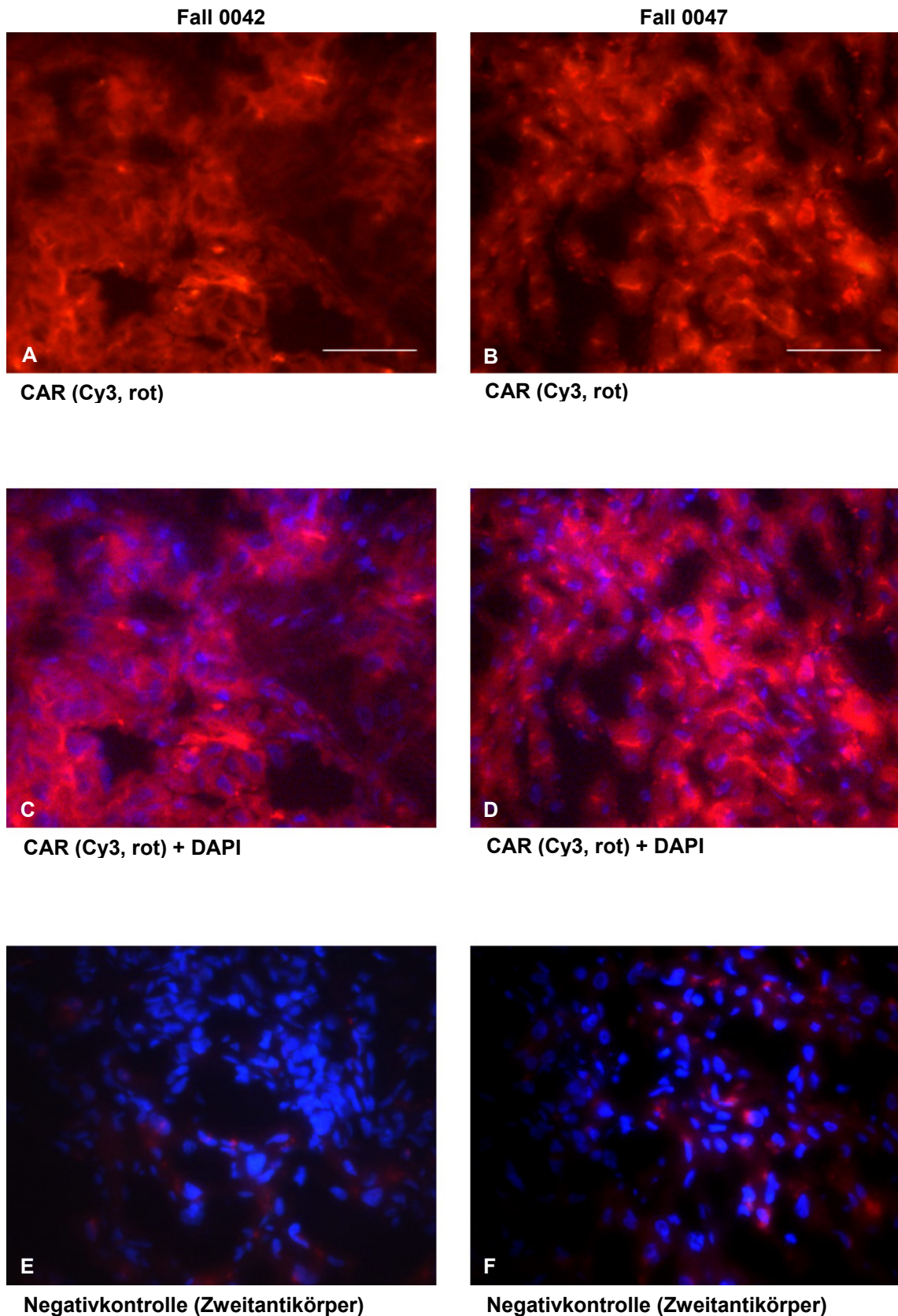


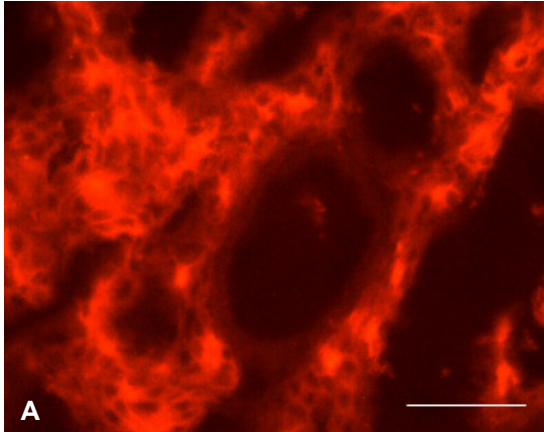
Abbildung 20:

**Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0042 und 0047.**

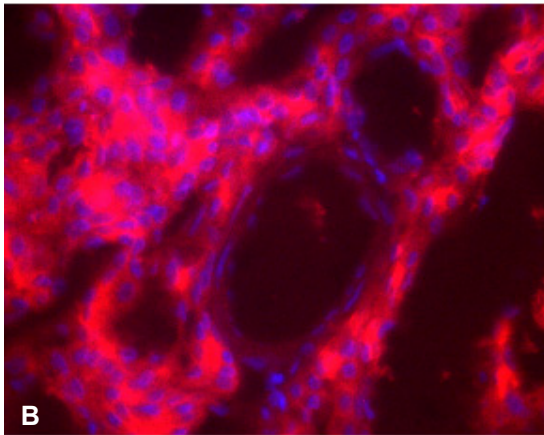
A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

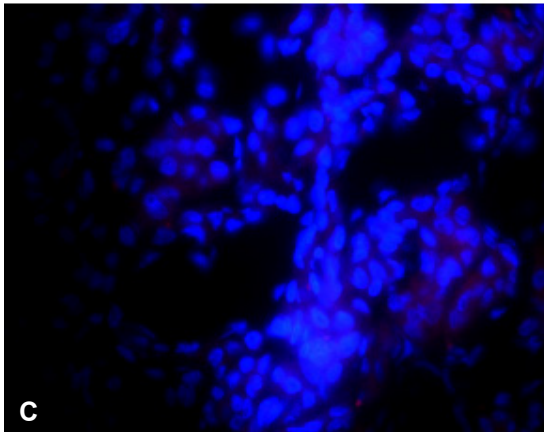
Fall 0061



**A**  
CAR (Cy3, rot)



**B**  
CAR (Cy3, rot) + DAPI



**C**  
Negativkontrolle (Zweitantikörper)

---

Abbildung 21:

**Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0061.**

A : Cy3-Kanal (CAR), B: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), C: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper Rmcb (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

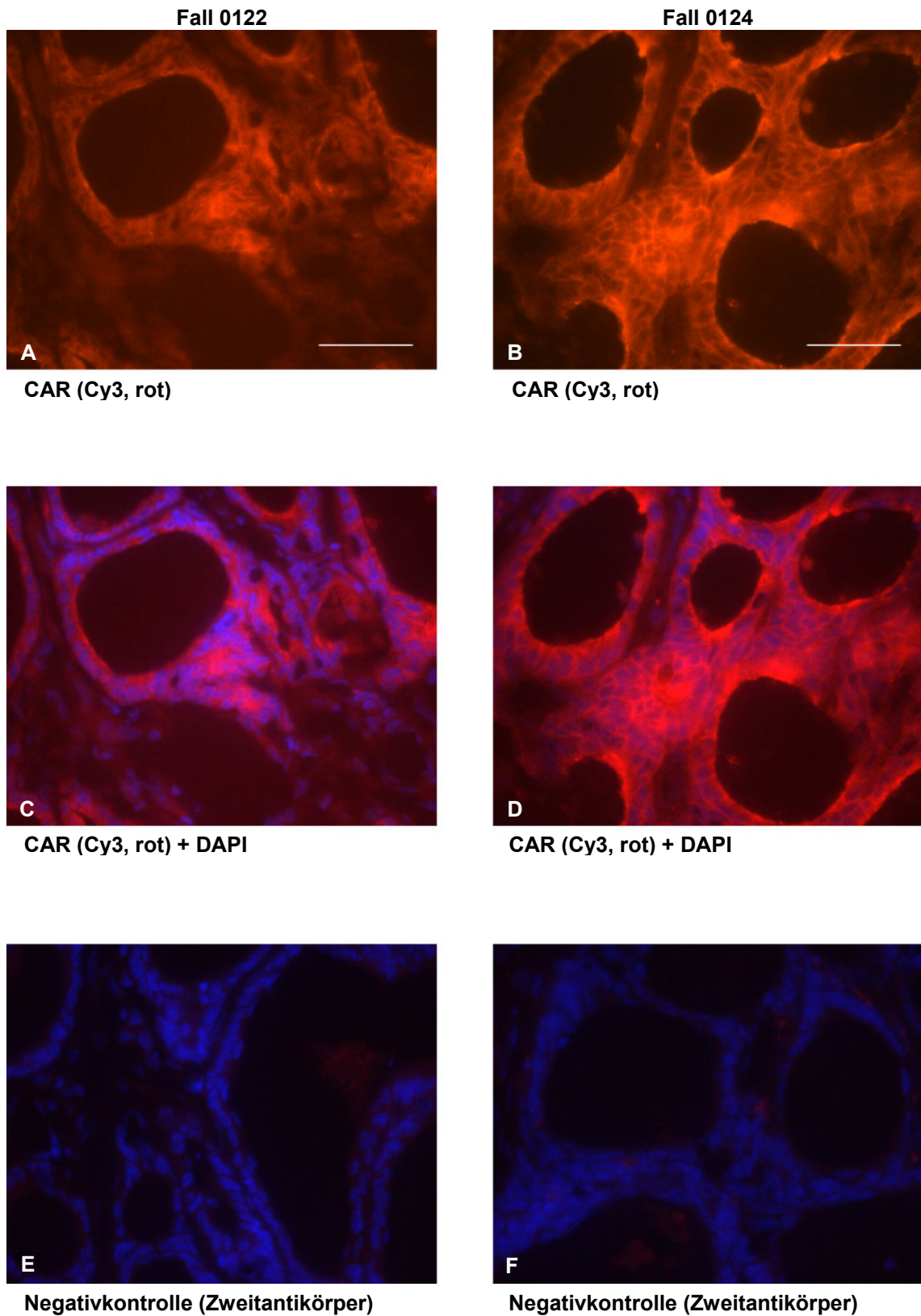


Abbildung 22:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0122 und 0124.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

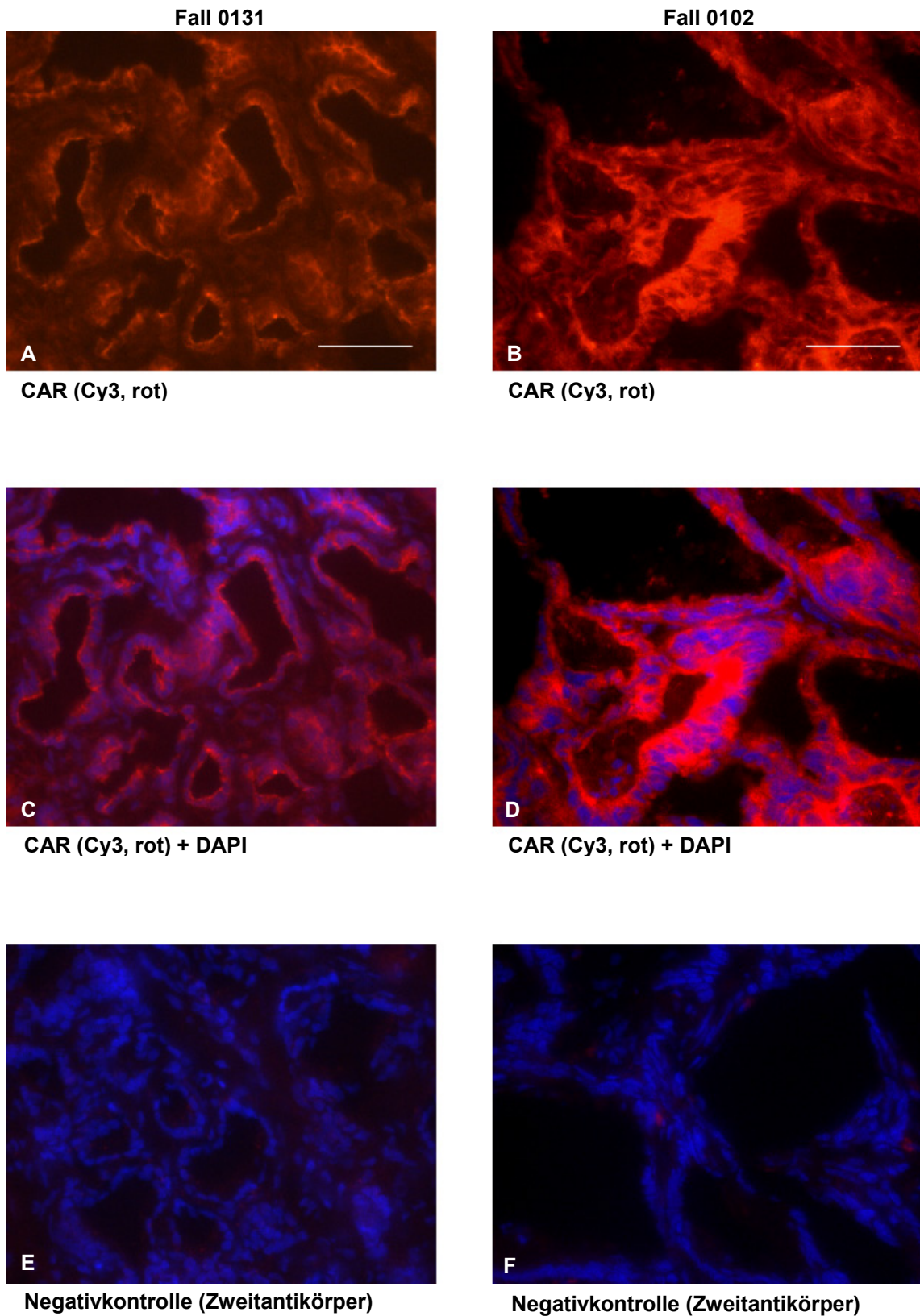


Abbildung 23:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0131 und 0102.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

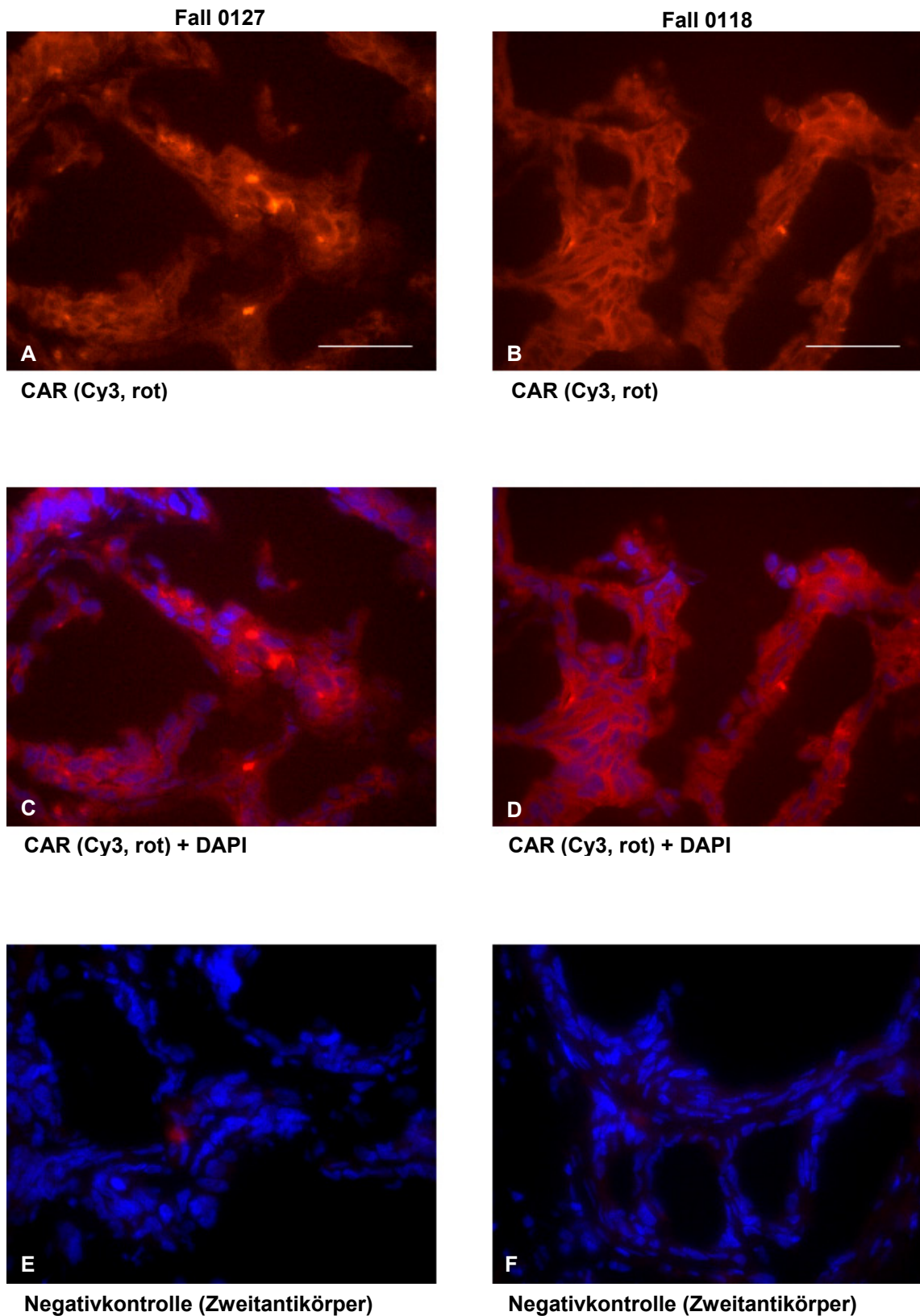


Abbildung 24:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0127 und 0118.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmCB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

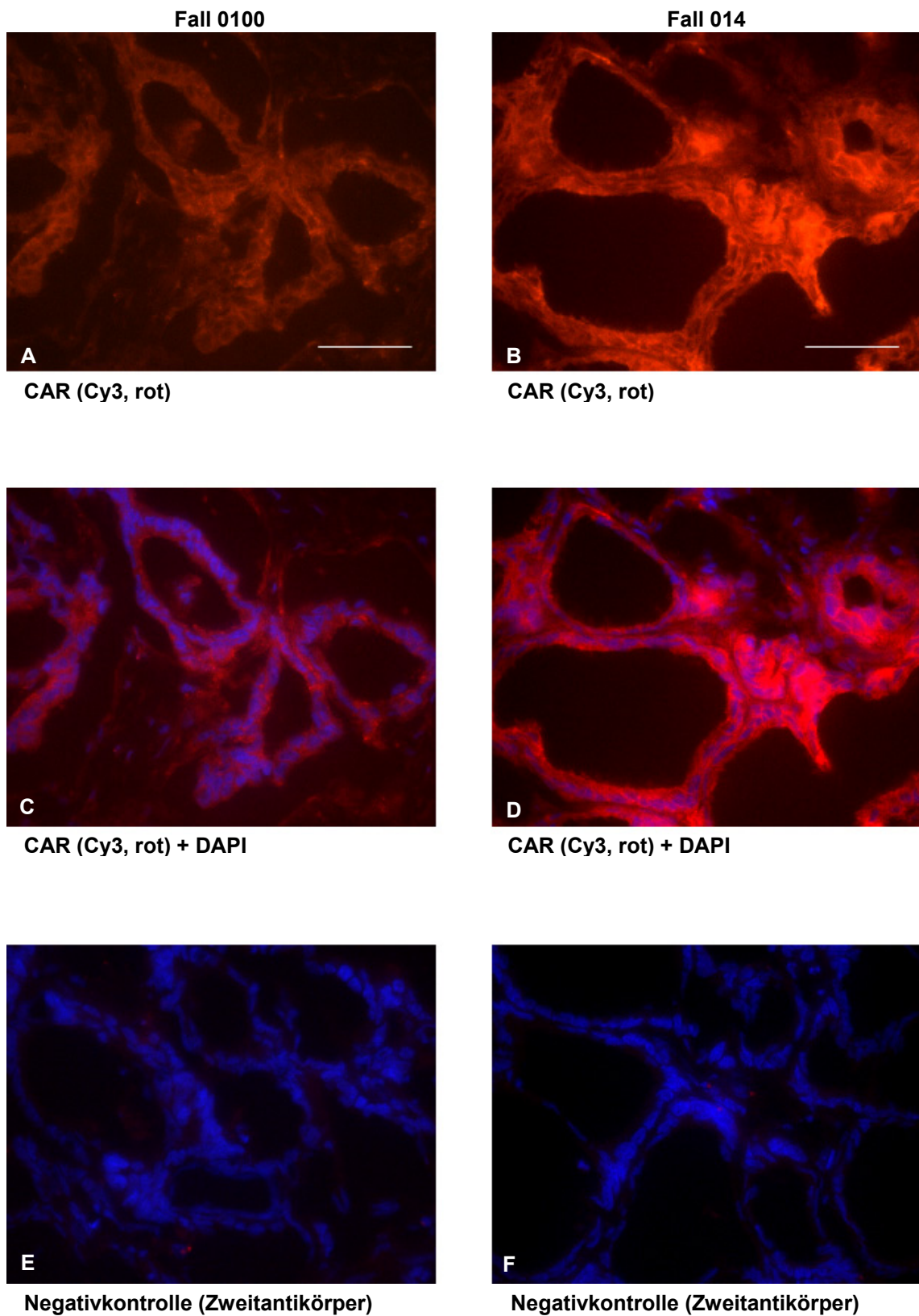


Abbildung 25:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0100 und 014.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

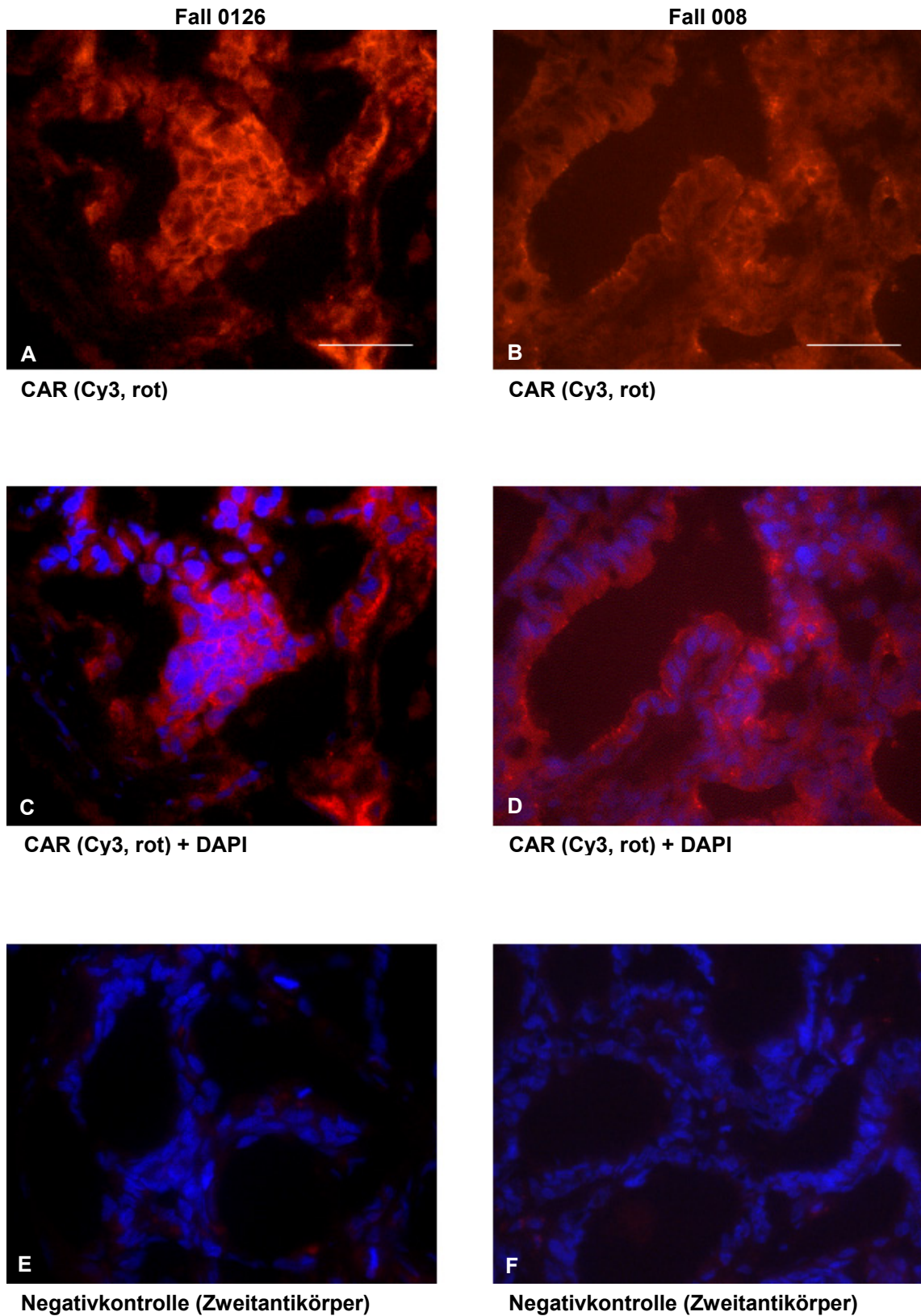


Abbildung 26:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0126 und 008.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper Rmcb (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

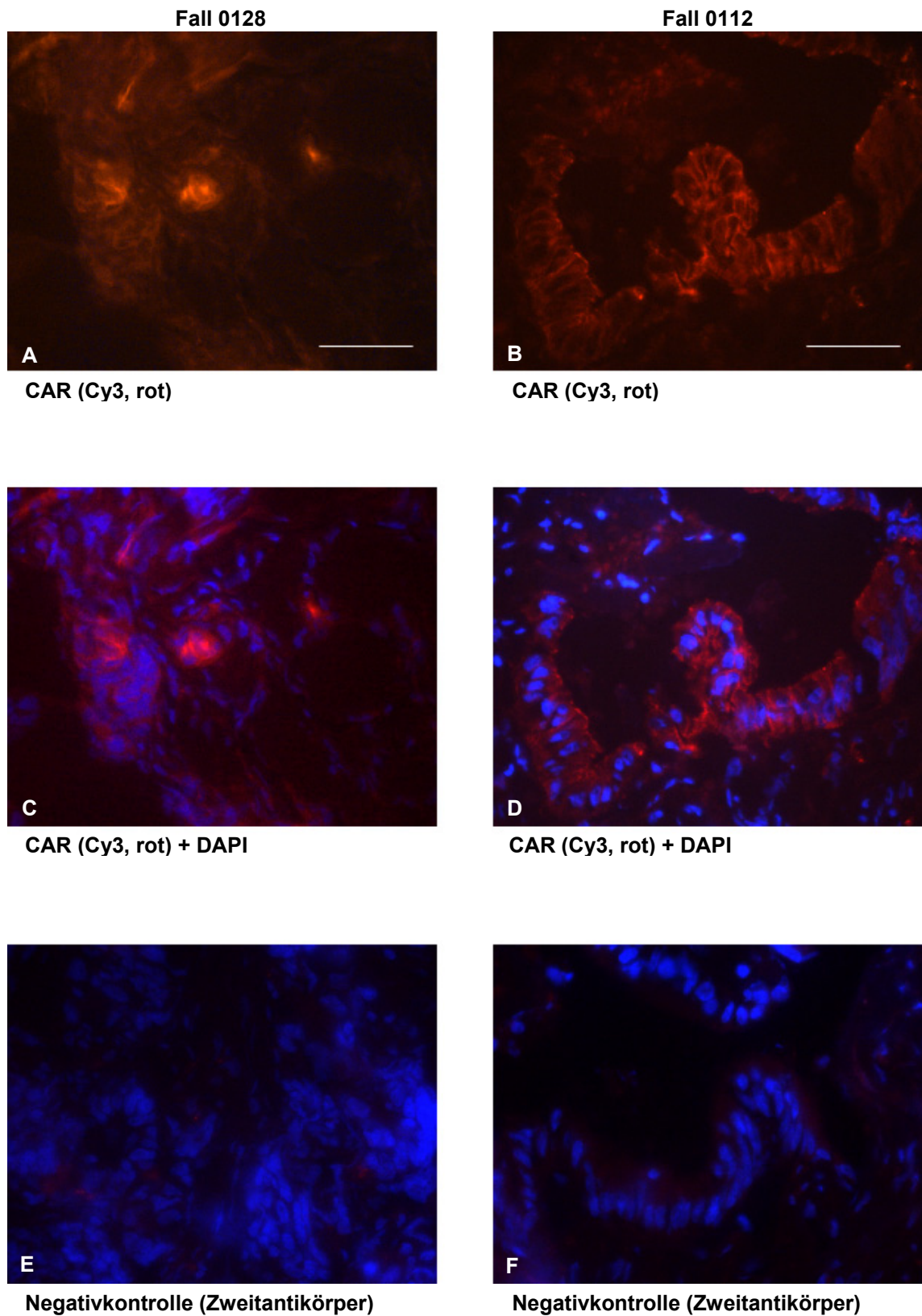


Abbildung 27:

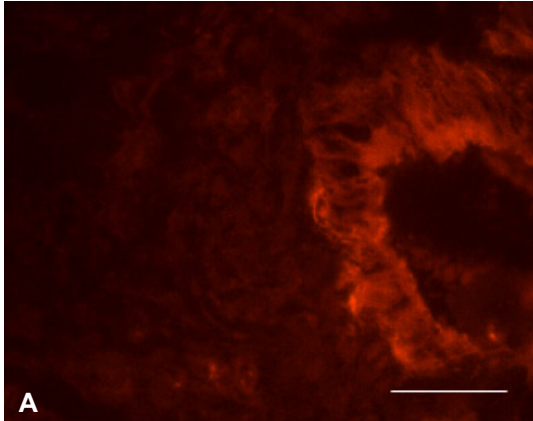
**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0128 und 0112.**

A und B: Cy3-Kanal (CAR), C und D: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), E und F: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

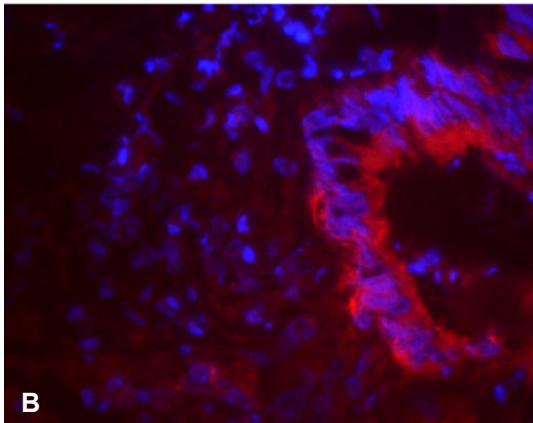
Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.



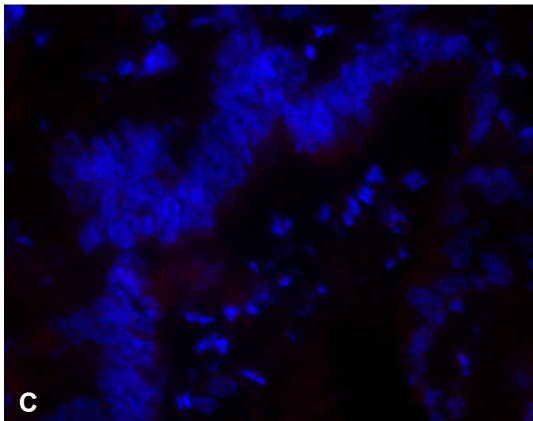
Fall 2908



CAR (Cy3, rot)



CAR (Cy3, rot) + DAPI



Negativkontrolle (Zweitantikörper)

---

Abbildung 28:

**Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 2908.**

A: Cy3-Kanal (CAR), B: Zusätzlich mit DAPI-Kanal (Zellkerne), C: Negativkontrolle (Zweitantikörperkontrolle). Vergrößerung 400X. Die Linie entspricht 50 µm.

Präparat: Kryoschnitt, Primärantikörper: Monoklonaler Antikörper RmcB (Maus anti-hCAR), Sekundärantikörper: Esel anti-Maus, Cy3-markiert, Kernfärbung: DAPI.

**II. Abkürzungsverzeichnis**

°C	Temperatur in Celsius
Δ	<i>Delta</i> , bezeichnet eine Veränderung gegenüber der Regel oder dem Ausgangswert
μ	Mikro
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus, in dieser Arbeit überwiegend rekombinante adenovirale Vektoren bezeichnend
ADP	<i>Adenovirus death protein</i>
AFP	Alpha-Fetoprotein, onkofetales Antigen, das als Tumormarker für das HCC verwendet wird
Anti-	Geht hier in der Regel dem Epitop, gegen das ein Antikörper gerichtet ist, voraus
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
CA19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CAR	Coxsackie- und Adenovirusrezeptor, der primäre zelluläre Rezeptor für Adenoviren und Coxsackie B Viren
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i> , Karzinoembryonales Antigen
CMV	Cytomegalovirus
COX	Cyclooxygenase
Cy3	Indocarbocyanin, Fluorophor, Exzitationsmaximum 550 nm, Emissionsmaximum 570 nm
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidest., zweifach demineralisiertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum

G-CSF	Granulozyten Colonie-stimulierender Faktor
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colonie-stimulierender Faktor
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthetase</i> , induzierbare Stickoxidsynthetase
m	Milli
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Viruspartikel pro zu infizierende Zelle
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreaticographie
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
n	nano
NK	Natürliche Killerzellen
p.a.	<i>pro analysi</i> , analytischer Reinheitsgrad eines Stoffes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
PFA	Paraformaldehyd
PPD	p-Phenylendiamin
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RGD	Peptidsequenz Arg-Gly-Asp, Arginin-Glycin-Asparagin
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR, mRNA wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert und analysiert
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
U	Unit(s)
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i> Protein, ein <i>tight junction</i> Marker

**III. Abbildungsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1:</b> Zielindikationen gentherapeutischer klinischer Studien.	<b>8</b>
<b>Abb. 2:</b> Prozentuale Verteilung der in klinischen Gentherapiestudien eingesetzten Vektoren.	<b>9</b>
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung (A) und Kryoelektronenmikroskopische Aufnahme (B) eines Adenovirus.	<b>11</b>
<b>Abb. 4:</b> Modell der Adenovirusfreisetzung durch Fiber-CAR Interaktion.	<b>15</b>
<b>Abb. 5:</b> Adenovirale Infektion einer Zielzelle.	<b>17</b>
<b>Abb. 6:</b> Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.	<b>51</b>
<b>Abb. 7:</b> Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.	<b>52</b>
<b>Abb. 8:</b> Vergleich der CAR-Expression von Zellkulturen mit der Infizierbarkeit durch Adenovirus.	<b>53</b>
<b>Abb. 9:</b> Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors im cholangiozellulären Karzinom (CCC, Fall 0005) mittels indirekter Immunfluoreszenz.	<b>57</b>
<b>Abb. 10:</b> Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors im hepatozellulären Karzinom (HCC, Fall 0017) mittels indirekter Immunfluoreszenz.	<b>59</b>
<b>Abb. 11:</b> Darstellung des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptors in der Lebermetastase eines kolorektalen Karzinoms (Fall 0124) mittels indirekter Immunfluoreszenz.	<b>61</b>
<b>Abb. 12:</b> Kolokalisation von CAR und dem tight junction Marker ZO-1 in HuH-7 Zellen.	<b>63</b>
<b>Abb. 13:</b> Kolokalisation von CAR und dem tight junction Marker ZO-1 im CCC (Fall 0005).	<b>65</b>
<b>Abb. 14:</b> Kolokalisation von CAR und dem tight junction Marker ZO-1 im Gallengang (Fall 2907, tumorfrei).	<b>67</b>
<b>Abb. 15:</b> Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 0090 und 0005.	<b>84</b>
<b>Abb. 16:</b> Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 2605 und 2717.	<b>85</b>
<b>Abb. 17:</b> Komplette Aufnahmeserie der CCCs, Fall 0023 und 2565.	<b>86</b>
<b>Abb. 18:</b> Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0017 und 0020.	<b>87</b>

<b>Abb. 19:</b> Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0130 und 2569.	<b>88</b>
<b>Abb. 20:</b> Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0042 und 0047.	<b>89</b>
<b>Abb. 21:</b> Komplette Aufnahmeserie der HCCs, Fall 0061.	<b>90</b>
<b>Abb. 22:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0122 und 0124.	<b>91</b>
<b>Abb. 23:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0131 und 0102.	<b>92</b>
<b>Abb. 24:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0127 und 0118.	<b>93</b>
<b>Abb. 25:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0100 und 014.	<b>94</b>
<b>Abb. 26:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0126 und 008.	<b>95</b>
<b>Abb. 27:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 0128 und 0112.	<b>96</b>
<b>Abb. 28:</b> Komplette Aufnahmeserie der kolorektalen Lebermetastasen, Fall 2908.	<b>97</b>
<b>Tab. 1:</b> Laborprotokoll Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Zellen.	<b>41</b>
<b>Tab. 2:</b> Laborprotokoll Immunfluoreszenzfärbung auf CAR an Kryoschnitten.	<b>43</b>
<b>Tab. 3:</b> Laborprotokoll Infektion der Zellkulturen mit Ad-GFP.	<b>47</b>

## **I. Danksagung**

### **Ich danke insbesondere:**

Meiner Familie, für die moralische und finanzielle Unterstützung.

Dr. Frank Schnieders, für menschlich und fachlich herausragende Betreuung und Anleitung.

Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Beisiegel, für die freundliche Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, sowie für die herzliche Aufnahme in die Abteilung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rogiers (ehem. Direktor), Dr. Christian Hillert , Dr. Lars Müller und Frau Himpel, Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie des UKE, für die Überlassung der Gewebeproben und die fachliche Beratung.

Denise Juhr, für exzellente technische Assistenz.

Dr. Reinhard Wähler, Division of Human Gene Therapy, University of Alabama at Birmingham, für die kollegialen Gespräche und die Bereitstellung einiger eigener Publikationen.

Frau Dr. Koops, Institut für Pathologie des UKE, für die histopathologische Absicherung der Gewebeproben.

Christine Runge und den Mitarbeitern der Abteilung, für die kontinuierliche Motivation, Unterstützung und das einzigartige Arbeitsklima.

## **J. Lebenslauf**

**Name:** Jan Simon Dolezil  
**Adresse:** Maria-Louisen-Straße 1, 22301 Hamburg  
**Geburtsdatum und -ort:** 10. März 1978, Hamburg  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### **Bildung und Wehrdienst**

1999 – 2006 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
1998 – 1999 Wehrdienst in der Bundeswehr  
1988 – 1998 Sophie-Barat-Schule, Hamburg  
1994 – 1995 Cushing Academy, Ashburnham, MA, USA

### **Prüfungen und Approbation**

20. Dezember 2006 Approbation als Arzt  
Dezember 2006 3. medizinisches Staatsexamen, Universität Hamburg  
September 2005 2. medizinisches Staatsexamen, Universität Hamburg  
August 2002 1. medizinisches Staatsexamen, Universität Hamburg  
September 2001 Ärztliche Vorprüfung, Universität Hamburg  
Juni 1998 Abitur, Sophie-Barat-Schule, Hamburg

### **Relevante Praxiserfahrung**

seit 15. April 2007 Assistenzarzt, Abteilung für Geburtshilfe und Pränatalmedizin, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg

### **Praktisches Jahr**

05/2006 – 09/2006 Innere Medizin, Diakonieklinikum Alten Eichen, Hamburg  
02/2006 – 05/2006 Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Asklepios Klinik Altona, Hamburg  
10/2005 – 01/2006 Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Burn Unit, Tasmanian Cardiothoracic Unit, Royal Hobart Hospital, Hobart, Tasmania, Australien

### **Famulaturen**

07/2004 – 08/2004 Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, UKE  
02/2003 – 03/2003 Innere Medizin, St. Hedwigs Klinikum, Berlin  
09/2002 – 10/2002 Gynäkologie, Dr. Kopp und Dr. Kügler, Hamburg

## **K. Erklärung**

### **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

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

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

Unterschrift: Jan Simon Dolezil