

Aus der I. Medizinischen Klinik
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

**Virale Expression eines humanen Interleukin 12 Fusionsproteins
im Kolonkarzinom mittels Doxycyclin-regulierbarer
adenoviraler Vektoren**

Dissertation

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

Karen Krüger
aus Berlin
Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 26.04.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	PD Dr. med. Andreas Block
-------------------------------------	---------------------------

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter:	Prof. Dr. med. Walter Fiedler
---------------------------------	-------------------------------

Prüfungsausschuss, 3.Gutachter:	Prof. Dr. med. Christoph M. Bamberger
---------------------------------	---------------------------------------

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das kolorektale Karzinom	3
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Pathologie, Klinik und Klassifizierung	3
2.1.3	Diagnostik	6
2.1.4	Klassische Therapien	7
2.2	Die Gentherapie im Allgemeinen	9
2.2.1	Gentherapie und Gentechnologie	9
2.2.2	Transfer und Expression der Gene	9
2.2.3	Richtlinien und Gesetze zur Regelung der Gentechnologie und Gentherapie	12
2.2.3.1	Gentechnologie	12
2.2.3.2	Gentherapie	13
2.3	Das Adenovirus	14
2.3.1	Aufbau	14

2.3.2	Das Genom des Adenovirus	15
2.3.3	Replikativer Zyklus	16
2.3.4	Gentransfer mittels viraler Vektoren	18
2.3.5	Die verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren	20
2.3.6	Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR)	22
2.4	Regulierbare Genexpression mittels Tetracyclinen (Transaktivatoren)	22
2.4.1	Prokaryontischer Ursprung	23
2.4.2	Anwendung des Tet-Systems in eukaryontischen Zellen	23
2.4.3	Der Induktor Tetracyclin und seine Analoga	25
2.5	Das Zytokin Interleukin-12	25
2.5.1	Immunbiologische Aufgaben des Interleukin-12	26
2.5.2	Aufbau und natürliches Vorkommen	26
2.5.3	Interleukin-12 in der antitumoralen Immunabwehr	26
2.5.4	Nebenwirkungen des Interleukin-12 bei systemischer Applikation	27
2.5.5	Das Fusionsprotein p35/p40	27
2.5.6	Interferon- γ	28
2.6	Überblick zur viraler Gentherapie der letzten Jahre und aktueller Stand	29

3	Material und Methoden	34
3.1	Material	34
3.1.1	Chemikalien	34
3.1.2	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	36
3.1.3	Antibiotika	37
3.1.4	Zusammensetzung sonstiger Lösungen	37
3.1.5	Wasser	38
3.1.6	Reagenzkits	38
3.1.7	Weitere Materialien	38
3.1.8	Geräte	39
3.1.9	Zelllinien	40
3.2	Patienten und Probengewinnung	40
3.2.1	Patienten des Zentrums für Innere Medizin	41
3.2.2	Patienten der Klinik für Allgemeinchirurgie	41
3.3	Allgemeine Arbeitsmethoden	42
3.3.1	Sterilisation	42
3.3.2	Zellkultur	42

3.4	Spezielle Arbeitsmethoden	43
3.4.1	Vermehrung und Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren	43
3.4.1.1	Virusvermehrung in 293-Zellen	43
3.4.1.2	Titerung mittels Plaqueassay	45
3.4.2	Infektion der Zellkulturen und Gewebebiopsien mit rekombinanten Adenoviren	46
3.4.2.1	Allgemeine Methode der Infektion von HT29-Zellen aus der Zellkultur	46
3.4.2.2	Dosisescalation der Biopsien mit Ad.3r-Luc und Ad.3r-hIL-12	48
3.4.2.3	Transfektion der humanen Kolonkarzinom-Biopsien	49
3.4.3	Quantifizierung und Charakterisierung der Genprodukte	50
3.4.3.1	Bestimmungen der Luciferaseaktivität	50
3.4.3.2	ELISA zur Bestimmung der Konzentration von humanen Interleukin-12	51
3.4.3.3	Bestimmungen des Proteingehaltes	51
3.4.3.4	β -Galaktosidase-Färbung	53
3.4.4	Stimulation der humanen Lymphozyten mittels humanem Interleukin-12	53
3.4.5	Immunhistochemische Färbung des Cocksackie-Adenovirus-Rezeptors	55

4	Ergebnisse	56
4.1	Einführung	56
4.2	Adenovirale Vektoren	57
4.2.1	Ad.RSV.β-Gal	57
4.2.2	Ad.3r-Luc	57
4.2.3	Ad.3r-hscIL12	57
4.3	Ergebnisse der Zellkulturexperimente	57
4.3.1	Ergebnisse der Transfektion mit Ad.RSV.β-Gal	57
4.3.2	Infektion mit den adenoviralen Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc	58
4.3.3	Darstellung des induzierbaren Systems in der Zellkultur	59
4.4	Ergebnisse der Experimente mit humanem Tumorgewebe	61
4.4.1	Transfektion des Gewebes mit Ad.RSV.β-Gal	61
4.4.2	Dosisescalation	62
4.4.3	Darstellung der Transduzierbarkeit Kolonkarzinom-Biopsien	63
4.4.4	Anwendung des induzierbaren Systems bei humanen Karzinom-Biopsien	66
4.4.5	Darstellung der Transduzierbarkeit und Supprimierbarkeit von Metastasengewebe der Leber	70

4.4.6	Darstellung der Transduzierbarkeit und Supprimierbarkeit von dysplastischen Gewebe	71
4.5	Stimulation humaner Lymphozyten mit Interleukin-12	72
4.6	Statistische Erhebung der Individualdaten der Patienten	74
4.7	Immunhistologischen Färbung des Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor	74
5	Diskussion	77
5.1	Gründe für eine Gentherapie am kolorektalen Karzinom	77
5.1.1	Therapeutische Sicht	77
5.1.2	Zellbiologische Sicht	78
5.2	Gründe für die adenovirale Gentherapie	79
5.2.1	Eignung des verwendeten Vektor	79
5.2.2	Vergleich der verwendeten Vektoren	81
5.2.3	Eignung des therapeutischen Gens	83
5.3	Steuerung der Expression der therapeutischen Gens über das Tet-Off-System	84
5.3.1	Darstellung und Nutzen des induzierbaren Systems	84
5.3.2	Zuverlässigkeit des induzierbaren Systems bei Kolonkarzinom-Zellen	85

5.4	Vergleich der Individualdaten der Patienten	86
5.4.1	Zur Person: Alter und Vorerkrankungen der Patienten	86
5.4.2	Zum Primärtumor: Tumorgröße, Histologische und Lokalisation	87
5.4.3	Zum Wachstum: lokale Ausbreitung und Metastasierung	89
5.5	Perspektiven für eine klinische Studie	89
5.5.1	Gründe für eine klinische Studie	89
5.5.2	Verbesserung der Transfektionsrate	90
5.5.3	Grenzen der Übertragbarkeit auf eine <i>in vivo</i> -Studie	91
6	Zusammenfassung	94
7	Literaturverzeichnis	95
8	Abbildungsverzeichnis und Abkürzung	111
8.1	Abbildungen und Tabellen	111
8.2	Abkürzungen	114

9 Anhang: Firmenliste	119
10 Danksagung	122
11 Lebenslauf	123
12 Erklärung	124

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Karzinome der westlichen Welt, das oft lange Jahre unentdeckt wächst. Bei 25% der Patienten ist das Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits metastasiert. Sie kommen häufig solitär, jedoch auch multipel vor. Die derzeitige Therapie erfolgt fast bei allen Patienten primär chirurgisch im Sinne einer Segmentresektion oder Hemi-Kolektomie, welche häufig mit den entsprechenden Funktions- und Lebensqualitätseinschränkungen einhergeht. Strahlentherapie und Chemotherapie sind beim kolorektalen Karzinom von untergeordneter Bedeutung. Lediglich in späteren Stadien wird eine postoperative Chemotherapie mit dem Ziel zur Verminderung von Lokalrezidiven durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generation präklinischer Daten der viralen Expression eines IL-12 Fusionsproteins im kolorektalen Karzinom mittels Doxycyclin-regulierbarer Vektoren. Endoskopisch oder chirurgisch entnommenes humanes Kolonkarzinomgewebe wird *ex vivo* mit rekombinanten adenoviralen Vektoren infiziert, die eine transiente und Doxycyclin-regulierbare Expression des therapeutischen Gen hIL-12 und spezifischer Markergenen ermöglichen. Für die vorliegende Arbeit sollen von 12 ausgewählten und informierten Patienten die Daten der je vierzig bis sechzig Proben erhoben werden. Zwecks Vergleichbarkeit werden auch aus der intakten Mukosa (5cm Sicherheitsabstand zum Tumorrand) Biopsien entnommen. Bei größeren Tumoren (mehr als 3cm Durchmesser durchmessend) findet eine zusätzliche Differenzierung der Biopsien zwischen dem Zentrum und dem Randgebiet (Peripherie) des Tumors statt. Das Gewebe wird nach histologischer Sicherung der Diagnose zunächst mit rekombinanten, replikationsdefizienten Adenoviren zur Expression von Markergen wie β -Galaktosidase infiziert, um die Transduzierbarkeit dieses Gewebes zu demonstrieren. Anschließend erfolgt die Infektion dieser Gewebe mit adenoviralen Vektoren zur Doxycyclin-supprimierbaren Luciferase-Expression. Anhand dieser Experimente soll die Höhe der Transgen-Expression in verschiedenen Arealen des Tumors und der intakten Mukosa sowie deren Regulierbarkeit abgeschätzt werden. Parallel erfolgt die Infektion der Gewebeproben mit Doxycyclin-regulierbaren Adenoviren zur Expression eines humanen IL-12 Fusionsproteins, welches in einer zukünftigen klinischen Studie Verwendung finden soll. Die Transgen-Expression kann mit Hilfe eines hIL12 p40 ELISA im Überstand nachgewiesen werden. Die Verwendung eines p40-p35 Fusionsproteins

verhindert die Inhibition der Bioaktivität durch p40 Homodimere. Die Regulierbarkeit der Genexpression wird durch Zugabe von Doxycyclin ermittelt. In einem anschließenden Experiment wird durch Inkubation von humanen Lymphozyten die Bioaktivität durch Bestimmung der Interferon-Induktion quantifiziert. Bei einem Teil der Biopsien soll eine immunhistochemische Darstellung des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) erfolgen. Die Daten der Transgen-Expression werden in Verbindung mit der Dichte des CA-Rezeptors der jeweiligen Gewebeproben beurteilt. Ein vorangehendes Experiment soll die Transfizierbarkeit von HT29-Zellen aus der Zellkultur mit den später verwendeten Vektoren darstellen. In Hinblick auf eine klinische Studie mit zwei kombinierten adenoviralen Vektoren soll durch eine Doppelinfektion mit den Vektoren Ad.3r-Luc und Ad.3r-hscIL-12 die Unabhängigkeit der Expression der beiden Genprodukte voneinander bewiesen werden.

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist die häufigste Tumorerkrankung des Verdauungstraktes, welche oft lange Jahre unentdeckt wächst. Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt. In den Industrieländern hat die Anzahl der Darmkrebsneuerkrankungen in den letzten 30 Jahren deutlich zugenommen. Mit einer jährlichen Inzidenz in Höhe von 30–35 pro 100.000 Einwohner ist der Darmkrebs eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen in Mitteleuropa und für etwa 15 % aller Krebstodesfälle verantwortlich. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, dies bezieht sich vor allem auf Rektumkarzinome (Geschlechtsverhältnis 60:40). In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom sowohl bei den Neuerkrankungen als auch bei der Sterblichkeit die zweithäufigste Krebsform dar. 2005 verstarben hier mehr als 20.000 Menschen am kolorektalen Karzinom.¹ Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister geht sogar von fast 30.000 Todesfällen pro Jahr aus.² In der Altersverteilung liegt der Häufigkeitssgipfel um das 65. Lebensjahr mit einem steilen Anstieg ab dem 45. Lebensjahr. 70% der Diagnosen werden im Alter zwischen 50 und 80 Jahren gestellt. Das Lebenszeitrisko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt circa 5-6% und an diesem Tumor zu versterben 2.5-3%. Bei fast 25% der Patienten ist das Karzinom bei Diagnosestellung bereits metastasiert.³

2.1.2 Pathologie, Klinik und Klassifizierung

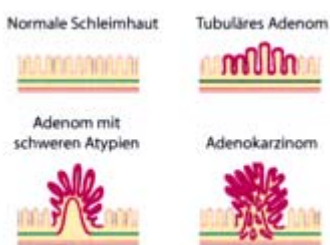
Pathologie

Der Sammelbegriff kolorektales Karzinom umfasst alle Karzinome des Kolon und des Rektum, welche in über 80% Adenokarzinome darstellen. Selten kommen auch verschleimende oder undifferenzierte Karzinome vor. Makroskopisch werden ulzerös (55%), polypös (25%) und plattenartig wachsende Karzinome differenziert. Gemäß der Verteilungsregel finden sich 60% der Tumoren im Rektum, ca. 20% im Sigma und der Rest im übrigen Kolon. Ihr Vorkommen ist in der Regel solitär, in 2-5% trifft man auch auf multiple Karzinome. Das kolorektale Karzinom wächst kontinuierlich vor allem in orale Richtung und infiltriert somit häu-

fig die Blase, die Ureteren, den Uterus, die Prostata und die Ovarien. Die lymphogene Metastasierung verläuft hauptsächlich über drei Metastasenstraßen. Hochsitzende Karzinome metastasieren zu den paraaortalen Lymphknoten, Tumoren in mittleren Ebenen zusätzlich nach lateral in die Beckenlymphknoten und tiefsitzende Karzinome metastasieren ebenfalls noch in die inguinalen Lymphknoten. Die hämatogene Ausbreitung erfolgt wie die lymphogene je nach Tumorsitz (Cava-Typ und Porta-Typ) hauptsächlich in die Leber und metastasiert von dort aus sekundär in die Lunge.

Risikofaktoren

Zur Entstehung eines Dickdarmkarzinoms tragen endogene und exogene Risikofaktoren bei. Zu den endogenen Risikofaktoren zählt vor allem die Entartung eines präexistierenden kolorektalen Adenoms. Über 90% der kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden eines



villösen, tubovillösen oder tubulösen Adenoms. Dieser Vorgang wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und dauert ca. 5-10 Jahre. (**Abb.1: Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms**, Quelle: Wikipedia)

Der Rest wird als de-novo-Karzinome bezeichnet. Zudem können entzündliche Darmerkrankungen wie Kolitis ulzerosa und Morbus Crohn das Karzinomrisiko deutlich erhöhen. Bei der Kolitis ulzerosa ist das Risiko nach zehnjähriger Erkrankung bereits erhöht und nach 30 Jahren bei 30%. Patienten die an Morbus Crohn leiden tragen das siebenfache Risiko. Die Erkrankung an einem Polyposis-Syndrom, wie zum Beispiel FAP (familiäre adenomatöse Polyposis), das Gardner-Syndrom und das Peutz-Jegher-Syndrom, stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. Beim hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom, genannt Lynch-Syndrom, handelt es sich um eine genetische Variante, welche autosomal-dominant vererbt wird und eine 100%ige Penetranz hat. Während sich beim Lynch I –Syndrom meistens im proximalen Kolon Tumoren feststellen lassen, treten sie beim Lynch II –Syndrom häufig mit anderen malignen Tumoren auf, wie zum Beispiel Magen- und Uteruskarzinome. Zu den exogenen Risikofaktoren gehört vor allem der Verzehr von rotem Fleisch⁴ und fettreicher Nahrung⁵. Durch die übermäßig zugeführten Lipide kommt es zu einer vermehrten Gallensäurebildung, welcher an Epithelien eine schädigende und proliferationsfördernde Wirkung zugeschrieben wird. Ebenfalls ist ballaststoffarme Nahrung aufgrund der längeren Verweildauer im kolorektalen Bereich ein wichtiger Faktor, da es hier zu einer erhöhten Konzentration von Karzinogenen wie z.B. Nitriten und Alkohol kommt. Ferner besteht ein generell

erhöhtes Risiko bei Adipositas. Ab einem BMI von 28,5 steigt die Gefahr der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms deutlich an. Das haben Daten aus Fallkontroll- und prospektiven Kohortenstudien übereinstimmend ergeben. In den höchsten BMI-Kategorien ist das Risiko für Männer um 60%, für Frauen um 30% gesteigert. Einigen Studien zufolge ist diese Assoziation für Kolonkarzinome stärker als für Rektumkarzinome. Auch scheint das distale Kolon stärker betroffen zu sein als das proximale. Der Zusammenhang zwischen erhöhtem BMI und gesteigertem Krebsrisiko legt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Energiezufuhr einen Risikofaktor für die Entstehung von Malignomen darstellt. Für den Effekt, den positive Energiebilanz und Adipositas auf das Krebsrisiko haben, wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen: das verstärkte Anfallen freier Radikale bzw. oxidierter Moleküle und die oxidative Schädigung der DNA, Veränderungen an karzinogenmetabolisierenden Enzymen oder an der Homöostase der Gewebsgröße und schließlich Veränderungen im Hormonmetabolismus. Allerdings existieren für den Menschen lediglich für die letztere Hypothese auch Daten. Hormonelle Veränderungen infolge von Adipositas können durch Umgestaltung des Metabolismus von Androgenen, Östrogenen, Progesteron, Insulin und IGF-1 („Insulin-Like Growth Factor 1“) für ein erhöhtes Karzinomrisiko verantwortlich sein. Sexualsteroid regulieren die Balance zwischen Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose und könnten auch das selektive Wachstum von präneoplastischen oder neoplastischen Zellen fördern. Die erhöhten Spiegel an Sexualsteroiden sind durch die aufgrund der Insulinresistenz erhöhten Insulinspiegel zu erklären.⁶

Berufliche Einflüsse werden ebenfalls als mögliche Risikofaktoren in Betracht gezogen. So wurde 1992 ein erhöhtes Risiko unter Berufskraftfahrern gefunden. Es ist noch unklar, ob der Befund einer Exposition gegenüber Auto- bzw. Dieselabgasen zuzuschreiben ist oder auf andere Faktoren wie die sitzende Tätigkeit zurückzuführen ist. In Berufen mit überwiegend sitzender Tätigkeit wurde bereits in mehreren Studien ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome beobachtet. In amerikanischen Studien wurde ebenfalls in Berufen mit Schicht-einteilungen und häufiger Nachtarbeit eine erhöhte Gefahr für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms gefunden. Gründe hierfür könnten auch die überwiegend sitzende Tätigkeit und ein unregelmäßiger Essrhythmus sein, der häufig zu Verdauungsstörungen, z.B. Verstopfungen, führt.

Klinik

Klinische Erstbeschwerden wie Schwäche, Leistungsknick und Müdigkeit sind meist die Folgen einer Tumoranämie. Erst spät treten gastrointestinale Symptome auf. Sie bestehen in Teerstühlen oder Blutbeimengungen, welche durch Ulzerationen vor allem eines distalen Tumors entstehen. Häufig kommt es zu allgemeinen Änderungen der Stuhlgewohnheiten, wie dem Wechsel zwischen Diarrhö und Obstipation durch den Aufstau von Stuhl und dessen Verflüssigung bei Lumeneinengung des Darmes. Die gastrointestinalen Symptome sind sehr abhängig von der Lokalisation des Tumors.

Klassifikation

Die Einteilung erfolgt nach zwei Klassifikationssystemen. Wie fast alle soliden Tumoren wird auch das kolorektale Karzinom nach dem TNM-System eingeteilt. Die früher gebräuchliche Klassifikation nach Dukes, welche das Karzinom von Stadium Dukes A (Karzinom auf die Darmwand beschränkt) bis hin zu Dukes D (Fernmetastasen) differenziert, ist heute durch die differenzierte UICCI-Klassifikation weitgehend abgelöst worden. Die UICCI-Klassifikation unterteilt sich in die Stadien 0-IV und bedient sich hierbei der TNM-Klassifikation.

2.1.3 Diagnostik

An erster Stelle stehen die Anamnese, eine allgemeine körperliche Untersuchung einschließlich einer digital-rektalen Untersuchung und der Haemokulttest. Ein neueres Verfahren zum frühen Nachweis von Polypen und Darmtumoren ist die Bestimmung des Biomarkers Tumor M2-PK im Stuhl. Die M2-PK ist ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel von Polypen und Tumoren und weist sowohl blutende als auch nicht blutende Polypen und Tumoren nach. Bei Verdacht auf ein Kolonkarzinom wird als diagnostisches Mittel der Wahl die Koloskopie durchgeführt (Abb.2). Im Rahmen dieser Untersuchung werden bei entsprechendem Verdacht Biopsien entnommen, die histologisch untersucht werden. Die Koloskopie dient auch der



Vorsorge, da gleichzeitig gutartige Polypen entfernt werden können, die ein Entartungsrisiko besitzen. Aus diesem Grund wird in Deutschland die regelmäßige Koloskopie ab dem 55. Lebensjahr zur Darmkrebsprophylaxe von den Krankenkassen bezahlt. (Abb.2: Adenokarzinom des Colon ascendens während einer Koloskopie, Quelle: Chir Gastroenterol 2005; Vol. 21, No. 2) Zu

den weiteren Untersuchungsmethoden zählen die Rekto- oder Sigmoidoskopie, die Untersu-

chung des Enddarms mit einem starren oder flexiblen Endoskop, sowie eine Röntgenkontrastmittelaufnahme, die inzwischen durch die Computertomografie weitgehend ersetzt wurde. In Zukunft wird eventuell die auf einer Spiral-Computertomographie basierte Colonographie als nicht-invasive Methode die Koloskopie ersetzen. Momentan ist diese Methode aber noch in der Entwicklungsphase, da sie vor allem bei kleinen Polypen oder Karzinomen in ihrer Aussagekraft der Koloskopie noch unterlegen ist. Bei einem histologisch dringenden Verdacht auf das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms, werden in der Regel folgende Untersuchungen zum Tumorstaging veranlasst:

- Abdomensonografie zum Ausschluss von Lebermetastasen
- Röntgen-Thorax im Stehen in zwei Ebenen zum Ausschluss von Lungenmetastasen
- Computertomografie oder Magnetresonanztomografie des Abdomens, des Thorax und des Schädels (CCT/cMRT nur bei klinischer Symptomatik) zur Erfassung der Tumorgroße und zum Ausschluss von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen der Leber, der Lunge und des Gehirns. Eine Computertomographie des Abdomens oder des Thorax wird nur bei begründetem Verdacht auf eine Fernmetastasierung durchgeführt, in der Regel ist eine Sonographie des Bauches sowie ein konventioneller Röntgen-Thorax zum Staging ausreichend, da beide Methoden deutlicher geringer strahlenbelastend sind als die Computertomografie.
- Skelettszintigrafie zum Ausschluss von Knochenmetastasen bei begründetem Verdacht
- bei bösartigen Tumoren des Rektums Endosonographie zur Erfassung der Invasionstiefe des Tumors und zum Nachweis vergrößerter Lymphknoten in der Umgebung

Zur Verlaufskontrolle stehen Tumormarker (CEA und CA 19-9) zur Verfügung. Da diese bei vielen Tumoren negativ sind und es häufig falsch-positive Befunde gibt, eignen sie sich allerdings nicht zur Screening-Untersuchung.

2.1.4 Klassische Therapien

Prognose

Das Langzeitüberleben von Patienten ist abhängig vom initialen Tumorstadium, von der Anzahl der betroffenen Lymphknoten,^{7,8} von defekten genetischen Reparaturmechanismen, und der Entdeckung von Tumorzellen im den Blutwegen oder im Knochenmark.⁹

Operative Therapie

Für die meisten kolorektalen Karzinome ist bis heute die operative Behandlung das Verfahren der Wahl. Ziel ist die radikale Tumorresektion mit einem genügenden Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe unter Mitausräumung der lokalen Lymphknoten. Am Kolon wird eine Resektion des tumortragenden Darmteiles mit dem regionalen Lymphabflussgebiet in einer Non-Touch-Isolationstechnik vorgezogen. Hierbei wird der Tumor en-bloc mit einem Sicherheitsabstand von sieben Zentimetern nach oral und zwei nach aboral reseziert. Bei einem Rektumkarzinom wird präoperativ eine neoadjuvante Radiotherapie durchgeführt, um ein Down-Staging herbeizuführen. Die Lokalisation des Tumors ist entscheidend dafür, ob eine kontinenserhaltende anteriore Rektumresektion (Dixon), eine tiefe anteriore Rektumresektion (Dixon) oder bei Sphinkterinfiltration eine abdominoperineale Rektumresektion (Miles) durchgeführt wird.

Adjuvante Therapie

Eine Chemotherapie ist meist im Sinne einer adjuvanten Therapie im Einsatz. Bei einem Kolonkarzinom im Stadium UICC III wird postoperativ für einen Zeitraum von sechs Monaten mit Floururacil, Folinsäure und Irinotecan (FOLFIRI) oder alternativ mit Oxaliplatin (FOLFOX) nachbehandelt. Bei einem fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom ist eine Chemotherapie nur noch palliativ, d.h. sie kann lediglich das Auftreten von Rezidiven hinauszögern. Eine Radiotherapie oder Radiochemotherapie wird bei Rektumkarzinomen im Stadium UICC II und III postoperativ durchgeführt. In einigen Fällen wird dabei auch mit einer Chemotherapie kombiniert.

Palliative Therapie

Die palliative Therapie im operativen Bereich dient der Vermeidung von Komplikationen, wie zum Beispiel einem Ileus oder Blutungen bei Tumoren eines fortgeschrittenen Stadiums. Eine Tumordestruktion mittels LASER und Kryochirurgie ist möglich. Ebenfalls werden bei nicht resektablen Metastasen Bestrahlungen und Chemotherapien durchgeführt.

Probleme der klassischen Therapien

Neben den klassischen Risiken eines operativen Eingriffes unter Vollnarkose kann es zu vielen weiteren Komplikationen und erheblichen Lebensqualitätseinschränkungen kommen. Zu den häufigsten Komplikationen gehören die Entstehung eines Ileus oder einer Invagination.

Ebenfalls kommt es häufig zu Fistelbildungen an Nachbarorganen, zu Perforationen und durch Kompression zu einer Ureterstenose. In 5 - 10% kann es zu einer Nahtinsuffizienz der Anastomose kommen und in 15 - 40% klagen die Patienten über sexuelle Dysfunktionen und eine Blasenlähmung aufgrund der Beschädigung des Plexus pelvinus. 20 - 40% der operierten Patienten bekommen innerhalb der ersten zwei Jahre ein Rezidiv. Die in der Chemotherapie verwendeten aggressiven Zytostatika und auch die Radiotherapie führen gerade bei älteren, onkologischen Patienten zu ausgeprägten Nebenwirkungen und Problemen (Übelkeit, Kachexie, Kreislaufbeschwerden, etc.), die aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der Patienten schwierig zu kontrollieren sind.^{10,11}

2.2 Die Gentherapie im Allgemeinen

2.2.1 Gentherapie und Gentechnologie

Bei der Gentherapie und Gentechnologie handelt es sich um eine bislang experimentelle Therapieform, die sich mit der Entwicklung sowie der technologischen, diagnostischen und therapeutischen Nutzung von Methoden zur Übertragung definierter DNA-Fragmente, also dem Gentransfer, mit bekannter genetischer Information aus Zellen eines Organismus in den anderen befasst. Man unterscheidet die somatische Gentherapie von der Keimbahntherapie. Letztere ist in Deutschland verboten, da sie auf Ei- und Samenzellen zugreift. Die somatische Gentherapie bleibt auf das Individuum beschränkt, da nur Körperzellen in ihrer genetischen Zusammensetzung verändert werden.

2.2.2 Transfer und Expression der Gene

Damit die Enzyme der Wirtszelle die fremde DNA-Sequenz ablesen können, muss die zuvor isolierte DNA-Sequenz unter bestimmten Bedingungen in die Zelle eingeschleust und biologisch aktiviert werden. Es werden zwei Verfahren somatischer Gentherapie unterschieden:

Beim *ex vivo*-Verfahren werden dem Patienten somatische Zellen entnommen, mittels Zellkultur vermehrt und genetisch verändert. Anschließend werden diese Zellen dem Patienten injiziert oder reimplantiert. Im *in vivo*-Verfahren wird das therapeutische Gen dem Körper des Patienten direkt zugeführt. Es werden Vektoren (Genfähren) benötigt, damit das therapeuti-

sche Gen seinen Wirkungsort erreicht. Das *in vivo*-Verfahren ist lokal oder systemisch möglich. Es gibt verschiedene Methoden, um ein therapeutisches Gen in eine Zelle zu transportieren (Transfektion). Für die Transfektion werden einerseits physikalisch-chemische Methoden eingesetzt, hierzu zählen die Behandlung der Zellen mit Calciumphosphat, die Mikroinjektion der DNA-Lösung sowie der Einsatz von Liposomen. Diese bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, die die zu transportierenden Gene einschließt. Bei der Elektroportation wird das therapeutische Gen mittels eines starken elektrischen Feldes in die Zelle geschleust. Ebenfalls ist ein rezeptorvermittelter Gentransfer möglich, bei dem die einzuschleusende DNA an ein Protein gekoppelt wird, das an komplementäre Rezeptoren der Zielzelle bindet, welche die Aufnahme in die Zelle vermitteln. Andererseits werden Bakteriophagen, geeignete Plasmide und defiziente Viren als Transportvehikel genutzt. Vor allem der Einsatz viraler Vektoren hat sich in den letzten Jahren aufgrund der guten Erfolge sehr etabliert.¹² Die folgende Auflistung bietet eine Übersicht über die häufigsten verwendeten viralen Vektoren:

Adenoviren (DNA-Viren)

Das therapeutische Gen liegt hier bereits als DNA vor. Sie sind in der Lage, ein breites Spektrum sich nicht teilender Zellen zu infizieren. Eine 7-8kb hohe Geninsertion ist möglich bei einer ebenfalls sehr effizienten Genexpression. Das Adenovirus integriert die eigene DNA nicht ins Wirtsgenom, somit ist keine Langzeitexpression möglich. Bei der Transfektion wird die wirtseigene Immunantwort gegen virale Partikel allerdings derart erhöht, dass bei einer wiederholten Applikation mit einer Immunreaktion des Wirtorganismus zu rechnen ist.

Adenoassoziierte Viren

Im Gegensatz zu Adenoviren integrieren sie ihr Genom in das Wirtsgenom und sind nicht pathogen oder toxisch für den menschlichen Organismus. Sie verfügen jedoch über ein begrenztes Fassungsvermögen (4kd) und können neben einer möglichen Kontamination mit einem Adenovirus zur malignen Transformation der transfizierten Zelle führen.

RNA-Viren

Diese Viren verfügen über ein großes Fassungsvermögen und sind in der Lage viele Zelltypen zu infizieren, jedoch baut sich die RNA innerhalb der Zelle schnell ab, da sie nicht in DNA umgeschrieben werden kann.

Retroviren

Sie verfügen über einen breiten Zelltropismus und sind nicht pathogen für den Wirtsorganismus. Sie integrieren ebenfalls ihr Genom in das Wirtsgenom und bieten damit eine stabile Genexpression. Retroviren benötigen zur Infektion teilungsaktive Zellen (keine Neuronen). Sie besitzen sehr instabile Virusgenome und können während ihres Vermehrungszyklus zur malignen Transformation der Wirtszelle beitragen. Ebenfalls kann es zur Rekombination mit endogenen humanen Retroviren kommen.

Das Ziel bei der Herstellung eines Transportvektors ist es, durch Schneiden der Vektor-DNA und der isolierten DNA mittels sequenzspezifischen Endonucleasen und Restriktionsenzymen zwei kohärente Enden entstehen zu lassen, die durch spezifische Enzyme verknüpft werden können. Mit der Möglichkeit mittels Vektoren gewünschte DNA-Abschnitte zur Genexpression in die Wirtszelle zu transformieren, ergeben sich verschiedenste Anwendungsmöglichkeiten der Gentechnologie, wie die Herstellung therapeutisch wichtiger Substanzen (Insulin), die diagnostische Strukturanalyse der DNA in der genetischen Beratung, die Möglichkeiten der Keimbahntherapie sowie der somatischen Behandlung von infektiösen, malignen, hereditären, vaskulären und degenerativen Erkrankungen. Die vorliegende, präklinische Arbeit beschäftigt sich im Rahmen der Gentherapie mit der Behandlung somatischer, maligner Erkrankungen bezogen auf das kolorektale Karzinom. Es soll der Nachweis der Realisierbarkeit einer *in vitro* Infektion von humanen Kolonkarzinom-Biopsien mit den adenoviralen Vektoren Ad-3rhIL-12 und Ad.3r-Luc dargestellt werden; darüber hinaus sollte die damit verbundene Expression und Genregulation der Transgenprodukte Interleukin-12 und Luciferase demonstriert werden.

Erste Anwendung der Gentherapie am Patienten

Am 14. September 1990 wurde von den Ärzten des US-amerikanischen Bundesgesundheitsinstitutes an einem vierjährigen Mädchen die weltweit erste gentherapeutische Behandlung durchgeführt. Die Patientin leidet an einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID), eine sehr seltene Krankheit, verursacht durch einen schweren Defekt sowohl des T- als auch des B-Lymphozytensystems. Bei der Patientin ist das Immunsystem in seiner Funktion erheblich bis vollständig eingeschränkt. Der Patientin wurden Stammzellen aus dem Knochenmark entnommen, aus denen das relevante Gen isoliert und in das Genom eines Leukämie-Virus integriert wurde. Das modifizierte Virus wurde der Patientin injiziert. Die Gentherapie, die

aufgrund der kurzen Lebensdauer der Leukozyten mehrmals im Jahr wiederholt werden muss, ermöglicht der Patientin ein Leben ohne strikte Quarantäne. Der Gentherapie der Patientin ging ein dreijähriges Genehmigungsverfahren voraus. In der folgenden Zeit traten bei gentherapeutisch behandelten Kinder mit SCID immer wieder Fälle von Leukämien auf, was zum Abbruch der Studie führte.^{13,14,15,16,17}

2.2.3 Richtlinien und Gesetze zur Regelung der Gentechnologie und Gentherapie

2.2.3.1 Gentechnologie

In der amerikanischen Asilomar-Konferenz wurden 1957 die Grundprinzipien festgelegt, die noch heute für die Sicherheitsstandards der deutschen Gentechnologie Gültigkeit haben. Sie regeln die Einstufung und Anwendung genetischer Forschung entsprechend dem Gefährdungspotenzial. 1978 erfolgte in Deutschland die Einführung der Genrichtlinien (Richtlinie zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro* neukombinierte Nucleinsäuren in der BRD). Es folgte im Jahre 1990 die Ersetzung dieser Richtlinien durch das deutsche Gentechnikgesetz (Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik). Aufgrund der großen Zahl von Ergänzungen, die im Laufe der Zeit hinzugefügt wurden, wurde das Gesetz 1993 novelliert.

Nach § 1 des Gentechnikgesetzes in der Fassung vom 16. Dezember 1993 erfüllt dies den Zweck, vor schädlichen Auswirkungen gentechnischer Verfahren und Produkte zu schützen und Vorsorge gegen das Entstehen solcher Gefahren zu treffen. Zudem soll das Gesetz die Möglichkeit gewährleisten, auch Produkte, Futtermittel und Lebensmittel unter Einsatz von genetisch veränderten Organismen zu erzeugen und in den Verkehr zu bringen. Schließlich soll es auch einen rechtlichen Rahmen für die Erforschung, Entwicklung, Nutzung und Förderung der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Möglichkeiten der Gentechnik schaffen. Dem Anwendungsbereich des Gentechnikgesetzes unterliegen gemäß § 2 gentechnische Anlagen, gentechnische Arbeiten, die Freisetzung von genetisch veränderten Organismen und das Inverkehrbringen von Produkten, die genetisch veränderte Organismen enthalten oder aus solchen bestehen. Das Gentechnikgesetz gilt nicht für die Anwendung gentechnisch veränderter Organismen am Menschen. Es erfasst lediglich gentechnische Arbeiten mit einzelnen

menschlichen Zellen oder Zellkulturen im Labor, nicht jedoch deren Übertragung auf den Menschen. Auf europäischer Ebene wird die Gentechnik der gesamten Mitgliedsstaaten über zwei wesentliche Richtlinien bestimmt: Hierbei handelt es sich um die Richtlinie über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen (90/219/EWG) und die Richtlinie über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt.

Sicherheitsstufen bei genetischen Arbeiten

Da dem deutschen Gentechnikrecht der Schutzgedanke zu Grunde liegt, werden aufgrund der definierten Ziele Gesundheitsschutz, Arbeitsschutz und Schutz der Umwelt gentechnische Arbeiten in vier Sicherheitsstufen eingeteilt:

- Sicherheitsstufe 1: Gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.
- Sicherheitsstufe 2: Gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.
- Sicherheitsstufe 3: Gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem mäßigen Risiko für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.
- Sicherheitsstufe 4: Gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem hohen Risiko oder dem begründeten Verdacht eines solchen Risikos für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen ist.

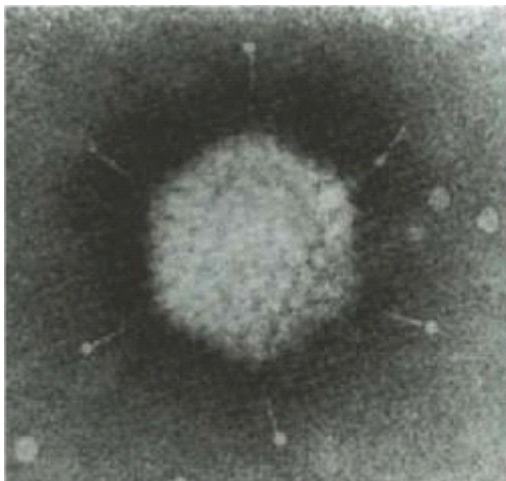
2.2.3.2 Gentherapie

Das Embryonenschutzgesetz vom 1. Januar 1991 verbietet künstliche Veränderungen menschlicher Keimbahnen generell. Damit hat der Gesetzgeber ethischen und verfassungsrechtlichen Bedenken Rechnung getragen. Für die so genannte somatische Gentherapie, die nur Körperzellen erfasst, gibt es derzeit keine spezifischen gesetzlichen Regelungen. Die somatische Gentherapie fällt als solches nicht unter das Gentechnikgesetz, anders die notwendigen Vorarbeiten, wie z.B. die Erzeugung gentechnisch veränderter Zellen. Die Anwendung

am Menschen unterliegt den Richtlinien des ärztlichen Heileingriffes und den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Gentherapie (1998). Jede Behandlung bedarf außerdem der Zustimmung einer Ethikkommission. Da sich die somatische Gentherapie als medizinische Heilmethode derzeit noch im Versuchsstadium befindet, sind jedoch die Regelungen über Therapievorsuche des Arzneimittelgesetzes anwendbar.¹⁸ Die Experimente der vorliegenden Arbeit, die Übertragung von gentechnisch veränderten Organismen auf menschliches Restbiopsiematerial, erforderten eine Zurkenntnisnahme der Ethikkommission. Die gentechnischen Arbeiten und Experimente wurden durchgehend in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

2.3 Das Adenovirus

Die Adenoviridae wurden 1953 von Rowe und seine Mitarbeitern als „latent persistierende“



Agentien in Tonsillen und adenoiden Geweben entdeckt. 1954 entdeckten Hilleman und Werner unabhängig davon das Adenovirus als Erreger von akuten Infektionen der Luftwege. Die insgesamt 41 Typen der Adenoviren können sehr verschiedene Krankheitsbilder verursachen. Bedeutsam sind die „grippalen Infekte“ der oberen und unteren Atemwege, die Augeninfektionen und die intestinalen Infekte.

Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus

(Quelle: Dr. A. Cann, University of Leicester, Großbritannien, Horwitz 2004)

2.3.1 Aufbau

Die Adenoviridae sind isosaedrische Viren mit einem Durchmesser von circa 60-90nm und 252 Kapsomeren. Sie besitzen antennenartige Fortsätze mit verdickten Enden an den Scheitelpunkten, die auch Fibern genannt werden und zur Anheftung an die Wirtszelle dienen. Adenoviren verfügen wie viele andere Viren über keine lipide Hüllmembran und weisen deshalb eine hohe Tenazität gegenüber Desinfektionsmitteln auf.

Adenoviren werden in zwei Gattungen unterteilt: Die Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind.

(I) Mastadenovirus	(II) Aviadenovirus
Mensch: Subgenera A-F Adenovirus Typ 1-47	Tier: Geflügeladenoviren Typ 1-12
Tier: Adenovirus des Hundes Typ 1,2 Equines Adenovirus Rinderadenovirus Typ 1-9 Adenoviren der Schweine	

Tabelle 1: Einteilung der Adenoviren

Für die Klassifizierung und die Diagnostik sind die Kapsidproteine des Virus von entscheidender Bedeutung. Ihre immunologische Spezifität wird durch die Oberflächenproteine des Virus bestimmt. Die Kapsomere der Innenseite des Hexon sind allen Untergruppen gemeinsam, hierzu zählt das Genus-spezifische Antigen alpha, welches mittels ELISA oder Komplementbindungsreaktion die Unterteilung in Mastadenovirus oder Aviadenovirus ermöglicht. Die Serotyp-spezifischen Antigene liegen auf der Außenseite des Hexons und das ebenfalls diagnostisch bedeutsame Antigen μ in den Fibern. An den 12 Scheitelpunkten des Virions befinden sich weitere Kapsidproteine (Pentabasis), die im Falle einer Infektion die Zytotoxizität bedingen.

2.3.2 Das Genom des Adenovirus

Adenoviridae enthalten eine lineare 36-39kbp große doppelsträngige DNA mit circa 35.000 Basenpaaren, die für etwa 50 Gene kodieren. Das Genom der Adenoviren wird in 100 Kartierungseinheiten unterteilt (map units, mu d.h. 1 mu = 360 NT). Anders als die meisten DNA-Viren kodiert das Adenovirus für basische, Histon-artige Proteine, so genannte Core-Proteine. Als Primer der viralen DNA-Replikation dienen die terminalen Proteine (TP), welche die Enden der viralen DNA kovalent verbindet.

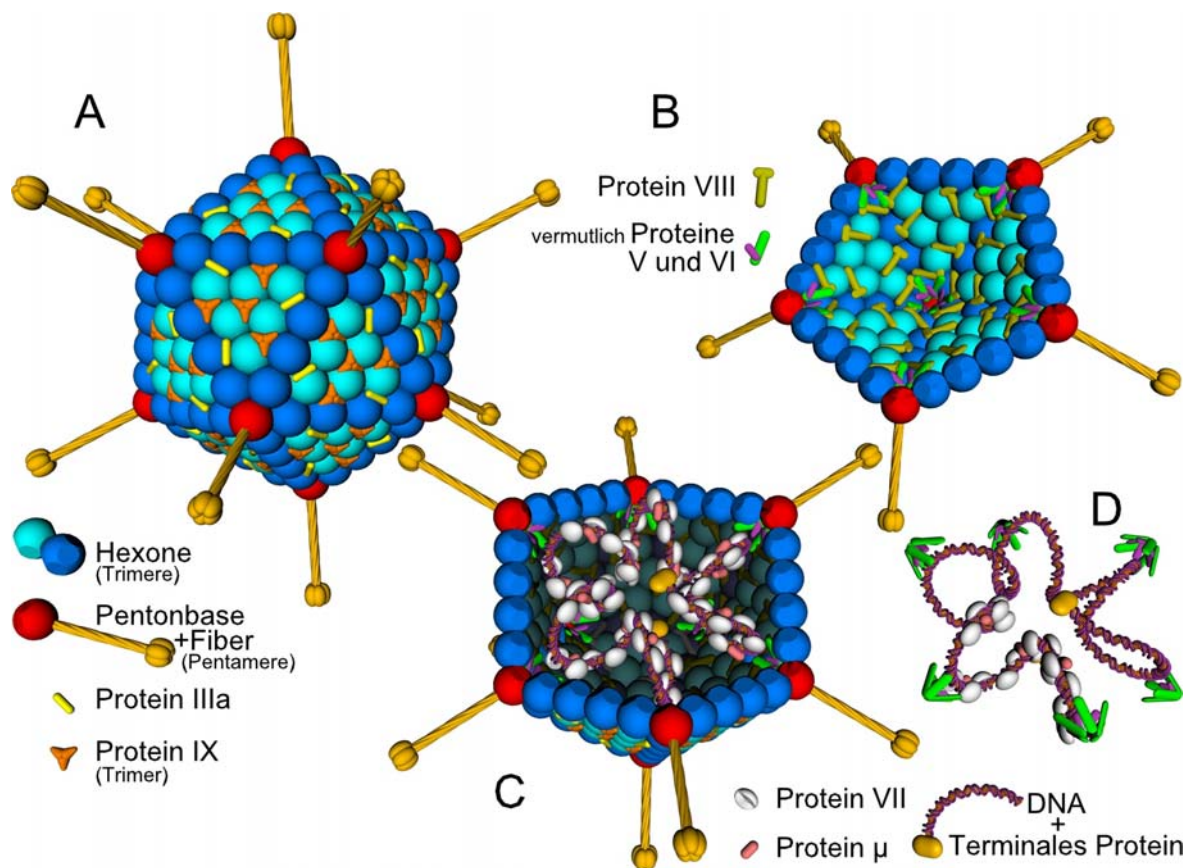


Abb.4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines adenoviralen Partikels

A, B: Anordnung der Kapselproteine (**A:** Außenansicht, **B:** Innenansicht). **C:** Integration des Virus-Kerns in der Kapsel. **D:** Anordnung der Kernkomponenten, (Modifiziert nach [Russel 2000](#), [Fabry 2005](#) und [Vellinga 2005](#), Quelle: Holger Wulff)

2.3.3 Replikativer Zyklus

Die Morphogenese der Adenoviren, bestehend aus Replikation, Transkription und der Virusreifung, findet im Zellkern statt. Translatiert wird die gespleißte RNA im Zytoplasma.

Anlagerung und Zellabsorbtion

Adenoviren benötigen 32-36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Virus an die Wirtszelle spielt die Wechselwirkung zwischen den viralen Fiberproteinen mit den spezifischen Zellrezeptoren (CAR). Nach der Anlagerung kommt es zu einer Interaktion zwischen Pentonbasisproteinen und den zellulären Integrinen. Anschließend wird das Viruspartikel über clathrinbedeckte Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt. Durch eine Ansäuerung im Endosom kommt es zu einer Konformati-

onsänderung der viralen Capsidproteine, wodurch das „Uncoating“ und somit die Freisetzung des Virus-Core in das Zytoplasma erfolgt. Erleichtert wird der Transport der Core in den Nukleus durch „nuclear localization signals“ der Core-Proteine.

Genexpression

Die Genexpression unterteilt man in mehrere Phasen, bei der jede Phase die aufeinander folgende Expression viraler Gene umfasst, von denen einige für Transkriptionsregulatoren codieren.

- *Sehr frühe (immediate early) Genexpression:* In dieser Phase wird das erste adenovirale Gen, das E1A-Gen exprimiert. Das bei seiner Expression von Transkriptionsfaktoren gesteuerte E1A-Protein spielt bei der Aktivierung der Transkription der späteren frühen (delayed early) Gene (E1B, E2A, E2B, E3, E4) eine Rolle.
- *Spätere frühe (delayed early) Genexpression:* Die exprimierten Gene dieser Phase haben essentielle regulatorische Funktionen. Das E1B-Protein unterdrückt zum einen durch Komplexbildung das E1A-Protein und schützt die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau. Die zelluläre RNA-Translation wird gehemmt, wohingegen die späte (late) Genexpression beschleunigt wird. Proteine der E4-Region regulieren die replikationsaktivierende E2-Region.
- *Replikation:* Die 24 Stunden dauernde Replikation des Genoms beginnt etwa sechs bis acht Stunden nach der Infektion und erreicht ihr Maximum nach etwa 18-20 Stunden. Die lineare doppelsträngige DNA des Virusgenoms weist an jedem Ende „inverted terminal repeats“ (ITR) von 100-165bp auf. An den 5'Enden der ITR sind kovalent E2-Terminal-Proteine gebunden, die als Primer zur Initiation der DNA-Synthese dienen. Diese erfolgt kontinuierlich durch E2-codierte DNA-Polymerasen in 5'-3' Richtung mittels Strang-Displacement. E2A-Proteine komplexieren den verdrängten DNA-Strang. Die entstandenen Einzelstränge werden durch invertierte terminale Wiederholungssequenzen des verdrängten Stranges komplementiert.
- *Späte (late) Genexpression:* In der späten Genexpression spielt der major late- Promotor (MLP) eine wichtige Rolle. Es werden große Mengen an langen RNA-Molekülen von der MLP-Transkriptionseinheit (MPLTU) produziert. Nach dem Spleißen besitzen alle eine identische dreiteilige Leader-Sequenz. Diese RNA-Sequenzen codieren fast

alle für Strukturproteine des Cores und des Capsid der Viren. Zwei weitere Promotoren sind in der späten Phase aktiv. Der IVa2- Promoter liefert VA-RNA-Moleküle für die Translation, während der IX-Promotor für ein Peptid codiert, welches speziell für die Herstellung von rekombinanten Adenoviren als viralen Vektor von Wichtigkeit ist.

Virusreifung

Es entstehen 10^4 bis 10^5 Viren pro Zelle, die bereits im Zellkern zusammengebaut werden. Da virale Faktoren die Synthese zellulärer Proteine und die Supprimierung zellulärer Faktoren zur Unterdrückung der Virusproduktion verhindern, wird in einem Prozess von 30-40 Stunden der Zelltod der Wirtszelle eingeleitet. Die Wirtszelle lysiert und setzt somit neusynthetisierte Virionen frei.

2.3.4 Gentransfer mittels viraler Vektoren

Seit ein paar Jahren werden neben Bakteriophagen und Plasmiden bevorzugt Viren als Vehikel für den Gentransfer eingesetzt. Adenoviren sind in Lage, ein breites Spektrum auch sich nicht teilender Zellen zu infizieren. Eine Geninsertion ist im Bereich von 7-8kb möglich und durch Deletion essentieller Teile bis zu 30kb erweiterbar. Das therapeutische Gen liegt bereits als DNA vor und kann direkt, ohne enzymatischen Umbau, in das DNA-Genom des Adenovirus integriert werden. Das Adenovirus integriert seine Virus-DNA nicht ins Wirtsgenom, somit ist keine Langzeitexpression des therapeutischen Gens möglich, welche bei einer antitumoralen Behandlung auch nicht wünschenswert ist. Ebenfalls besteht damit kein Risiko für eine weitere Tumorinduktion durch eine maligne Transformation der Zielzelle, die bei einer adenoassoziierten oder retroviralen Transfektion nicht auszuschließen ist. Bei der Transfektion wird die wirtseigene Immunantwort gegen virale Partikel allerdings derart erhöht, dass die Transduktion und die Expressionsdauer vermindert wird, welche jedoch durch eine hohe transiente Genexpression des adenoviralen Vektor kompensiert wird.^{19,20,21}

In der onkologischen Gentherapie gibt es mehrere Ansätze für den Wirkungsbereich eines therapeutischen Gens. Adenovirale Vektoren werden mit unterschiedlichen Transgenen rekombiniert, welche alle über verschiedene Aktivierungswege letztendlich zur Vernichtung der Tumorzelle führen sollen. Hier seien nur die wichtigsten aufgeführt.

Suizidtherapeutische Ansätze

Suizid-Gene kodieren für Enzyme, die ein Medikament in eine hoch toxische Substanz

umwandelt, welche die transferierte Tumorzelle zum programmierten Zelltod (Apoptose) veranlasst.

Therapeutischer Einsatz von Tumorsuppressorgenen

Tumorsuppressorgene wie z.B. p53 sollen in der transferierten Tumorzelle die Funktion des defekten oder mutierten Genom-eigenen p53 übernehmen und somit ebenfalls zur Apoptose führen.^{22,23}

Cytokintherapeutische Ansätze

Ein Transgen, welches für ein Zytokin bzw. Interleukin (IL-2, IL-7, IL-12, IL-18) kodiert, wird in die Tumorzelle transferiert und stimuliert als körpereigenes Protein eine antitumorale Immunantwort. In anderen Studien wurde eine Immunantwort mit der Injektion tumorspezifischer Antigene provoziert.²⁴

Probleme der adenoviralen Gentherapie

Adenoviren exprimieren in der transferierten Tumorzelle neben dem therapeutischen Gen auch die eigenen Gene. Die adenoviralen Proteine führen nach Kontakt zu einer Immunisierung des Patienten, was den wiederholten Einsatz von Adenoviren bis dato nicht möglich macht. Auch die Wahl des therapeutischen Genes stieß immer wieder auf Probleme. Suizidtherapeutische Ansätze und der Einsatz von Tumorsuppressorgenen zeigen eine sehr limitierte Wirkung in der Tumorzelle. Cytokintherapeutische Ansätze hingegen zeigen bisher *in vitro* sehr gute Wirkungen und Erfolge. In früheren klinischen Studien zeigten sich vor allem Probleme in der Transduktionseffizienz. Bei einer durchschnittlichen Transduktionsdifferenz von 5-10% waren die Effekte der exprimierten therapeutischen Genprodukte sehr gering.^{25,26} Um den Risiken und Komplikationen der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, wird derzeit an adenoviralen Vektoren der dritten Generation geforscht. Diese Vektoren bestehen nur noch aus der Virushülle und den DNA-Sequenzen an den Enden des Virus, die den herkömmlichen Adenoviren entsprechen. Diese so genannten „gutless“ Viren sind somit nicht toxisch und besitzen eine sehr hohe Kapazität, therapeutische Gene aufzunehmen. Herkömmliche, derzeit verwendete adenovirale Vektoren können ca. sieben bis acht kb therapeutische DNA aufnehmen, der „gutless“ Vektor hat dagegen eine Kapazität von bis zu 36kb.^{27,28} Ein weiteres Problem stellte die Expressionssteuerung von hoch toxischen Genprodukten (Zytostatika, Interleukine) dar. Da jedes Gewebe bzw. jeder Patient anders auf die Transfektion anspricht und die Genprodukte möglicherweise gesundes Gewebe mitschädigen, ist es unbedingt von Nöten, die Expression der Transgene regulieren zu können.

2.3.5 Die verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren

Den generierten rekombinanten, replikationsdefizienten Adenoviren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc wurde die replikationsbedeutende E1-Region aus dem Genom entfernt. In der E1 Region befindet sich nun die autoregulierbare Tetracyclin-abhängige Expressionskassette und das therapeutische Gen. Sie wurde mittels der Expressionsplasmide pAd.3rhIL-12 und pAd.3r-Luc in das Virusgenom rekombiniert. Die zusätzliche Deletion der E3-Region senkt die Wahrscheinlichkeit der Rekombination mit einem endogen humanen Wildtypus, mit dem ein Patient, bzw. die humane Biopsie koinfiziert sein könnte. Die hohe Genexpression der beiden adenoviralen Vektoren wird durch einen VP16 Herpes simplex Promotor erreicht. Die Möglichkeit der starken Regulation der Transgen-Expression wurde durch die Fusion des VP16-Promotors mit einem Tetracyclin-Repressor erreicht, indem eine Bindung des Fusionsproteins an den flankierenden Tetracyclin-Operator stattfindet. In Anwesenheit von Tetracyclin oder eines Derivates bleibt der Promoter inaktiv und die Transkription wird nicht initiiert.²⁹ Zur Generierung der rekombinanten Viren werden spezielle Zelllinien von transformierten Nierenepithelien (293-Zellen) mit zwei verschiedenen Plasmiden koinfiziert. Ein Plasmid besteht aus dem unvollständigen Genom des Virus, das andere trägt das therapeutische Gen und einen kleinen Teil des Virus-Genoms. Bei einer Koinfektion einer 293-Zelle mit beiden Plasmiden kann es durch Cross-over (Austausch genetischer Information) zu einer Rekombination kommen. Dabei generieren sich rekombinante E1-und E3-deletierte Adenoviren.

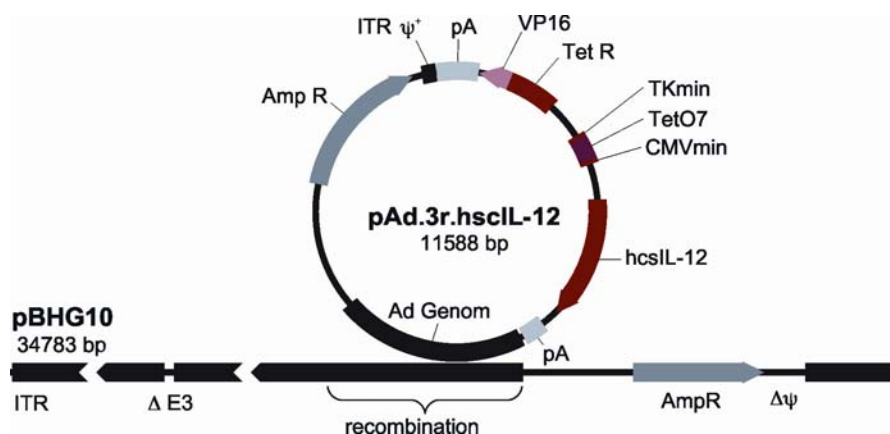


Abb.5: Aufbau des verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektors.³⁰

Ad.3r-hscIL12

Der Ad.3r-hscIL12 codiert für das therapeutische Gen. Er ermöglicht eine Genexpression auf einem sehr hohen Level von bioaktiven Interleukin-12. Die hohe Genexpression beruht auf dem leistungsstarken VP16 Promotor und der Ausstattung mit einem Bicistronic-Promotor-Konstrukt. Die Struktur des Heterodimers Interleukin-12, bei der die Untereinheiten p35 und p40 von verschiedenen Chromosomen codiert und deren Expressionen auf verschiedenen Wegen kontrolliert werden, kompliziert die Rekombination von Expressionseinheiten. Es wurden verschiedene Taktiken verfolgt, um eine erfolgreiche Expressierung des bioaktiven Heterodimers sicher zu stellen. Bei nicht aquimolarer Expressierung der beiden Untereinheiten können sich p40 Homodimere bilden und die Wirkung des Heterodimers antagonisieren. Um die Homodimerbildung zu vermeiden, wird ein aus Aminosäuren bestehender Linker exprimiert, an dessen Enden die cDNA der beiden Untereinheiten gekoppelt sind. (Kap. 5.5.2)

Ad.3r-Luc

Der Ad.3r-Luc codiert für das vom Transaktivator kontrollierte Reportergen Luciferase. Luciferase ist ein Enzym, das ursprünglich aus der cDNA des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) stammt. Die in den Versuchen verwendete Luciferase-cDNA ist ein modifiziertes Reportergen, bei dem es zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des nicht mehr glycosidischen 62kDa Proteins kommt. In der transfizierten Zelle katalysiert die exprimierte Luciferase unter Lichtemission (562nm) die oxidative Decarboxylierung von D-(-)Luciferin.³¹ Die Lichtemission ist in einem Bereich von 8 Log-Stufen linear und kann in einem Luminometer quantifiziert werden. Da diese Messung sehr sensitiv ist, erlaubt diese in der vorliegenden Arbeit eine valide Aussage über die Transfektionseffektivität.

Ad.RSV.β-Gal

Im Genom des Ad.RSV.β-Gal wurde die E1-Region gegen die genetische Kodierung des Enzyms β-Galaktosidase ausgetauscht. Das Enzym β-Galaktosidase katalysiert die glycosidische Bindung in X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosidase) zu 5-bromo-4-chloro-indoxyl. Unter aeroben Bedingungen (Oxidation) dimerisiert diese Verbindung zu einem unlöslichen blauen Farbstoff. In der vorliegenden Arbeit können durch Infektion der HT29-Zellen und der Gewebeproben mit Ad.RSV.β-Gal die transfizierten Zellen durch Expression des farbigen Genproduktes direkt erkannt werden.

2.3.6 Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR)

Adenovirale Vektoren besitzen auf ihrer Hülloberfläche „Antennenmoleküle“ (Fiberproteine), mit deren Hilfe sie die Zelloberfläche nach dem passenden Gegenstück, dem CA-Rezeptor, absuchen. Je mehr CAR-Moleküle auf der Zelloberfläche vorliegen, desto effizienter ist der Gentransfer des Adenovirus in die Zelle.

Der CA-Rezeptor ist ein 46 kDa schweres Typ I Membranprotein, dessen extrazellulärer Bereich eine kurze N-terminale Signalsequenz und zwei immunoglobulinähnliche Domänen enthält. Ein 22 Aminosäuren langes alpha-helicales Transmembranprotein verankert den Rezeptor in der Zellmembran. Der intrazelluläre Bereich besteht hauptsächlich aus Signalsequenzen. Die Absorption des Adenovirus an die Zielzelle erfolgt durch die Interaktion des Kopfes des Fiberproteins an den CA-Rezeptor.³² Im nächsten Absorptionsschritt interagiert die Pentabasis durch ein Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) Motiv mit dem alpha-Integrin der Zielzelle. Mediert durch Clathrin und dem coated pits Pfad, internalisiert der Partikel anschließend im Endosomen. Dabei sorgt das saure Milieu für eine stufenweise Degradierung des Partikels, die durch die viruseigene Protease unterstützt wird. Im Zytoplasma, nach Freisetzung aus dem Endosom, erfolgen der Transport zum Nukleus und der Eintritt in das Genom. Die Transkription der frühen Gene beginnt eine Stunde nach Infektion.^{33,34} Da der CA-Rezeptor auf sehr vielen verschiedenen Zelltypen vorhanden ist, erfolgt bei systematischer Gabe auch der Gentransfer in verschiedenste Zelltypen und Organe. In der vorliegenden Arbeit soll nachgewiesen werden, dass Kolonkarzinom-Zellen in der Regel eine hohe Dichte von CAR auf ihrer Zellmembran besitzen und sich somit zum adenoviralen Gentransfer eignen. Dazu wurden einzelne Biopsien immunhistochemisch mit Anti-CAR-Antikörpern aufgearbeitet und gefärbt.

2.4 Regulierbare Genexpression mittels Tetracyclinen (Transaktivatoren)

Die experimentelle Kontrolle über die Expression eines Gens ist unabdingbar zum Verständnis seiner Wirkungsweise und ebenfalls als Sicherheitselement unverzichtbar. In adenoviralen Systemen wurden verschiedene Ansätze zum Erzielen einer regulierbaren Genexpression verfolgt, wie zum Beispiel die Verwendung von Zinkionen³⁵, Antiprogesteron Mifepriston³⁶ und Rapamycin.³⁷ Vor allem in eukaryontischen Zellen hat sich das bakterielle Tet-System zu einer potenten Regulationsmöglichkeit der Genexpression etabliert. Die Effizienz dieses Sys-

tems erklärt sich aus der hohen Affinität und Spezifität, mit dem der Tet-Repressor seine Liganden bindet und aus dem universell zellgängigen Induktor Doxycyclin. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Adenviren Ad.3r-Luc und Ad.3r-hscIL-12 sind mit einem tetracyclinregulierten Genexpressionssystem zur Steuerung der Transgene ausgestattet.

2.4.1 Prokaryontischer Ursprung

Die Resistenz gegen Tetracycline ist bei Bakterien weit verbreitet und weist einige Besonderheiten auf. Der aktive Transport eines Antibiotikums aus der resistenten Zelle durch einen membranständigen Proton-Tetracyclin-Antiporter ist ein weit verbreiteter Mechanismus in gram-negativen Bakterien. Der regulative Mechanismus erfolgt auf Ebene der Transkription durch den Tet-Repressor (TetR), dem Resistenzgen *tetA* und dem Regulatorgen *tetR*. In gram-positiven und gram-negativen Bakterien wurden starke Promotoren unter Tet-Kontrolle gebracht und erfolgreich zur Überproduktion therapeutisch relevanter Proteine eingesetzt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System basiert auf dem Tetracyclin-Resistenzoperon des *E.coli*. Das Bakterium ist hiermit in der Lage durch die Expression eines TetA-Proteins tetracycline Antibiotika mittels Antiporter und Protonenaustausch auszuschleusen.

2.4.2 Anwendung des Tet-Systems in eukaryontischen Zellen

In eukaryontischen Zellen wurde das Tet-System das erste Mal für die exogene Regulation in Pflanzen verwendet, indem die TATA-Box mit drei *tet*-Operatoren flankiert wurde. Da diese Konstruktion bei Säugern und abgeleiteten Zellreihen nicht funktionierte, wurde ein Regulatorsystem entwickelt, in dem TetR als Doxycyclin-induzierbare, spezifische DNA –Bindeeinheit fungiert, die mit eukaryontischen Regulationseinheiten fusioniert wird. Somit entstehen Tetracyclin-abhängige Transaktivatoren (tTA). In eukaryontischen Zellen kam es zu einer Optimierung der Operatorbindung von TetR, da durch den evolutionären Druck die Basisexpression so gering wie möglich gehalten wird: Der spezifischen Bindekonstanten für den Operator steht eine geringe Affinität für unspezifische DNA gegenüber, so dass der TetR-Operator in wesentlich größeren Genomen als dem bakteriellen binden kann. Im Bakterium *Escherichia coli* wurde eine TetR-Mutante gefunden, die Doxycyclin zur Bindung an DNA benötigt. Die Bindung des Tetracyclins an TetR bewirkt die Expression des TetA-Proteins, dessen Multimere der inneren Membran einen Antiporter bilden und die Ausschleusung von Doxy-

cyclin-Mg²⁺ Komplexen im Austausch gegen ein Proton katalysieren. Die TetR-Sequenz des E.coli wurde für Säugetierzellen zugänglich gemacht, indem sie in einen CMV-Promotor sowie einen TK-Promotor eingefasst wurde. Der starke CMV-Promotor ist für das Transgen, also das therapeutische Gen, zuständig. Der TK-Promotor steht vor einem Hybridfusionsprotein (tTA) aus einer Bindungsdomäne des Tet-Repressor und der C-terminalen Domäne eines Transaktivators des Herpes Simplex Virus (Herpes Simplex Virus Protein V16).³⁸ Der TetR-Anteil des TetA Fusionsproteins bindet an sieben hintereinander geschaltete Operatorsequenzen: das Tetracyclin-responsible Element (TRE). Damit kann der V16 Anteil die Initiation der Transkription über einen minimalen CMV-Promotor starten. In Anwesenheit von Tetracyclin oder eines Derivates bleibt der Promoter inaktiv und die Transkription wird nicht initiiert. Da der einklonierte Aktivator tTA ist in der Lage ist, seine eigene Expression zu beeinflussen und somit die Transkription des Transgens, handelt es sich bei dem tetracyclinregulierten Genexpressionssystem um ein autoregulatives Expressions-System mit einem positiven Feedback-Mechanismus. In Anwesenheit eines Tetracyclins ist die Bindung des Aktivator-Proteins an den Operator nicht mehr möglich und verhindert die Transkription des therapeutischen Gens.^{39,40,41,42,43,44,45}

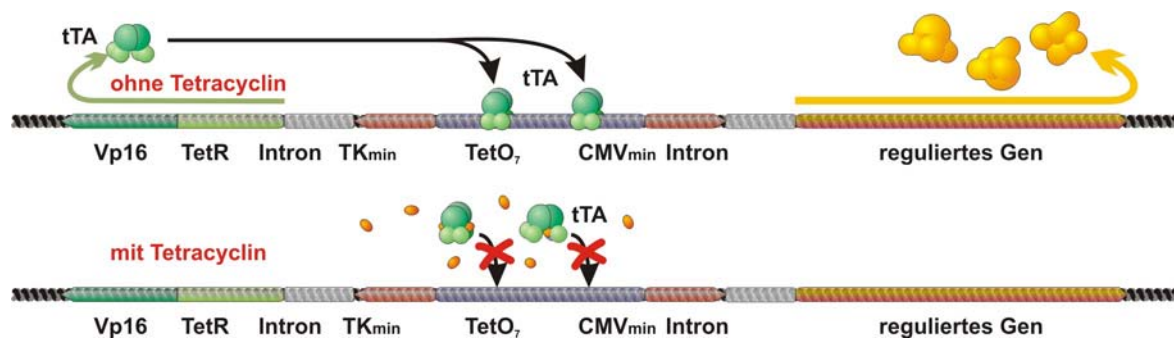


Abb.6: Funktionsweise des tetracyclinabhängigen autoregulativen Tet-Off-Systems

Der tetracyclinabhängige Transaktivator (tTA) bindet mit der TetR-Domäne an den heptameren Operator (TetO₇), so dass die VP16-Domäne des Fusionsproteins die Transkription über einen CMV_{min}-Promotors und einen TK_{min}-Promotors aktiviert. Durch Tetracycline werden die Bindung des Fusionsproteins und damit die Transkription reduziert. Quelle: Holger Wulff

2.4.3 Der Induktor Tetracyclin und seine Analoga

Von der Substanz Tetracyclin wurde eine Gruppe von Breitbandantibiotika abgeleitet. Neben Tetracyclin unterdrücken auch die Tetracyclinanaloga Minocyclin, Anhydrotetracyclin Oxytetracyclin und vor allem Doxycyclin die Transkription des Transgens sehr wirkungsvoll.⁴⁶ Es wurde gezeigt, dass Tetracycline, ohne ein Aufnahmesystem zu benutzen, durch passive Diffusion die Zytoplasmamembran von Bakterien und künstliche Membranen von Vesikeln durchdringen können. Es ist davon auszugehen, dass Tetracyclin in alle Zellen gelangen kann, die nicht von einer inerten Zellwand umgeben sind. Es bindet ein zweiwertiges Metallion und hemmt die Proteinbiosynthese der Zielzelle als einfach geladener Metallkomplex. Tetracycline besitzen eine ungewöhnliche hohe Affinität für TetR. Die Induktion muss also sehr effizient erfolgen, da das Antibiotikum auch die Expression des Resistenzgens induziert, d.h. die Synthese des Antiporter, bevor die Proteinsynthese beeinträchtigt wird. In der vorliegenden Arbeit wird durch das Analogikum Doxycyclin die Effizienz des induzierbaren Systems der rekombinanten Vektoren dargestellt. Doxycyclin besitzt in seiner Funktion als Antibiotikum ein breites Wirtsspektrum und zeigt eine bakteriostatische Wirksamkeit auf grampositive, gramnegative und zellwandlose Keime. Es wirkt gegen Plasmodium sp. und zeigt eine tuberkulostatische Wirkung. Somit wird Doxycyclin gezielt bei der Behandlung von Atemwegserkrankungen, Infektionen des Urogenitaltraktes, Infektionen Gastrointestinaltraktes, Gallenwegsinfektionen, Akne, Rosacea, Chlamydieninfektionen, Borreliose und zahlreichen seltenen Infektionen wie z.B. Pest und Milzbrand eingesetzt. Doxycyclin wird von der WHO und der deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und internationale Gesundheit e.V. (DTG) zur Malariaphylaxe empfohlen.

2.5 Das Zytokin Interleukin-12

Zytokine sind biologisch aktive Hormone, meistens Glycoproteine, die auf Zellen mit entsprechenden Rezeptoren verschiedenste biologische Effekte ausüben. Der Begriff Interleukine wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen. Alle Zytokine sind zellregulatorische Eiweiße mit einem Molekulargewicht unter 60000D, meistens noch über 25000D. Zytokine werden lokal produziert, haben eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden bis Minuten und sind in pikomolaren Konzentrationen wirksam. Interleukine entfalten meist mehrere gleiche oder unterschiedliche Wirkungen auf eine oder unterschiedliche Zellarten.

2.5.1 Immunbiologische Aufgaben des Interleukin-12

Im Falle der humoralen Immunsystem-Aktivierung sezernieren erst dendritische Zellen und anschließend Makrophagen, Monozyten und Neutrophile das Zytokin Interleukin-12. Bindet Interleukin-12 an den Zellrezeptor, bewirkt es zusammen mit IL-2 und IL-18 eine intrazelluläre Interferon- γ Ausschüttung. Proinflammatorisch werden dadurch natural-killer-cells und Makrophagen stimuliert und die Differenzierung von T-Helfer-Zellen aktiviert.

2.5.2 Aufbau und natürliches Vorkommen

Das heterodimere Protein Interleukin-12 ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut. Die zwei Ketten (35p und 40p), die die Struktur des Interleukin-12 bestimmen, sind durch Disulfidbrücken verbunden und stabilisiert. Sie sind anderen Zytokinen sehr ähnlich, wie zum Beispiel den Interleukinen 6,11 und 23. Der Interleukin-12-Rezeptor ist aus den Untereinheiten IL-12R β 1 und IL-12R β 2 aufgebaut. Im Falle der Bindung des Rezeptors dimerisieren die Rezeptor-Untereinheiten und setzen eine Signalkaskade, den JAK-STAT (Janus Kinase-Signal transducer and aktivator of transcription) in Gang.

2.5.3 Interleukin-12 in der antitumoralen Immunabwehr

Die von Tumoren gebildeten Antigene können von zytotoxischen T-Zellen erkannt und angegriffen werden. Außerdem können sich Killer-Zellen (nach Aktivierung durch Interleukine) und Makrophagen (nach Aktivierung durch Interferon- γ) an der Tumorbekämpfung beteiligen. Das humorale System kann durch Komplementaktivierung ebenfalls Tumorzellen schädigen. Somit kommt es bei immunologischen Defektzuständen auch zu einer erhöhten Inzidenz von malignen Erkrankungen. Eine antitumorale Immunität induziert das Zytokin Interleukin-12 vor allem durch die Aktivierung von CD4 und CD8-Zellen.^{47,48} Bewirkt durch die Interleukin-12 initiierte Ausschüttung von Interferon- γ , werden verschiedene antitumorale Aktivitäten in Gang gesetzt. Die aktivierten natural-killer-cells und zytotoxischen T-Lymphozyten bewirken eine Zytotoxizität gegenüber dem tumoralen Gewebe, während die ebenfalls durch Interferon- γ induzierten IP-10 (Protein) und MIG (Monokin) eine antiangiogenetische Wirkung auf den Tumor haben.⁴⁹ Das durch T-Zellen ausgeschüttete Interferon- γ stimuliert wiederum die NO-Synthase in Makrophagen, welche zur spezifischen antitumoralen Immunität beiträgt.⁵⁰

2.5.4 Nebenwirkungen des Interleukin-12 bei systemischer Applikation

Die lebensgefährlichen bis letalen Nebenwirkungen des Interleukin-12 bei Applikation zu hoher Dosen wurden in Tierexperimenten sowie in klinischen Studien bei Tumorpatienten beobachtet. Hier erfolgten die Interleukingaben jeweils systemisch. Neben den letalen Ausgängen bei einer Überdosierung an knock-out Mäusen⁵¹, kam es beim Menschen zur Lebensgefährdung durch hypovolämischen Schock bei hämorrhagischer Kolitis bzw. Sepsis, des Weiteren zu schweren ulzerierenden Kolitiden, Leukopenien, Hyperbilirubinämien, Transaminasenerhöhung, Abgeschlagenheit und Atemnot.⁵² Hierbei wurde die maximal zu tolerierende Dosis (MTD) für den Menschen von 0.5µg/Kg Körpergewicht deutlich überschritten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der letzten präklinischen Phase zur lokalen Anwendung von Interleukin-12 als therapeutisches Gen, welches einem regulierbaren Expressionssystem unterliegt. Im Tierexperiment stellt die lokale Applikation des Vektors Ad.3r-mscIL12 ein erfolgsversprechendes Konzept dar.⁵³

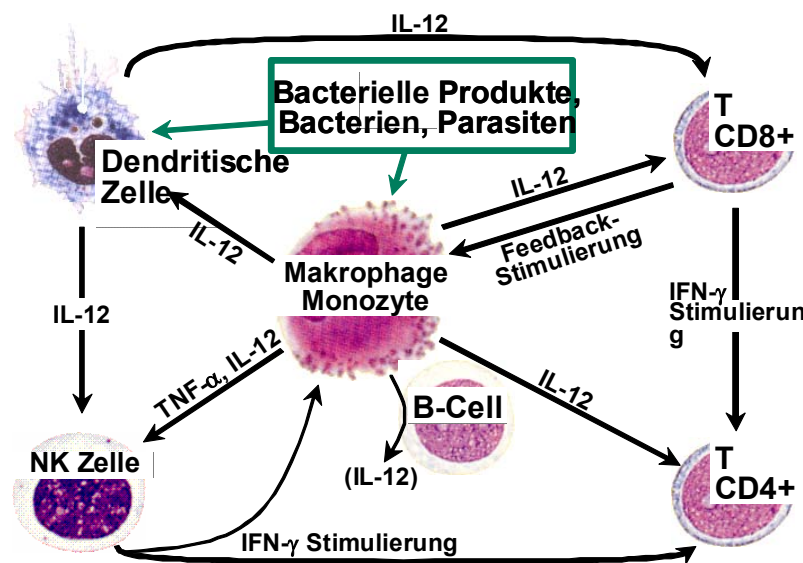


Abb.7: Die biologischen Wirkungen von IL-12 und IFN-γ

(NK-Zelle: Natürliche Killerzelle, IL12: Interleukin-12, IFN-γ: Interferon-gamma.)

2.5.5 Das Fusionsprotein p35/p40

Da die Untereinheiten p35 und p40 von verschiedenen Chromosomen codiert und deren Expressionen auf verschiedenen Wegen kontrolliert werden, kompliziert sich die Rekombination der Expressionseinheiten. Es wurden verschiedene Taktiken verfolgt, um eine erfolgrei-

che Expressierung des bioaktiven Heterodimers sicher zu stellen. Es besteht die Möglichkeit einer Cotransfektion von 2 Plasmiden, von denen jedes eine Untereinheit exprimiert⁵⁴, die Integration von 2 Expressionskassetten in ein Plasmid oder die Expression einer bi-cistronischen m-RNA, von der beiden Untereinheiten mit Hilfe einer „internal ribosome entry site“ (IRES) exprimiert werden.⁵⁵ Werden jedoch nicht beide Untereinheiten im gleichen Verhältnis exprimiert und zusammengesetzt, können sich p40 Homodimere bilden. Diese binden mit ähnlicher Affinität wie das Heterodimer an die Untereinheit $\beta 1$ des IL-12 Rezeptors und antagonisieren somit die Wirkung des Heterodimers. Ein Ausweg, der Homodimerbildung zu entgegen, liegt in der Expression von Fusionsproteinen. Die c-DNA der beiden Untereinheiten wird durch einen „Linker“ codierenden Abschnitt gekoppelt. Der Linker besteht aus bewusst gewählten Verbindungsaminoaciden, welche eine möglichst große Flexibilität in der Anordnung der Untereinheiten p35 und p40 zueinander erlauben.

2.5.6 Interferon- γ

Interferon- γ gehört mit Interferon- α , Interferon- β und dem Tumornekrosefaktor- α zu den antiinfektösen Zytokinen. Die folgende Auflistung bietet eine Übersicht der biologischen Aktivitäten, die ausschließlich von Interferon- γ vermittelt werden:

- Induktion von Immunglobulinen Fc-Rezeptoren
- Induktion von Klasse II-MHC-Molekülen
- Induktion der Monozytendifferenzierung
- Inhibition des Wachstums von intrazellulären Protozoen und Bakterien
- Aktivierung der Zytotoxizität gegen Tumorzellen und der antimikrobiellen Aktivität von Makrophagen
- Stimulierung der Synthese von Interleukin 1 und 2
- Stimulierung der Immunglobulinproduktion in unseparierten mononukleären Zellen

Alle Interferone wirken über Interferon-Rezeptoren. Während Interferon- α und - β wahrscheinlich über dieselben Rezeptoren auf die Zielzelle wirken, benutzt Interferon- γ einen anderen Rezeptor. Im Falle der Immunantwort ist der Rezeptorkomplex schnell internalisiert und auch wieder abgebaut. Die Internalisierung führt zu nuklearen Prozessen, die letztendlich eine Änderung des Zellphänotyps induziert. Im menschlichen Organismus sind

Fibroblasten, T-Lymphozyten und Makrophagen in der Lage Interferone zu produzieren. Wahrscheinlich sind alle Wirbeltiere in der Lage Interferone zu synthetisieren. Jedoch sind Interferone mit wenigen Ausnahmen speziesspezifisch aus der Tatsache heraus, dass die Interferon-Rezeptoren sich von einer Spezies zur anderen unterscheiden. Interferone entfalten im Organismus antivirale und antizelluläre Aktivitäten. Interferon- γ unterscheidet sich von Interferon- α und - β vor allem durch eine Labilität im sauren Milieu (bei einem pH um 2) und die eher antizelluläre als antivirale Wirkung. Für die vorliegende Arbeit sind die antizellulären Aktivitäten von besonderem Interesse. Interferon- γ ist hierbei schon in wesentlich geringeren Konzentrationen wirksam als INF- α und - β . Die wichtigste antizelluläre Wirkung, die vor allem INF- γ zugeschrieben wird, ist die Fähigkeit, das Wachstum von neoplastischen Zellen zu inhibieren. Im Zusammenspiel mit Lymphotoxin übt INF- γ einen sehr eindrucksvollen synergistischen Effekt aus. Es ist ebenfalls in der Lage bei einer großen Zahl von Zellen die Expression von Klasse-II-Molekülen des MHC zu induzieren, auch bei myelomonocytären Zellen, T-Lymphozyten, Mastzellen, Fibroblasten, Neuronen, Melanozyten und Zelllinien, die von malignen Geweben abstammen.. In Folge sind diese Zellen befähigt, den T-Lymphozyten Fremdantigene zu repräsentieren. Zu einer weiteren antizellulären und immunregulatorischen Aktivität des INF- γ gehört die Induktion oder Verstärkung der Expression von Fc-Rezeptoren auf normalen und neoplastischen myeloischen Zellen. Weiterhin ist INF- γ an der Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten beteiligt und induziert einen Anstieg der Aktivität von NK-Zellen. Es hat einen potenzierenden Effekt auf die Immunglobulinsekretion von B-Zellen in der späten Phase der Immunantwort *in vitro* sowie *in vivo* bei Interleukin 5. INF- γ ist in der Lage synergistisch mit Lymphokinen die Reifung ruhender B-Lymphozyten zu induzieren und aktiviert reife Neutrophile, Monozyten und Makrophagen. Ebenfalls inhibiert es die Migration von Makrophagen und ist identisch mit dem migrationsinhibierenden Faktor oder MIF. Es wird, wie oben beschrieben, infolge der Stimulation von Interleukin-12 durch T-Zellen und natürliche Killerzellen produziert.^{56,57}

2.6 Überblick zur viraler Gentherapie der letzten Jahre und aktueller Stand

Der medizinischen Wissenschaft stehen seit einiger Zeit durch die Entdeckung verschiedenster Vektoren und Transgene viele Gedankenansätze und Wege zur humanen Gentherapie offen. Nicht nur die Therapie von malignen Erkrankungen, sondern auch Autoimmunerkrankungen

kungen (Expression des Zytokin IL-4 bei rheumatoider Arthritis)⁵⁸, Stoffwechseldefekte (Gentransfer der Tyrosin-Hydroxylase bei M.Parkinson)⁵⁹ oder kardiovaskuläre Erkrankungen (β 2-Rezeptoren als Transgen bei ischämischer Herzinsuffizienz)⁶⁰ stehen im Interesse der Genforscher.

Das therapeutische Gen

Auf dem Gebiet der onkologischen Gentherapie gab es in letzten Jahren eine Expansion an gentherapeutischen Ansätzen *in vitro* sowie *in vivo*. Den meisten Ansätzen gilt der Versuch mittels eines viralen Vektors den Gentransfer eines Zytokins in malignes Gewebe zu ermöglichen. Verwendet wurden, vor allem in Kolonkarzinom-Zellen, verschiedene Interleukine wie z.B. IL-4 zur Förderung einer potenten tumorspezifischen Th1-Typs-Antwort in Kooperation mit einer Interferon- α Transduktion^{61,62} oder Interleukin 18⁶³ und die Interleukine 2 und 6.⁶⁴ Die Interleukin-12 vermittelte antitumorale Immunantwort wurde schon häufig in verschiedensten murinen Tumor-Modellen eindrucksvoll illustriert.^{65,66,67,68,69} In Studien mit systemischer Injektion von Interleukin-12 gab es immer wieder Probleme durch die enorme Toxizität des Zytokin, es kam immer wieder zu einer breiten und undifferenzierten Stimulation des zellulären Immunsystems mit fehlender Wirksamkeit. Die Toxizität wird hauptsächlich durch die Induktion des Interferon- γ bewirkt. Im Mausmodell wurde mit Anti-Interferon- γ -Antikörper der letale Effekt der systemischen Injektion eines rekombinanten Interleukin-12 aufgehoben.⁷⁰ In einer Phase II Studie mit systemischer Applikation von Interleukin-12, bei der auf eine einwöchige Pause nach der ersten systemischen Injektion verzichtet worden war, kam es zu massiven Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Studie führten.⁷¹ Weitere *in vivo* Studien konzentrieren sich auf die lokale Gabe des Interleukin-12, da dieser Ansatz sich auch im Tiermodell als überlegen herausgestellt hatte.⁷² So zeigt die intratumorale Injektion von Interleukin-12 im plasmiden Vektor eine signifikante Immunantwort in verschiedenen Tier-Modellen.^{73,74,75,76} Die intratumorale Injektion von adenoviralen Vektoren mit dem Interleukin-12-Transgen führte zu einer speziellen Immunität gegen Mamma-, und Kolonkarzinome.^{77,78} Verbessert wird dieses System durch die Expression einer bi-cistronischen m-RNA, von der beide Untereinheiten (p35, p40) des Interleukin-12 mit Hilfe einer „internal ribosome entry site“ (IRES) exprimiert werden. Um der Möglichkeit der Homodimerbildung des p40 zu entgehen, werden hierbei Fusionsproteine mit exprimiert.^{79,80,81,82} Dieses Konstrukt wurde in einen adenoviralen Vektor integriert und durch lokale Injektion an gastrointestinalen Tumoren im Tier-Modell illustriert.^{83,84}

Der virale Vektor

Es gab verschiedene Ansätze zur Testung eines geeigneten Vektors *in vitro*, wie z.B. in der Interferon- α induzierten tumorspezifischen Immunantwort während der Interleukin-12 Stimulation mittels eines retroviralen Vektors. Auch an Tiermodellen wurde geforscht, wie beispielsweise im Mausmodell zur Darstellung der Zerstörung der murinen Kolonkarzinom-Zelllinie MC38/0 nach Expression von murinen IL-12 durch retrovirale Vektoren.^{85,86} Ebenfalls wurde mit Hepatitis B-Viren und Herpes-Simplex-Viren experimentiert.⁸⁷ Es gab Ansätze die Wirkung mit einer systemischen oder lokalen Injektion Interleukin-12 zu „boosten“.⁸⁸

Im Interesse der Gentherapie der malignen Erkrankungen stehen vor allem adenovirale Vektoren, da eine langfristige Expression des therapeutischen Gens nicht erwünscht ist, sondern das selektive Abtöten der Tumorzellen. Die potenten Effekte eines rekombinanten Adenovirus für eine Zytokintherapie wurden *in vitro* und in Tiermodellen nachgewiesen.⁸⁹ Mehrere Phase-I-Studien, in denen mittels viraler Vektoren Interleukin-12 als therapeutisches Gen in Tumorzellen exprimiert wird, folgten durch das National Institut of Health 2003. Die adenovirale Gentherapie wird nicht nur in der Onkologie als neue Therapieoption getestet, sie spielt auch in der Therapie von Stoffwechselerkrankungen eine große Rolle. Mehrere klinische Studien erprobten die systemische oder lokale Applikation des Vektors mit dem fehlenden therapeutischen Gen in das Gewebe der insuffizienten Organe am stoffwechselerkrankten Patienten. In Tierversuchen wird derzeit versucht, das fehlende Gen pränatal in die Zielzellen oder in fertilisierte Oozyten zu schleusen.^{90, 91}

Seit Beginn der adenoviralen Gentherapie gilt das Hauptinteresse dem humanen Adenovirus Serotyp5 (Ad5). In neueren Studien wird geprüft, ob sich auch andere Serotypen für den Gentransfer eignen. Ebenfalls wird die Eignung der verschiedenen Serotypen des Adenovirus als Vektor in unterschiedliche Zell- und Gewebetypen zum Gentransfer diskutiert. Der Serotyp 19a konnte als Vektor für den Gentransfer in menschliche Skelettmuskelzellen erfolgreich genutzt werden.⁹² Andere Studien testeten mehr Serotypen für den Transfer in Sarkomzellen des Weichteilgewebes; in dieser Testreihe war der Ad35-Vektor sehr erfolgversprechend.⁹³ Große Hoffnungen werden derzeit in die Entwicklung von viralen Vektoren gelegt, die nur noch aus der Virushüllen und endständigen Virus-DNA-Sequenzen bestehen. Diese Vektoren haben eine bis zu fünfmal höhere Kapazität zur Aufnahme fremder DNA und

sind durch die fehlende Immunantwort des Wirtes nicht toxisch und zudem mehrmals applizierbar. Verwendung findet dieser Vektor z.B. bei dem Versuch alpha-1-Antitrypsin in Hepatozyten einzuschleusen. Es konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass die Expression des eingeschleusten Genes über ein Jahr konstant erfolgt ist. Darüber hinaus gelang der Nachweis einer sechsmonatigen Expression des VLDL-Rezeptors nach Einschleusung eines VLDL-Rezeptorgenes.⁹⁴

Systemische versus lokale Applikation des Vektors

Bereits in Tiermodellen sowie auch in ersten Phase-I-Studien der adenoviralen Gentherapie gab es bei systemischen Applikationen des Vektors gehäuft Probleme. Diese traten vor allem bei höheren Dosen des Virus auf. Neben der Toxizität des therapeutischen Produktes, wie z.B. Interleukin-12, löst auch die virale Genfähe selbst pathologische Mechanismen im Organismus aus. Es kam zur überschießenden Immunreaktionen des Körpers auf die viralen Proteine, die der einer schweren Infektion entsprachen, sowie zur Veränderung der Blutwerte (Thrombozytopenie, Anämie). Neben einer Komplementaktivierung durch den rekombinanten Adenovirus fiel in Reagenzglasversuchen auf, dass die rekombinanten Adenoviren zum Verkleben der Thrombozyten führen.⁹⁵ Es ist zu vermuten, dass diese Reaktion der Thrombozyten bei einer systemischen Applikation von höheren Dosen des Virus im Organismus zu Mikrozirkulationsstörungen führen würde. Dieser pathologische Mechanismus wäre ein Erklärungsmodell des tragischen Todes von Jesse Gelsinger, der wenige Tage nach systemischer Verabreichung einer relativ hohen Dosis an adenoviralen Vektoren zur Therapie einer Stoffwechslerkrankung verstarb.⁹⁶ In der adenoviralen Gentherapie solider Tumoren gewinnt aus diesen Gründen die intratumorale Injektion des Vektors auch in klinischen Studien immer mehr an Bedeutung.⁹⁷ Im Tiermodell war durch die lokale Applikation eine höhere Transgen-Expression in den Zielzellen bei einer geringeren inflammatorischen Reaktion zu beobachten. Bei der systemischen Gabe einer relativ geringen, verträglichen Dosis von adenoviralen Vektoren kam es zu einem nachweisbaren Anstieg von proinflammatorischen Proteinen bei kaum nachweisbarem therapeutischem Genprodukt.⁹⁸

Regulierbare Genexpression

Die Übertragung der TetR-Sequenz des E.coli in Säugetierzellen wurde mittels der Positionierung des Transaktivierungs-Fusionsproteins durch den Tet-Operator stromaufwärts des Transgens realisiert. In Anwesenheit von Tetracyclin oder eines Derivates bleibt der Promoter

inaktiv und die Transkription wird nicht initiiert.⁹⁹ Die Weiterentwicklung des adenoviralen Vektors führte durch die Integration eines birektionalen Promotors¹⁰⁰ zu einem autoregulativen Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystem, das durch die Zugabe von Tetracyclin und dessen Analoga Minocyclin, Anhydrotetracyclin, Oxytetracyclin und insbesondere durch Doxycyclin sehr effizient die Transkription des therapeutischen Gens supprimiert.¹⁰¹ Die Regulationskapazität des Tet-R-Systems in adenoviralen Vektoren erwies sich in verschiedenen Zelllinien als effizient.¹⁰² Die regulierte Genexpression stellt einen hohen Sicherheitsfaktor und eine enorme Weiterentwicklung für die gentherapeutische Behandlung dar, da hiermit das toxische Risiko von wirksamen Substanzen steuerbar und kalkulierbar wird. Basierend auf diesen Entwicklungen, wurde ein Interleukin-12 exprimierender adenoviraler Vektor (Ad.3r-hscIL12) zur regulierten Genexpression generiert. Die Transfektionseffizienz sowie auch die Regulationskapazität des Ad.3r-hscIL12 erwies sich in verschiedenen Zelltypen als sehr effizient.^{103,104,105} Dieser Vektor dient als Grundlage für die vorliegende Arbeit, um in einer präklinischen Studie mit humanen Kolonkarzinom-Biopsaten valide Daten für eine klinische Studie zu gewinnen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agarose, Sea Plaque	(Biozym #840101)
Ammoniumchlorid	(Merck #1.01146)
Assay Diluent	(BD #555213)
Borsäure	(Merck #1.12015)
Bromphenolblau	(Merck #1.11746)
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galakto-Pyranosid	(Merck #1.24655)
Calciumchlorid	(Merck #1.02083)
Calciumchlorid-dihydrat	(Merck #1.02382)
Complete mini 25Tbl.	(Roche #11836153001)
N, N-Dimethylformanid	(Merck #1.03053)
Dimethylsulfoxid	(Merck #1.02950)
Einfriermedium	(Gibco #11101-011)
Ethanol	(Merck #1.00983)
Ethidiumbromid	(Merck #80330704)
Ethylendiamintetraessigsäure	(Merck #1.12029)
FBS	(Gibco #10084-168)
FBS, tetracyclinfrei	(Clontech #8630-1)
Ficoll 400	(Merck #1.00498)
Glucose	(Merck #1.08337)
L-Glutamine 200mM	(Gibco:100x, #25030-024)
Glutaraldehyd 25%	(Merck #8.20603)

Glycerin, wasserfrei	(Merck #1.04093)
HEPES Pufferlösung	(Gibco #15630-056)
HEPES	(Boehringer #223778)
Hefeextrakt	(Merck #1.03753)
HGDNEM Dulbecco's Modified Eagle Medium with high Glucose	(Gibco #41965-039)
Igepal CA 630	(Sigma #3021)
Isopropanol	(Merck #1.02950)
Kaliumchlorid	(Merck #1.05001)
Kaliumferricyanat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	(Merck #1.04984)
Kaliumferrocyanat ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)	(Merck #1.04973)
2-Mercaptoethanol	(Merck #1.15433)
Magnesiumchlorid-hexahydrat	(Merck #1.05835)
Magnesiumsulfat-heptahydrat	(Merck #1.05886)
McCoys 5A Medium	(Gibco #26600-023)
Metronidazol Fresenius	(Fres.Kabi #5710.00.00)
Natriumchlorid	(Baker #2781000)
Di-Natriumcarbonat	(Merck #1.06392)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck #1.06329)
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	(Merck #1.06580)
Natriumacetat	(Merck #1.01539)
PBS Dulbeccos's Phosphat puffered saline w/o Ca, Mg	(Gibco #14190-169)
Penicillin/Streptomycin	(Gibco:100x, #15140-114)
Phenol-Rot (Histo)	(Merck #1.07241)
Schwefelsäure 1N (=0,5mol/L)	(Merck #1.09072.100)

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	(Bio-Rad #161-0301)
Sodiumdeoxycholat	(Merck #1.06504.100)
Substratlösung A und B	(BD #51-2607KC)
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	(Gibco #15504-020)
Trypan-Blue Solution	(Sigma #T8154)
Trypsin-EDTA	(Gibco #253000-096)
Trypton	(Merck #1.10859)
Tween 20	(Fluka #93773)
Xylenecyanol	(Merck #1.10590)

3.1.2 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Fetales Kälberserum (FBS)
Fetales Kälberserum ohne Tetracyclin
Dulbecco's Phosphate-buffered saline w/o Ca Mg, (PBS)
Dulbecco's Modified Eagle Medium
With high Glucose (HGD MEM)
L-Glutamin 200 mM (100x)
Mc Coy's 5° Medium
RPMI 1640
Trypsin-EDTA
HEPES (1 M)
Modified Eagle Medium 2x

3.1.3 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin (100x)

Doxicyclin (Vibrovenös®)

Metronidazol Fresenius (1:400)

3.1.4 Zusammensetzung sonstiger Lösungen

RIPA-Puffer für die Zelllyse:

150ml PBS

150mg SDS

750mg Natriumdeoxycholat

Igepal CA 630

Lösung für Gewebeproben:

500ml PBS

5ml Penicillin/Streptomycin

1,25ml Metronidazol (CLONT)

Coating Buffer 0,1M Sodium Carbonate, pH 9,5:

8,40g NaCO₃

3,56g Na₂CO₃

1 Liter Diluent

Wash-Buffer (ELISA):

500ml PBS

250µl Tween 20

3.1.5 Wasser

Mit einem Destillator Millipore der Firma Iwaka wurde das Wasser doppelt destilliert und autoklaviert oder wahlweise sterifiltriert verwendet. Für die Zellkultur wurde Aqua ad iniectionabilia (Braun: #25/12211373/1100) verwendet. Für die Reinigung des Homogenisators wurde WATER von Sigma verwendet.

3.1.6 Reagenzkits

Luciferase Assay Kit E1501	(Promega)
OptEIA Human IL-12 Set	(BD Biosciences)
OptEIA Human INF gamma Set	(Pharmingen)
BCA-Assay-Kit	(Pierce)

3.1.7 Weitere Materialien

Biopsiezange PE mittel Gastro+FO	(Leihgabe)
Falcon-Tubes 15ml, 50ml	(Falcon)
Isopropanoltank (12 Einsätze, 1°C/min)	(Nagenes)
Kanülen (Steril)	(Braun)
Kryo-Tubes 2ml	(Nunc)
Microtiterplatten (96-Well)	(Nunc)
Pipetten (0,1-2µl, 0,5-20µl, 5-100µl, 2-200µl, 100-1000µl)	(Gilson/Sarstedt)
Pipetten 8fach und 12fach Multichannel	(Eppendorf)
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	(Falcon)
Pinzetten (steril)	(Braun)
Reaktionsgefäße 0.5ml, 1,5ml, 2ml	(Eppendorf)
Röhren-Tubes 5ml	(Sarstedt)
Skalpelle Cutfix (steril)	(Braun)
Sterile Labormaterialien für die Kultivierung von Zelllinien	(diverse)

Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	(Falcon)
Zellkulturflaschen, 175m ²	(Nunc)
Zellkulturschalen (60, 94, 144mm)	(Greiner)

3.1.8 Geräte

Auflichtmikroskop	(Hund)
Autoklav LAS-S-A S2000	(MM München)
Brutschränke Zellkultur Herazell	(Heraeus)
Brutschränke Virus	(Heraeus)
ELISA-Spektralphotometer Titertek Multiskan Plus	(MKII)
Feinwaage HR 120	(AND)
Feinwaage (unter Abzug)	(Kern 822)
Homogenisator Ulta Turrax T8	(KIKA-Werke)
Luminometer Lumat LB 9507	(EG&G Berthold)
Magnetrührer	(Cenco)
Microtiterplatter-Reader EL 808	(BIO-TEK)
Pipettus Akku	(Hirschmann)
Schüttler	(GFL)
Spektralphotometer	(BioRad)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico	(Heraeus)
Ultrazentrifuge Typ L7-35 Coulter)	(Beckmann-
Vortexter	(Braun)
Wasserbad	(Braun)
Zentrifuge Type 5804R	(Eppendorf)

3.1.9 Zelllinien

293 HEK

Diese Zelllinie wurde aus humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen, welche die Basenpaare 1-4344 des adenoviralen Genoms integriert haben. Das Kulturmedium besteht aus HGDMEM, 2mM L-Glutamin, 10%FBS, 10mM HEPES.

HT29-Zellen

Diese Zelllinie wurde aus Tumorzellen eines humanen kolorektalen Karzinoms gewonnen. Das Kulturmedium besteht aus Mc Coy's 5A, 2mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% PenStrep, 10mM HEPES.

Humanes Kolonkarzinomgewebe

Diese Zelllinie wurde aus Biopsien humaner kolorektaler Karzinome gewonnen.

Humane Lymphozyten

Diese Zelllinien wurden aus den Überständen nach Zentrifugation von menschlichem Zitratblut gewonnen.

3.2 Patienten und Probengewinnung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Biopsien entstammen von Patienten mit hochgradigem oder bereits gesicherten Verdacht auf ein kolorektales Karzinom. Die Probanden setzen sich einerseits aus Patienten des Zentrums für Inneren Medizin und andererseits aus Patienten der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie zusammen. Von allen Patienten wurde im Vorhinein ein mündliches sowie schriftliches Einverständnis eingeholt. Es nahmen nur Patienten teil, die aufklärungsfähig und im Vollbesitz ihrer geistigen Kräfte waren. Zudem wurden persönliche Daten der Patienten wie Alter, Geschlecht, Diagnose und weitere Individualdaten erhoben und später in anonymisierter Form gespeichert und ausge-

wertet.

3.2.1 Patienten des Zentrums für Innere Medizin

In der endoskopischen Abteilung erfolgte bei Patienten mit einem hochgradigen Verdacht auf ein kolorektales Karzinom während der diagnostischen Koloskopie die Entnahme von Gewebeproben. Die Patienten wurden vor der Untersuchung durch den behandelnden Arzt über die laufende Studie aufgeklärt und um ihr Einverständnis auf freiwilliger Basis gebeten. Die Studienpatienten unterschrieben einen eigens für dieses Projekt entworfenen Einverständnisbogen. Die 8-10 zusätzlich entnommenen Proben kamen in PBS-befüllte Falcon-Tubes und wurden in einem Kühlschrank gelagert. Die Biopsien waren unter diesen Bedingungen in einen Toleranzzeitraum von vier Stunden abholbereit.

3.2.2 Patienten der Klinik für Allgemeinchirurgie

Die Patienten der Allgemeinchirurgie wurden mindestens einen Tag vor dem Eingriff auf der Station aufgesucht, um Einverständnis auf freiwilliger Basis gebeten und ausführlich über die laufende Studie aufgeklärt. Die Studienpatienten unterschrieben einen eigens für dieses Projekt entworfenen Einverständnisbogen. Bei den chirurgischen Eingriffen handelte es sich entweder um eine Hemi-Kolektomie, eine anteriore oder tiefe anteriore Rektumresektion. Nach der operativen Entfernung des betroffenen Darmabschnittes erfolgte im OP-Saal unter sterilen Bedingungen die Entnahme des Materials aus dem Resektat an verschiedenen Stellen des Tumors und der gesunden Schleimhaut. Dafür befand sich neben dem OP-Tisch ein Instrumenten-Tisch, welcher mit einem sterilen Tuch abgedeckt und dem nötigen chirurgischen Besteck versehen war. Das Resektat wurde mit einer sterilen OP-Schere längs, nicht durch den Tumor führend, eröffnet. Mit steriler Pinzette und Skalpell wurden aus dem Zentrum und dem Randgebiet des Tumors sowie der gesunden Schleimhaut (5cm Sicherheitsabstand) mehrere Proben entnommen. Die Gewebeproben wurden in PBS-befüllte Falcon-Tubes getan. Die Entnahmestellen wurden für den Pathologen gelb markiert und das Präparat in eine Formalinlösung gegeben. Im Labor wurden nun mittels einer endoskopischen Biopsiezange an gezielten Orten des Tumormaterials 30-50 Proben entnommen. Mit dieser Methode gelang eine Gewinnung möglichst gleich großer Biopsien, die mit den Gewebeproben aus der Endo-

skopie vergleichbar waren.

3.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

3.3.1 Sterilisation

Geräte und Lösungen, welche thermostabil sind, wurden in einem Autoklaven (Sanoklav, Wolf) bei 121°C in feuchter Hitze und 1bar für 45min sterilisiert.

3.3.2 Zellkultur

Jegliche Arbeitsschritte der Zellkultur mit den verwendeten Zelllinien wurden an einem Sterilarbeitsplatz durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien fand mit Standardtechniken bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit statt.

293-Zellen

Diese Zelllinie leitet sich von humanen embryonalen Nierenkarzinomzellen ab. 293-Zellen sind mit einem Teilstück des Ad5-Genoms, welches die E1a-Region enthält, stabil transfiziert. Diese Voraussetzung eignet 293-Zellen zur Vermehrung von rekombinanten humanen Adenoviren. Die Arbeit mit diesem replikativen System erfordert die Sicherheitsstufe II.

HT29-Zellen

Diese Zelllinie stammt aus dem Kolon-Adeno-Karzinom, die in vitro zur Infektion mit Adenoviren zur Analyse der Expression des therapeutischen Gens verwendet wurde.

Splitten von Zellen: Zum Splitting wurden die Zellen in einem ersten Schritt mit 5ml PBS (Dulbeccos Phosphate-buffered saline w/o Ca, Mg) gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurde 4ml Trypsin-EDTA auf jede Zellschale gegeben und 5-10min inkubiert. Anschließend wurden die Zellplatten gründlich gespült und in ein mit doppelter Menge Kulturmedium befülltes 50ml Falcontube pipettiert. Nach der anschließenden Zentrifugation der Falcontubes bei 5min mit 1300U/min (entspricht einer Zellschale) wurde der entstandene Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit ca. 5ml Medium resuspendiert. Diese Zellen wurden auf neue Zellschalen, welche mit 20ml Medium befüllt wurden, aufpipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurden die Schalen geschwenkt und danach im Inkubator kultiviert. War

nach ein paar Tagen eine Konfluenz der Zellen von 80-90% erreicht, stand eine erneute Splittung an, welche 1:5 erfolgt, oder die Verwendung der Zellen zu Experimenten.

Kryokonservierung von Zellen: Das Einfrieren von Zellen erfordert eine möglichst niedrige Passage, da sich die Wachstumsgeschwindigkeit mit jeder Passage erniedrigt. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden diese in 4ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 4 Kryotubes verteilt und in 1ml Aliquots eingefroren. Hierbei wurden die Kryotubes mittels eines Isopropanoltanks (-1°C/1min) langsam von -20°C auf -80°C hochgekühlt. Bei Bedarf wurden die Kryotubes bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in mediumbefüllte (20ml) Zellkulturschalen pipettiert. Da das Einfriermedium zelltoxisches DMSO enthält, wurde das Medium der Zellschale binnen 24 Stunden durch neues Medium ersetzt.

Bestimmung der Zellzahl: Zur Messung der Zellzahl wurden 90µl Zellsuspension mit 10µl Trypan-Blau-Lösung in H₂O pipettiert, vermischt und 2-5min inkubiert. Mit dieser Lösung wurde eine Neubauer-Zählkammer beschickt und unter dem Mikroskop die Zellen von 4 Quadraten gezählt. Diese Summe wird mit vier multipliziert und das Ergebnis noch mal mit dem Faktor 10⁴ multipliziert. Des Weiteren ermöglicht die Färbung der Zellen mit Trypan die Einschätzung der Zellvitalität.

3.4 Spezielle Arbeitsmethoden

3.4.1 Vermehrung und Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren

3.4.1.1 Virusvermehrung in 293-Zellen

Vermehrung: Die Virusvermehrung besteht aus einer schrittweise Infektion von erst einer 144mm Zellkulturschale mit 80% konfluenten 293-Zellen, dann 7 bis hin zu 50 Zellkulturschalen, wobei der Überstand, mit denen die nächsten Zellen infiziert werden, jeweils aus den vorherigen Zyklen gewonnen wurde. Die erste 144mm Zellkulturschale wurde mit 300µl eines eingefrorenen CPE(Cyclopathologischen Effekts)-Überstandes infiziert.

Infektion: Nach dem Auftauen des virushaltigen Überstandes wurde jenes mit 293-Zellmedium verdünnt, um jede Zellkulturschale mit 5ml der Viruslösung beschicken zu können, nachdem das alte Medium der 293-Zellkulturschalen abgesaugt wurde. Die infizierten Platten wurden 1 Stunde in den Inkubator gestellt, dann mit 15ml frischem Medium versehen und wieder inkubiert.

Entnahme (I) zur Aufreinigung: Die lytischen Zellen der 50 Zellkulturschalen wurden gründlich mit dem Medium abgespült, die Suspension in 4 Falcontubes übertragen und 4min bei 1500U/min, 10°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die vier verbliebenen Zellpellets resuspendiert, gewaschen und wieder zentrifugiert. Hiernach wurden die vier Zellpellets in 5ml PBS resuspendiert und jeweils zwei der entstandenen Zellpellet-PBS-Suspensionen zusammengefügt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des gewonnenen Virusmaterials wurden die Falcontubes in Aluminiumfolie eingewickelt, anschließend in einem Trockeneis-Bad rapide heruntergekühlt und bei -80°C eingefroren.

Aufreinigung mittels Cäsiumchloridzentrifugation: Das Ziel besteht darin, in einem ersten Schritt durch Übereinanderschichtung von CsCl-Lösungen verschiedener Dichte einen diskontinuierlichen dreistufigen Gradienten zu präformieren. Aufgrund der Schwere der Cäsiumionen bildet sich nach mehrstündiger Zentrifugation einer konzentrierten Cäsiumchloridlösung ein Dichtegradient aus, somit reichern sich Moleküle einer Größe in einem Gradienten, also dem Ort gleicher Dichte an. Entwickelt wurde diese Methode zur Aufreinigung von Plasmid-DNA, in dem beschriebenen Vorgang jedoch modifiziert zur Aufreinigung von DNA enthaltenen Viruskapsiden. Die Ultrazentrifugation findet in zwei Schritten statt, in denen die Viren von Verunreinigungen befreit werden, worauf eine Dialyse zur Entfernung der toxischen Cäsiumionen folgt. Es wurden drei CsCl-Lösungen unterschiedlicher Dichte angesetzt für die Stufengradienten A: 1,5g/ml B: 1,35g/ml C: 1,25g/ml. Für den kontinuierlichen Gradienten ist ausschließlich die CsCl-Lösung B von Interesse. In einem ersten Schritt wird Lösung A angesetzt: 30g CsCl zu einem Volumen von 42,5ml in PBS, dann Lösung B: 35ml Lösung A mit 14ml PBS, zuletzt Lösung C: 11ml Lösung B mit 9ml PBS. Alle drei CsCl-Lösungen wurden anschließend steril filtriert. Zur Herstellung des Stufengradienten werden Lösungen A-C vorsichtig in sechs Beckmann- Zentrifugenröhrchen ohne Schlierenbildung übereinander geschichtet, da für eine gründliche Aufreinigung der Viren scharfe Grenzen zwischen den Dichteschichten von Wichtigkeit sind. Jeweils 0,5ml der

Lösung A wurden von 3ml der Lösung B und 3ml der Lösung C übereinander pipettiert. Anschließend wurde der Stufengradient von zentrifugierten Zell-Lysat überschichtet, welches dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut wurde, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Die Überstände wurden mit PBS verdünnt und dann 6ml in jedes der Beckmann-Zentrifugenröhrchen vorsichtig pipettiert. Es folgt die erste Ultrazentrifugation, bei der die Röhrchen in swinging buckets gesetzt wurden und eine Stunde bei 34000U/min und 10°C im Vakuum zentrifugiert wurden. Bei Entnehmen der Zentrifugenröhrchen zeigt sich eine bläuliche 1-2mm dicke Virusbande, die darüber liegende weißliche Bande besteht aus leeren Viruskapsiden. Die Virusbande wurde mit einer 10ml Spritze und einer 20G Kanüle einen halben Zentimeter unterhalb der Bande angestochen und abgenommen. Die virushaltige Lösung wurde in einem Falcontubes mit der 1,35g/ml dichten CsCl-Lösung B auf 24ml verdünnt und in zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Nach Austarierung und Positionierung der Gegengewichte mit PBS folgt die zweite Ultrazentrifugation nach den gleichen Bedingungen wie die vorherige. Wie zuvor wurde die entstandene Virusbande abgenommen und die Viruslösung mit ca. 1ml Dialysepuffer auf 5ml aufgefüllt, da die Viruskapside während der anschließenden Dialyse partizipieren können. Ziel der Dialyse der Viruslösung ist die Eliminierung des toxischen CsCl. Dabei wurde in ein Becherglas 1,3ml Dialysepuffer gegeben, der einen in einem Schwimmer eingebrachten Dialyserahmen benetzte. Anschließend wurde die Viruslösung mittels 10ml Spritze (20G Kanüle) in den Dialyserahmen eingebracht und für 24 Stunden in dem mit Aluminiumfolie verschlossenen Becherglas auf einem Magnetrührer bei 4°C fortwährend bewegt. Alle acht Stunden wurde der Dialysepuffer gewechselt. Folgend wurde das Dialysat mit einer Spritze abgezogen und in 1,5ml Eppendorf-Caps in 50-2000 Aliquots aufgeteilt. Die Eppendorf-Caps wurden im Trockeneis-Ethanol-Bad rapide heruntergekühlt und bei -80°C gelagert.

3.4.1.2 Titerung mittels Plaqueassay

Die Titerung der Viruslösung dient der Konzentrationsbestimmung der infektiösen Adenoviren. Das Prinzip besteht in der Inkubation von 293-Zellen mit der jeweils stufenweise verdünnten Viruslösung. Diese werden mit Agarose (250ml MEM, 5ml Glutamin200mM, 5ml PenStrep, 5ml Hefeextrakt 5%, 2,5ml Pufferlösung HEPES, 25ml Horse-Serum) überschichtet, damit bei der Lyse der infizierten 293-Zellen nur umliegenden Zellen infiziert werden und auf der Platte ein Plaque entsteht. Zur Auszählung werden die Platten gewählt, die zu 30-30000 Plaques pro Platte geführt haben. Der Virustiter wird in m.o.i. (multiplicity of infec-

tion) angegeben, welche die Plaque formierende Einheit (pfu) in 1ml Viruslösung angibt. Es wurden 12 Eppendorf-Caps mit dem Verdünnungsmittel EBSSS jeweils mit 1,8ml befüllt. Das erste Cap wurde mit 200µl Viruslösung beschickt und gemischt, worauf 200µl vom ersten Cap ins zweite übertragen wurden. So entstand nacheinander eine stufenweise Verdünnung (10(7)-10(12)) der Viruslösung bis zum zwölften Cap. Es wurde von jeder Verdünnung 500µl auf drei 90% konfluente 293-Zellkulturschalen pipettiert, welche zuvor mit PBS vom restlichen Medium frei gewaschen wurden. Zwei nicht infizierte Schalen dienen der Negativkontrolle. Die Zellkulturschalen inkubierten eine Stunde und wurden währenddessen jede Viertelstunde zur Virusverteilung geschwenkt. Nachdem die Virusverdünnung bzw. das Medium aus den Schalen entfernt wurde, kam eine 8ml Agarosebeschichtung auf jede Platte. Dabei wurden 85ml der anetzten Agaroselösung mit autoklavierter 1%Sea Plaque Agaroselösung vermischt. Es wurden nie mehr als sechs Schalen zugleich abgesaugt und mit Agarose beschickt, da die Gefahr der Austrocknung besteht. Bei Raumtemperatur erstarrten die Agaroseoverlay, anschließend wurden die Kulturschalen inkubiert und nach sieben Tagen mit einer weiteren 5ml Agaroseschicht übersehen. Vom siebten Tag an wurden die Kulturschalen täglich mittels Mikroskop nach Plaques inspiziert und auf der Unterseite markiert. Nach 10-14 Tagen kam es zur vollständigen Auswertung der Plaqueassays, wobei nur die Verdünnungen mit 30-30000 Plaques berücksichtigt wurden. Da jeweils drei Platten mit der gleichen Verdünnung beschickt wurden, bildete man den Mittelwert aus in Frage kommenden infizierten Platten.

Der Virustiter ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\frac{\text{Durchschnitt der Plaques pro Platte} \times \text{Verdünnung}}{0,5\text{ml (Menge der Viruslösung pro Platte)}} \text{ in pfu}$$

3.4.2 Infektion der Zellkulturen und Gewebebiopsien mit rekombinanten Adenoviren

3.4.2.1 Allgemeine Methode der Infektion von HT29-Zellen aus der Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden HT29-Zellen aus der Zellkultur, welche den Tumorzellen

der humanen Kolonkarzinomzellen entsprechen, mit den rekombinanten Adenoviren, (Ad.RSV.β-Gal, Ad.3r-hscIL12, Ad.3r-Luc) infiziert, um einen Eindruck über die Transduzierbarkeit dieser Zellart zu gewinnen. Anschließend wurden HT29-Zellen mit den Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc doppelinfiziert, um mittels dieses Versuches zu erfahren, ob eine quantitative Beeinflussung der gleichzeitigen Expression der Genprodukte vorliegt, da eine Kombination aus zwei Vektoren für eine klinische Studie wahrscheinlich ist. Zum quantitativen Nachweis der Transduzierbarkeit wurden HT29-Zellen mit dem adenoviralen Vektor Ad.RSV.β-Gal infiziert und später ausgezählt. Es wurden HT29-Zellen mit unterschiedlicher Viruskonzentration (m.o.i). infiziert und anschließend die Zell-Lysate und Überstände geerntet, die in weiteren Verfahren qualifiziert und quantifiziert wurden.

Zellen und Zellcount: In einem ersten Schritt werden in tetracyclinfreien FBS kultivierte HT29-Zellen von acht Zellkulturschalen (144mm) auf acht 6-Well-plates gesplittet. Jedes Well wurde mit 1 Mio. Zellen, nach Zellzahlbestimmung und Verdünnung, und 3ml Medium beschickt. Es folgte eine sechsstündige Inkubation.

Virusverdünnungen: In der letzten Inkubationsstunde wird die gebrauchte Viruslösung aufgetaut, um mit einem HT29-Medium ohne FBS eine Verdünnungsreihe des Virus zu erstellen. Es wurden folgende Viruskonzentrationen angemischt: 1, 3, 30, 100, 300, 1000 m.o.i. und eine Negativkontrolle aus HT29-Medium ohne FBS.

Infektion: Nach der Inkubation wurde je eine 6-Well-plate einer m.o.i. mit 500µl in jedes Well angesetzt, nachdem das alte Medium abgesaugt wurde. Während einer folgenden einstündigen Inkubation wurden die 6-Well-plates jede Viertelstunde geschwenkt. Anschließend inkubierten die infizierten Zellen weitere 24 Stunden.

Ernte: Für die Durchführung eines hIL12-ELISA wurde 1ml der Überstände aus jedem der acht 6-Well-plates abpipettiert und in Eppendorf-Caps jeweils in 2x200µl und 1x600µl bei -80°C eingefroren. Für die Durchführung einer Proteinbestimmung und einem Western-Blot wurde der Überstand in löslichen Proteinen geerntet, indem die HT29-Zellen lysiert wurden. Die Überstände wurden abgenommen und die Kulturen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wird jede mit 150µl CCLR (Cell Cultures Lysis Reagenz) pipettiert. Von den später eiskühlten Schalen wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Wells gestri-

chen und zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in Eppendorf-Caps pipettiert und bei -80°C gelagert

3.4.2.2 Dosisescalation der Biopsien mit Ad.3r-Luc und Ad.3r-hIL-12

Die Dosisescalation soll nachweisen, in welchem Viruskonzentrationsbereich die optimale Transfektion und der Tumorzellen stattfindet. Ebenfalls war von Interesse, wie wirkungsvoll sich hierbei die Expression der Genprodukte durch Doxycyclin steuern lässt.

Die Biopsien: Die frischen Biopsien aus dem allgemeinchirurgischen OP wurden zehnmal mit in der Biopsielösung (PBS, Pen/Strep, L-Glutamine, Metronidazol) gewaschen und gevortext. Mit einer abgeflammt Biopsiezange wurden etwa 60 gleich große Proben entnommen und in PBS-befüllte Zellkulturschalen gelegt.

Virusverdünnungen: Anschließend wurden von beiden Virusarten in sechs mit 10ml McCoys (ohne FCS) beschickten Falcontubes Verdünnungslösungen mit folgenden Konzentrationen angefertigt: *Ad.RSV.β-Gal*: 10moi, 30moi, 100moi; *Ad.3r-Luc*: 10moi, 30moi, 100moi; *Ad.3r-hscIL12*: 10moi, 30moi, 100moi.

Die Virusverdünnungen wurden in 24-Well-Platten pipettiert, so dass je acht Wells mit je 1ml der gleichen Konzentration beschickt wurden. Eine dritte Platte wurde für die Negativkontrollen mit je 1ml McCoys beschickt.

Infektion: Hiernach wurde jedes Well mit einem möglichst gleich großen Biopsat bestückt. Die 24-Well-Plats inkubierten für eine Stunde im Virusschrank und wurden alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Viruslösung vorsichtig abgesaugt und anschließend mit frischem Medium versehen. Dabei bekamen vier der Wells gleicher Konzentrationen 1ml McCoys-Vollmedium mit Tetracyclin-freiem FCS und die verbleibenden vier wurden mit einem Doxycyclin-angereicherten McCoys-Vollmedium in einem Konzentrationsverhältnis von 1:10.000 beschickt. Die Negativkontrollen wurden ebenfalls zu Hälfte mit jeweils beiden Medien beschickt. Die 24-Well-Plats wurden nun für 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert.

Erste Ernte: Am folgenden Tag wurden aus jedem Well 200µl Überstand entnommen und in

Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Platten inkubierten für weitere 24 Stunden.

Zweite Ernte: Nach 48 Stunden Inkubation wurden weitere 500µl des Überstandes aus jedem Well entnommen und einzeln in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die inkubierten Biopsien wurden ebenfalls zur späteren Proteinbestimmung einzeln in Kryo-Tubes bei -80°C eingefroren.

3.4.2.3 Transfektion der humanen Kolonkarzinom-Biopsien

Die Dosisescalation der Biopsien mit verschiedenen m.o.i der Virusverdünnungen zeigte eine zufrieden stellende Transfektion bei 10-30 m.o.i der jeweiligen rekombinanten Adenoviren.

Biopsie: Die frische Biopsie wurde zunächst zehnmal mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgte mit einer abgeflamten Biopsiezange die Entnahme von 50-70 gleich großen Proben, die in eine PBS befüllte Zellkulturschale gelegt wurden. Eine 1cm * 0,5cm große Probe wurde von jeder Biopsie (Zentraler Tumor, Peripherie Tumor, gesunde Mukosa) in flüssigen Stickstoff eingefroren und später zur Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor-Färbung (CAR) in die Pathologie der Uniklinik Eppendorf gebracht.

Virusverdünnungen: Anschließend wurden von den rekombinanten Adenoviren Ad.3r-hscIL-12, Ad.3r-Luc und Ad.RSV.β-Gal (nur bei 2 Proben) in den erforderlichen Mengen die Virusverdünnungen in McCoys A5 Medium (ohne FCS) in 50ml Falcontubes angefertigt. Die Virusverdünnungen wurden in 24-Well-Plats pipettiert, so dass je acht Wells mit je 1ml der gleichen Konzentration beschickt wurden. Eine dritte Platte wurde für die Negativkontrollen mit je 1ml McCoys beschickt.

Infektion: Anschließend wurde jedes Well mit einem möglichst gleich großen Biopsat bestückt. Die 24-Well-Plats inkubierten für eine Stunde im Virusschrank und wurden alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Viruslösung vorsichtig abgesaugt und anschließend mit frischem Medium versehen. Dabei bekamen die Hälfte der Wells gleicher Konzentrationslösungen 1ml McCoys-Vollmedium mit Tetracyclin-freiem FCS und die verbleibenden ein McCoys A5-Vollmedium angereichert mit Doxycyclin in einem Kon-

zentrationenverhältnis von 1:10.000. Die Negativkontrollen wurden ebenfalls zu Hälfte mit jeweils beiden Medien beschickt. Die 24-Well-Plats wurden nun für 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert.

Erste Ernte: Am folgenden Tag wurden aus jedem mit den rekombinanten Adenoviren Ad.3r-hscIL-12 und Ad.3r-Luc infizierten Well 200µl Überstand entnommen und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Platten inkubierten für weitere 24 Stunden.

Zweite Ernte: Soweit das Medium nicht schon nach 24 Stunden aufgebraucht war, erfolgte nach 48 Stunden Inkubation die Entnahme weiterer 500µl des Überstandes aus jedem Well, das mit den rekombinanten Adenoviren Ad.3r-hscIL-12 und Ad.3r-Luc infiziert war; die Überstände wurden einzeln in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die inkubierten Biopsien wurden ebenfalls zur späteren Proteinbestimmung einzeln in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Biopsien, welche mit Ad.RSV.β-Gal transfiziert wurden, konnten anschließend in der X-Gal-Lösung für weitere 24h inkubiert werden.

3.4.3 Quantifizierung und Charakterisierung der Genprodukte

3.4.3.1 Bestimmungen der Luciferaseaktivität

Luciferase ist ein Enzym, das ursprünglich aus der cDNA des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) entstammt. Es besitzt die Eigenschaft, unter Anwesenheit von O₂, ATP und Magnesium die oxidative Decarboxylierung von D-(-)Luciferin zu Oxyluciferin zu katalysieren. Während dieser chemischen Reaktion wird Licht der Wellenlänge 562nm emittiert. Die in den Versuchen verwendete Luciferase cDNA ist ein modifiziertes Reportergen, bei der es zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des nicht mehr glyconisierbaren 62kDa-Proteins kommt. Aufgrund der Linearität () des emittierten Lichtes kann dieses in einem Luminometer gemessen und quantifiziert werden. Die mit CCLR lysierten Überstände wurden aufgetaut und das Lysat einer Viruskonzentration in 2x20µl hintereinander gemessen. Pro Messung des 20µl Lysats wurde 100µl Substrat injiziert und darauf die Lumineszenz für 10 Sekunden gemessen. Anschließend wurden die Durchschnittswerte der Negativkontrollen von den Durchschnittswerten der drei Well mit gleicher Viruskonzentration abgezogen. Für die Umrechnung der in Lichteinheiten gemessenen Werte wurde das Softwareprogramm Prism (Graphpad) benötigt,

womit sich nach Bestimmung des Proteingehaltes die Luciferasekonzentration im Zell-Lysat (Luciferasekonzentration pro mg herausgelöstes Zellprotein) errechnen lässt.

3.4.3.2 ELISA zur Bestimmung der Konzentration von humanen Interleukin-12

Es wurde das OptEIA Humanes IL-12 KIT verwendet, das bereits alle benötigten Substrate enthielt. Die ELISA-Platte wurde mit dem Capture-Antikörper über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen mit einem Waschpuffer aus einem Konzentrat (Tween 20; 1:250 in PBS) fünfmal gewaschen. Die Wells wurden mit je 200µl Assay Diluent beschickt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend folgte erneut ein fünfmaliger Waschgang. Zur Erstellung der Stocklösung von 500pg/ml IL12 wurde in 10ml Assay Diluent ein hIL12 Standard von 43,2µg gelöst. Die Stocklösung bildet die Ausgangsbasis für eine Verdünnungsreihe: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 pg/ml, die Negativkontrolle besteht aus reinem Assay Diluent. In den Wells der ELISA-Platte wurde jeweils 100µl der verdünnten Proben in 1:10, 1:50, 1:100, 1:1000 und 1:10000 und die Standardverdünnung pipettiert. Bei Raumtemperatur wurden die mit Parafilm-Folie verschlossenen ELISA-Platten zwei Stunden inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Detektionsantikörperlösung (1:250 in Assay Diluent), ein mit Horseradish Peroxidase gekoppelter anti-hIL12 Antikörper, mit der Substratlösung (1:250 in Assay Diluent) angesetzt. Nach fünfmaligem Spülen mit dem Waschpuffer, wurden die Wells mit 100µl des Gemisches aus Detektionsantikörperlösung und Substratlösung befüllt. Die wieder mit Parafilm-Folie verschlossenen ELISA-Platten wurden eine weitere Stunde inkubiert. Die Wells wurden zehnmal mit Waschpuffer gespült und mit dem zuvor angemischten Color-Reagenz (aus Lösung A und B) jeweils mit 100µl beschickt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Color-Reagenz erfolgte eine halbstündige Inkubation an einem dunklen Ort. Nach dem Auftragen von 100µl Stop Solution (2N Schwefelsäure) pro Well, welche die enzymatische Reaktion der Color Reagenz unterbricht, wurde zweimal bei einer Wellenlänge von 450nm und ebenfalls zweimal bei einer Korrektur-Wellenlänge von 492nm mit einem ELISA-Reader die optische Dichte der Farbreaktion gemessen. Die Mittelwerte der 450nm-Messung wurden von den Mittelwerten der 492nm-Korrekturmessung abgezogen. Die Ergebnisse der beiden Wells der gleichen Proben wurden ebenfalls gemittelt und von den gemittelten Werten der Negativkontrollen subtrahiert. Aus den Ergebnissen wurde mittels des Softwareprogrammes Excel (Microsoft) eine Funktion für

die Eichkurve errechnet und daraus die einzelnen hIL12 Konzentrationen berechnet.

3.4.3.3 Bestimmungen des Proteingehaltes

Dieser Assay ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebeproben, welche den Ergebnissen der Transgen-Expression von humanem Interleukin-12 und Luciferase gegenübergestellt wurden. Der Proteingehalt fungiert als indirekte Zellzahlbestimmung der Gewebeproben, da die Zellzählung nicht möglich und ein Auswiegen der Biopsate zu ungenau ist. Da es sich um festes Gewebe handelte, mussten die Proben vor der Zell-Lyse homogenisiert werden. Jede Gewebeprobe wurde in einem 2ml Reaktionsgefäß mit 500µl Zell-Lysepuffer (RIPA-Puffer und Proteaseinhibitor: Complete mini, 10mlRIPA/1Tbl.) mittels eines Homogenisators zerkleinert. Nach jeder Gewebezerkleinerung wurde der Homogenisator in 70%igen Ethanol und Wasser (Sigma) gewaschen, um eine Zellübertragung von einer Probe zur nächsten zu vermeiden. Das Homogenisat inkubierte 40 Minuten auf Eis im Zell-Lysepuffer. Nach der Inkubation wurde das Homogenisat im Kaltraum (4°C) bei 10.000U/min für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend wurden 400µl des entstandenen Überstandes unter denselben Bedingungen nochmals zentrifugiert. Es wurden 350µl Überstand entnommen, die zur sofortigen Proteinbestimmung verwandt oder zu einer späteren Bestimmung bei -80°C eingefroren wurden. Zur Proteinmessung wurde das BCA Protein-Assay-Kit verwendet. Es beinhaltet den Standard, in 2ml Ampullen aliquotiert, und die Reagenzien A und B. Das Prinzip besteht in der Absorptionsmessung der Reaktion von Proteinen mit einem Farbsubstrat, bei der es zu einer Verschiebung der zu messenden Welllänge kommt, deren Zunahme ein indirektes Maß für die Konzentration von Protein in der Lösung ist. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an die Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe in einem Wellenbereich von 465nm zu 595nm. In einem ersten Schritt wurden die Standardverdünnungen erstellt: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 und 0µg/ml. Als Diluent wurde RIPA-Puffer verwendet, da sich die Genauigkeit der Messung bei Verwendung desselben Diluents der Proben erhöht. Anschließend wurden je 20µl der Probenverdünnungen sowie der Standards in Triplets in die Wells einer geeigneten Mikrotiterplatte pipettiert. Aus den Reagenzien A und B wurde in einem Verhältnis 50:1 der Working-Reagent erstellt. Mit einer Multichannel-Pipette (8fach) wurde jedes Well der Mikrotiterplatte mit 200µl Working-Reagent beschickt, mit Parafilm abgedeckt und bei 37°C im Warmraum für 30 Minuten inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit begann die Messung in einem Mikrotiterplatten-Reader bei entsprechender Welllänge. Aus den Ergebnissen

wurde mittels des KC4-BCA-Assay-Programm (Microsoft) eine Eichkurve berechnet, von dieser die Proteinkonzentration der Proben abzulesen war.

3.4.3.4 β -Galaktosidase-Färbung

Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die glycosidische Bindung in X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosidase) zu 5-bromo-4-chloro-indoxyl. Unter aeroben Bedingungen (Oxidation) dimerisiert diese Verbindung zu einem unlöslichen blauen Farbstoff. In der vorliegenden Arbeit können die transfizierten Zellen und Gewebe durch Infektion der HT29-Zellen und der Kolonkarzinom-Biopsien mit Ad.RSV. β -Gal und anschließende Expression des farbigen Genproduktes direkt erkannt werden. Nach der Infektion der HT29-Zellen und der Biopsien mit Ad.RSV. β -Gal wurde nach fünf Stunden das Medium durch frisches ersetzt. 24 Stunden später wurden die infizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dazwischen mit eiskalter 0,5% Glutaraldehydlösung fixiert und anschließend mit 4ml X-Gal für weitere 24 Stunden inkubiert. Die HT29-Zellen konnten unter dem Mikroskop ausgezählt werden: Der Anteil transfizierter, d.h. gefärbter Zellen betrug ca. 9-16%. Die Gewebebiopsien wurden in je 1ml gepufferten Formalin fixiert, in Eppendorf-Tubes überführt und zur Anfertigung eines Gewebeschnittes in die Pathologie der Uniklinik Eppendorf geschickt.

3.4.4 Stimulation der humanen Lymphozyten mittels humanem Interleukin-12

Das Zytokin Interleukin-12 besitzt unter anderem die Fähigkeit, im Lymphozyten lymphokin-aktivierte Killerzellen und die Interferon- γ -Sekretion zu stimulieren. Das sich die INF- γ -Sekretion im Lymphozyten mittels eines INF- γ -ELISA quantifizieren lässt, besitzt diese eine direkte Aussagekraft über die Bioaktivität des exprimierten Interleukin-12.

Eine Kulturflasche wurde mit Antikörpern beschichtet, die eine proliferative Wirkung auf T-Lymphozyten haben. Das R&D-System (500mg) wurde in 1ml PBS gelöst und 100 μ l dieser Lösung mit 4,9ml PBS verdünnt und diese 5ml Suspension in der Kulturflasche verteilt. Die beschichtete Kulturflasche wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Zellsuspension aus humanen Lymphozyten wurde zur Vorstimulation in die Kulturflasche überführt. Das humane Interleukin-12 wurde direkt aus den Überständen der infizierten Gewebekulturen gewonnen. Anschließend wurden die Interleukin-12 Konzentrationen in einem Sandwich-

ELISA bestimmt. Es wurden 10^4 Zellen der humanen Lymphozyten in 100µl pro Well und ebenfalls 25µl des eingefrorenen Zellüberstandes (von 1:0 bis 1:10⁵ halblogarithmisch verdünnt) pro Well in eine 96-Well-Kulturplatte pipettiert. Nach 22 bis 24 Stunden wurden 100µl des Zellüberstandes abpipettiert und 100µl Lymphozytenserum 1:1 auf eine neue 96-Well-Kulturplatte übertragen. Die Kulturplatte wurde bei -80°C gelagert. Einen Tag vor dem INF-γ-ELISA wurde eine ELISA-Platte mit dem ersten Antikörper, dem Capture-Antibody in Coating-Buffer, beschichtet. Nach 24 Stunden wurde die ELISA-Platte fünfmal mit 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 200µl Assay-Diluent pipettiert und die Platte eine Stunde inkubiert. Aus einem der bei -80°C eingefrorenen Aliquot des INF-γ-Standards wurde mit Assay-Diluent eine Verdünnungsreihe angefertigt mit dem Konzentrationsgefälle von 2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,25pg/ml und einer Negativkontrolle aus reinem Assay-Diluent. Die Proben der aufgetauten Lymphozytenüberstände wurden 1:100 mit Assay-Diluent verdünnt. Nach dem erneuten Waschen der ELISA-Platten wurden pro Well 50µl der Proben mit 50µl des Assay-Diluents und jeweils 100µl des Standards und der Negativkontrollen in die dafür markierten Wells hinzu gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an den dritten Waschvorgang wurden die Wells mit je 100µl einer Suspension aus Detection-Antibody, Assay-Diluent und Avidin Horse Serum beschickt. Nach einer Stunde Inkubation und dem letzten Waschvorgang wurden je 100µl einer Farbreagenz, gemischt aus Reagenz A und B (1:1), in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde wegen der Lichtempfindlichkeit der Farbreagenz an einem dunklen Ort eine halbe Stunde inkubiert und anschließend mit 50µl der Stop-Solution pro Well versehen. Zur Bestimmung der optischen Dichte der Lösungen wurde im ELISA-Reader dreimal bei einer Wellenlänge von 450nm und dreimalig bei einer Korrektur-Wellenlänge von 492nm gemessen. Die Mittelwerte der 450nm-Messung wurden von den Mittelwerten der 492nm-Messung abgezogen. Die Ergebnisse der Wells mit gleichen Proben wurden ebenfalls gemittelt und von den gemittelten Proben der Negativkontrollen subtrahiert. Mittels des Softwareprogrammes Excel wurde aus den Daten eine Funktion für diese Eichkurve erstellt und die Interferon-γ Konzentrationen errechnet.

3.4.5 Immunhistochemische Färbung des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR)

Bei der Materialgewinnung aus dem Resektat der chirurgischen Patienten wurde bei größeren Tumoren noch zusätzliches Gewebe aus dem Tumors sowie der gesunden Schleimhaut entnommen. Bei diesen Proben sollte die Dichte des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors bestimmt und zum Vergleich optisch dargestellt werden

Diese ca. 1cm x 0,5cm großen Gewebestücke wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und in das Pathologische Institut der Uniklinik Eppendorf geschickt. Die Gewebeproben wurden dort mittels Gefrierschnitt (Kryo-Sektion) auf eine Dicke von 5-10 Microns geschnitten und auf einem Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Schnitt jeder Probe wurde in Hämatoxylin (HE)-Technik gefärbt. Nach einer zehnminütigen Fixierung in 4% Paraformaldehyd und einer halbstündigen Inkubation in 1% FCS bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte mit dem mouse IgG1 monoklonalen Antikörpern Anti-CAR (clone RmcB, Upstate, NY) in 1µg/ml TBS und 1% FCS behandelt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 5µg/ml eines rabbit anti-mouse IgG inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-(APAAP)-System (Dako, Dilution 1:50) behandelt und wieder 30 Minuten inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch New Fuchsin (Merck, Darmstadt, Deutschland), Naphthol AS-BI (Sigma) und Levamisol (Sigma) dargestellt. In einem letzten Schritt wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin entfärbt (Red Staining). Da durch diese Färbetechnik auch andere Strukturen der Zelle rot markiert werden, wurden die Schnitte anschließend mit dem Envision-Horseradish-Peroxydase-System behandelt (Brown Staining). Der entstandene braun gefärbte Kryo-Schnitt markiert ausschließlich den CA-Rezeptor der Zellen und lässt einen guten Vergleich der Dichte des Rezeptors in den unterschiedlichen Geweben zu.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Realisierbarkeit einer *ex vivo* Transfektion von humanen Kolonkarzinom-Biopsien mit Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc; darüber hinaus sollte die damit verbundene Expression und Genregulation der Transgenprodukte Interleukin-12 und Luciferase dargestellt werden. Zur Demonstration der Transduzierbarkeit von humanen Kolonkarzinomzellen wurden HT29-Zellen und einige Gewebeproben mit replikationsdefizienten Adenoviren zur Expression des Markergens β -Galaktosidase infiziert. Es wurden erst HT29-Zellen in der Zellkultur mit beiden Vektoren einzeln und dann gleichzeitig transfiziert, um eine Beeinflussung der Expression der Transgene im verwendeten Vektorsystem auszuschließen. Von 12 Patienten wurden bis zu 30-60 histologisch gesicherte Proben erhoben. Bei größeren Tumoren wurden Biopsien zum Vergleich der Transfektion aus dem Zentrum des Tumors, des Randbereiches und aus der intakten Mukosa (5cm Sicherheitsabstand) entnommen. Die Transgen-Expression des Interleukin-12 wurde mit einem hIL-12 p40 ELISA im Überstand nachgewiesen. Die Expression von Luciferase wurde mittels eines Luminometers gemessen. Um sich an einen validen Konzentrationswert für die Infektion mit dem adenoviralen Vektorsystem anzunähern, wurde die erste Kolonkarzinom-Biopsie mit verschiedenen Dosen des Vektors, in An- und Abwesenheit von Doxycyclin, eskaliert. Die folgenden Biopsien wurden stets mit derselben Konzentration des adenoviralen Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc infiziert. Zur Vergleichbarkeit der Daten von Interleukin-12 und Luciferase wurde in allen Biopsien der Proteingehalt bestimmt. Bei größeren Tumoren wurden zusätzliche Gewebeproben zur immunhistologischen Darstellung der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptoren (CAR) verwendet. Die Bioaktivität des exprimierten Interleukin-12 wurde durch die Inkubation von humanen Lymphozyten mittels der Interferon- γ -Induktion quantifiziert. Für eine spätere Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb des Patientenkollektives wurden Individualdaten wie Alter, Vorerkrankung, Tumor-Stadium, Histologie, Größe und Wachstum erhoben.

4.2 Adenovirale Vektoren

4.2.1 Ad.RSV.β-Gal

Der Ad.RSV.β-Gal diente zur Veranschaulichung der Transfizierbarkeit von Karzinomgewebe. In 293-Zellen wurde das Virus vermehrt und aus den 50 mit zytopathischen 293-Zellen bewachsenen 140mm-Zellkulturschalen aufreingt. Die Bestimmung des infektiösen Titers der Aufreinigung durch den Plaqueassay ergab eine Konzentration von $2,1 \cdot 10^{10}$ pfu/ml in einem Gesamtvolumen von 5ml. Der Ad.RSV.β-Gal diente zur Veranschaulichung der Transfizierbarkeit von Karzinomgewebe.

4.2.2 Ad.3r-Luc

Anhand des Ad.3r-Luc sollten an HT29-Zellen in der Zellkultur sowie am Karzinomgewebe die starke Expressions- und Regulationskapazität des 3r-Systems demonstriert werden. Es wurde ebenfalls ein funktioneller Klon aus 50 140mm-Zellkulturschalen aufgereinigt. Sie ergab einem Titer von $4 \cdot 10^9$ pfu/ml im Plaqueassay bei einem Gesamtvolumen von 5ml.

4.2.3 Ad.3r-hscIL12

Der Ad.3r-hscIL12 ist der therapeutische Vektor, welcher das Fusionsprotein Interleukin-12 exprimiert. Er wurde ebenfalls in der Zellkultur und im Gewebeexperiment angewendet. Die Aufreinigung des Virus Ad.3r-hscIL12 erfolgte aus 50 140mm-Zellkulturschalen. Sie ergab eine 5ml Aufreinigung mit einem Titer von $3,36 \cdot 10^9$ pfu/ml im Plaqueassay.

4.3 Ergebnisse der Zellkulturexperimente

4.3.1 Ergebnisse der Transfektion mit Ad.RSV.β-Gal

Um die generelle Transfektionsmöglichkeit humaner Kolonkarzinomzellen des Zelltyps HT29 mit einem adenoviralen Vektor optisch darzustellen, wurde ein Parallelansatz auch mit dem Ad.RSV.β-Gal infiziert. Die Transfektion der HT29-Zellen bei einer m.o.i. von 30 war durchschnittlich effizient. Nach der X-Gal Färbung zeigen sich im Schnitt 14% gefärbte Zellen.

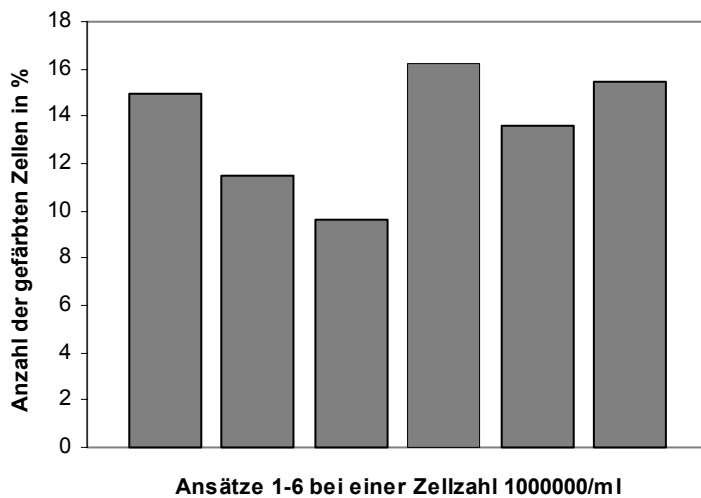


Abb.8: Darstellung des Anteils der gefärbten HT29-Zellen nach Transfektion mit dem Vektor Ad.CMV.β-Gal und anschließender Entfärbung mit X-Gal.

4.3.2 Infektion mit den adenoviralen Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc

Anhand dieser Versuchsfolge sollte ermittelt werden, wie sich die beiden Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc im Zellkulturexperiment mit humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) verhalten. Geprüft wurde die Transfektionseffizienz der beiden Vektoren. Ebenfalls wurde im Rahmen einer Doppelinfektion kontrolliert, ob sich die beiden Vektoren in Transfektion und Suppression beeinflussen. Diese Daten geben Aufschluss darüber, ob in einer späteren klinischen Studie zwei Vektoren des 3r-Systems verwendet werden könnten, um die antitumorale Wirkung zu potenzieren. Ein hIL12-ELISA sollte zeigen, wie hoch das Fusionsprotein bei einfacher und bei gleichzeitiger Infektion mit beiden Vektoren exprimiert wird. Zur Überprüfung wurde die auch Luciferaseaktivität jeweils in beiden Ansätzen bestimmt. Anhand von Eichlösungen erhaltener Funktionen wurden der Interleukin-12 und Luciferase-Gehalt der einzelnen Proben berechnet. Alle dargestellten Ergebnisse der Zellkultur generieren aus der Transfektion mit einer Viruskonzentration von 30 m.o.i.. Während in den Überständen der mit Ad.3r-hscIL12 transfizierten HT29-Zellen eine Konzentration von durchschnittlich $3,78 \times 10^5$ pg/ml bestimmt werden konnte, wurde bei der Transfektion mit Ad.3r-Luc eine gemittelte Luciferasekonzentration von $2,78 \times 10^5$ pg/ml ermittelt. In den Zellkulturansätzen wurde bei gleichzeitiger Infektion mit beiden Vektoren eine durchschnittliche Konzentration von $3,59 \times 10^5$ pg IL12/ml und in der Luminometermessung von $2,35 \times 10^5$ pg Luc/ml ermittelt. Die minimalen Differenzen zwischen den Einfach- und Doppeltransfektion zeigten bei der IL-12 sowie der Luciferase-Expression nach statistischer Berechnung (p-Werte: IL-12= 0,38 und Luc= 0,31) keine Signifikanzen. Die adenoviralen Vektoren scheinen sich bei gleichzeitiger Transfektion in der Expression der Genprodukte nicht zu beeinflussen.

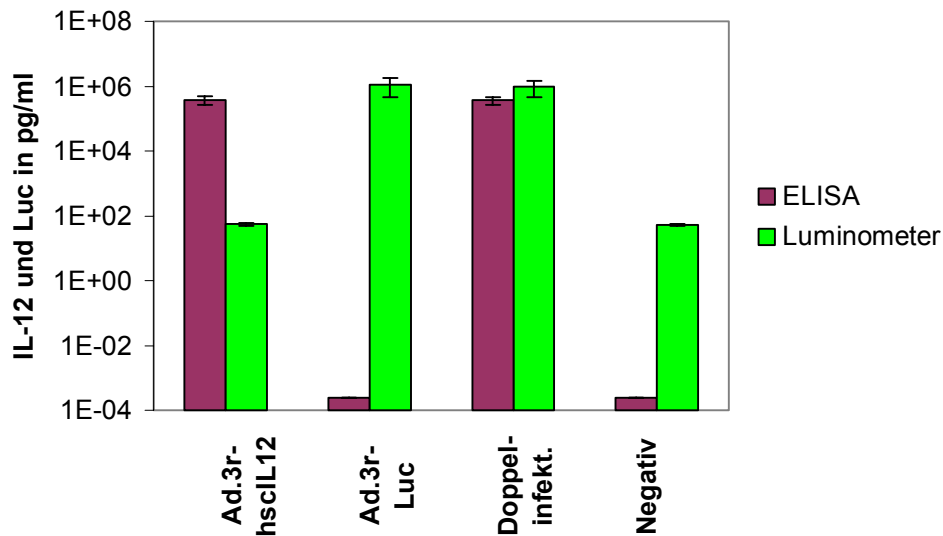


Abb.9: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest in der Zellkultur. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von HT29-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 30 erst einzeln und dann doppelt infiziert wurden. Alle Überstände wurden mit einem hIL12-ELISA (pink) und dem Luminometer (grün) gemessen. Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert von sechs gleich behandelten Kulturen mit der jeweiligen Standardabweichung. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase; Doppelinfekt.: Doppelinfektion; Negativ: Negativkontrolle)

4.3.3 Darstellung des induzierbaren Systems in der Zellkultur

Zur Evaluation der Regulationskapazität des Tet-Off-Systems wurden die humanen Kolonkarzinomzellen (Typ HT29) mit einer Viruskonzentration von 30 m.o.i. mit den Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc infiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Infektion in An- und Abwesenheit von Doxycyclin (2ng/ml) kultiviert. Anschließend wurde mittels hIL12-ELISA und des Luminometers die Genexpression ermittelt. Anhand der durch die Werte von Eichlösungen erhaltenen Funktionen wurden der Interleukin-12- und Luciferase-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt und die Mittelwerte von je 6 gleichbehandelten Kulturen grafisch nebeneinander dargestellt.

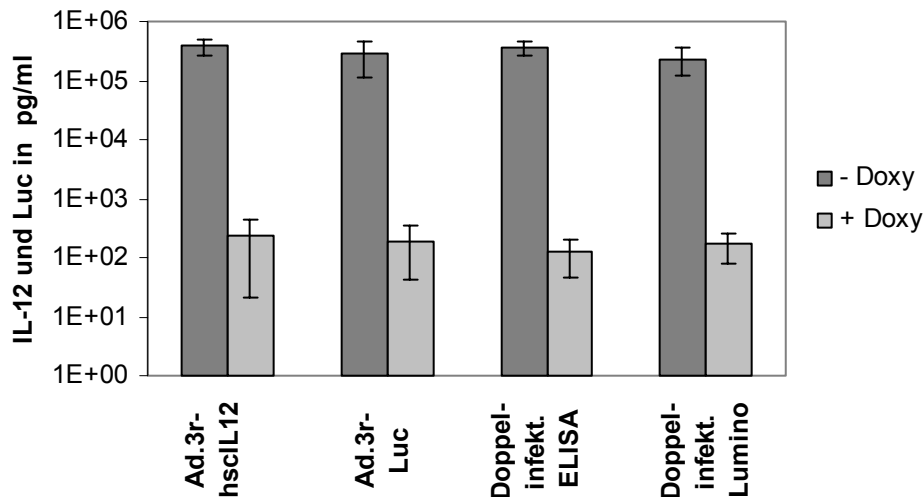


Abb.10: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Zellkultur-Expressionstest in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von HT29-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 30 erst einzeln und dann doppelt infiziert und entweder in Abwesenheit von Doxycyclin (dunkelgraue Säulen) oder mit Doxycyclin (hellgraue Säule) kultiviert wurden. Alle Überstände der Doppelinfektion wurden jeweils mit einem hIL12-ELISA und dem Luminometer gemessen. Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert von sechs gleich behandelten Kulturen mit der jeweiligen Standardabweichung. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase; Doppelinfekt.: Doppelinfektion)

In Anwesenheit von Doxycyclin konnte die Genexpression des Fusionsproteins im Durchschnitt um das 1300fache supprimieren werden. Die maximale Regulationsfähigkeit zeigte sich bei einer fast 5000fachen Suppression und bei einer 500fachen Supprimierung am niedrigsten. Im Zellkulturversuch mit dem Ad.3r-Luc zeigte sich eine durchschnittliche Suppression von 1600, wobei die höchste Regulationsfähigkeit bei fast 5000facher und die niedrigste bei 950facher Suppression lagen. Zur Überprüfung, ob sich beide Vektorensysteme auf der autoregulativen Ebene gegenseitig beeinflussen, wurden in Parallelansätzen HT29-Zellen mit beiden Vektoren gleichzeitig infiziert und mit einem Doxycyclin-haltigen Medium kultiviert. In den Überständen wurden die Expressionsprodukte jeweils mittels eines ELISAs oder des Luminometers gemessen. In Anwesenheit von Doxycyclin kam es beim Ad.3r-hscIL12 zu einer durchschnittlichen Suppression um das 1700fache, wobei die effektivste Regulation bei einer 2530fachen Suppression lag. Die Genexpression der Luciferase konnte durchschnittlich um das 1400fache herunterreguliert werden und erreichte eine maximale Suppression um das 2040fache.

Obgleich leichte Schwankungen in den Regulationsmöglichkeiten der einzelnen Vektoren und der doppelten Infektion zu beobachten waren, sind diese nach statistischen Berechnungen als nicht signifikant ($p=0,08-0,2$) zu betrachten.

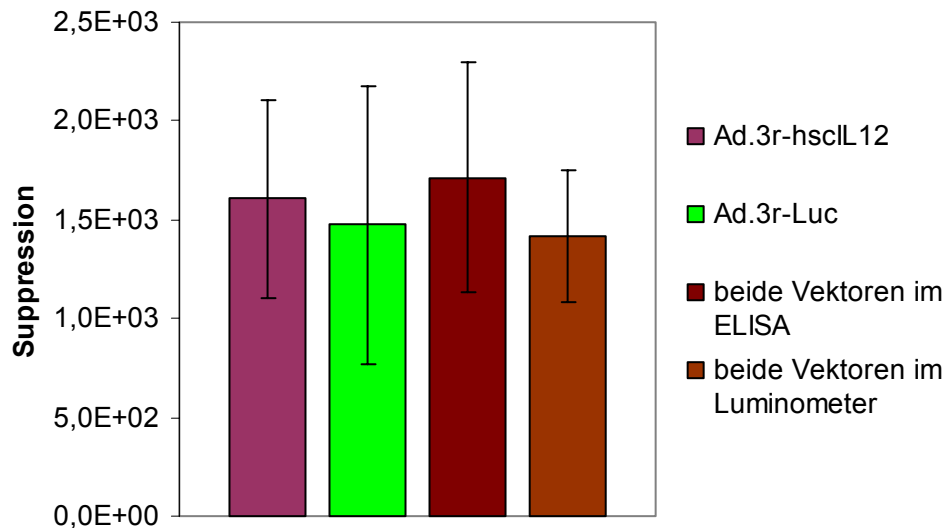


Abb.11: Darstellung der Regulationsmöglichkeiten der Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc bei Einzel und Doppelinfektion. Zur Berechnung wurden die Ergebnisse des Expressionstest aus Abbildung 10 verwendet. Eine Säule zeigt den Quotienten der Mittelwerte von jeweils sechs gleich behandelten Kulturen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin mit der jeweiligen Standardabweichung.

4.4 Ergebnisse der Experimente mit humanem Tumorgewebe

4.4.1 Transfektion des Gewebes mit Ad.RSV.β-Gal

Um die generelle Transduzierbarkeit des Gewebes durch adenovirale Vektoren optisch nachzuweisen, wurden die ersten Tumorbiopsien mit dem Ad.RSV.β-Gal infiziert. Die visuelle Darstellung der Transfektion gibt zusätzliche Informationen über die Invasionstiefe des Vektors in das Gewebe. Dieses ist mit der Auswertung des späteren therapeutischen Vektors nicht möglich und stellt damit eine sinnvolle Ergänzung des Experimentes dar. Die kultivierten Proben wurden nach einer Inkubationszeit mit X-Gal entfärbt. Anschließend wurden die Gewebebiopsien im Pathologischen Institut (Prof. H. Schäfer Pathologisches Institut, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf) zu Schnittpräparaten verarbeitet und mikroskopisch abfotografiert.

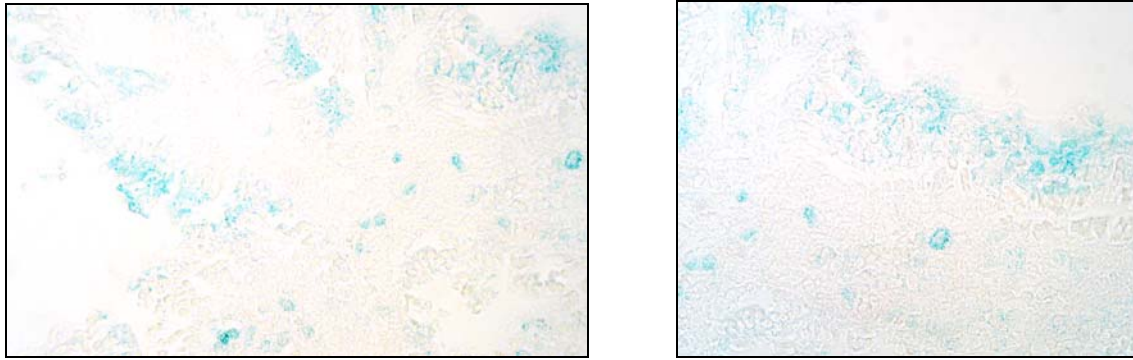


Abb.12: Kolorektales Tumorgewebe nach Transfektion mit dem Ad.RSV.β-Gal und anschließender Entfärbung mit X-Gal. Die erfolgreiche Transfektion (30m.o.i.) ist an der blauen Färbung des Gewebes zu erkennen. H. Schäfer (Pathologisches Institut, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf)

4.4.2 Dosiseskulation

Um die optimale Transfektions- und Regulationskapazität der generierten adenoviralen Vektoren zu testen, wurden die ersten Gewebeproben humanem Kolonkarzinoms mit den Viruskonzentrationen 10, 30, 100 m.o.i. dosiseskaliert. Nach 24stündiger Infektion wurde je ein Triplikat einer m.o.i. in An- und Abwesenheit von Doxycyclin (Doxycyclin enthaltenem Vollmedium 2µg/ml) inkubiert, bevor die IL-12 und Luciferase-Konzentrationen des Überstandes bestimmt wurden. Anhand der durch die Werte von Eichlösungen erhaltenen Funktionen wurde der IL-12 und Luciferase-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt. Der Proteingehalt der Zell-Lysate wurde anhand eines Bioassays ermittelt und direkt auf die Konzentration der Genexpression der einzelnen Proben bezogen. Dies geschah, indem ein Quotient aus der Interleukin-12 Konzentration in pg/ml und dem bestimmten Proteingehalt der gleichen Probe in pg/ml gebildet wurde. Er ermöglicht den Vergleich der einzelnen Proben untereinander. Das Ziel der Dosiseskulation war, die möglichst niedrigste effiziente Viruskonzentration in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin zu bestimmen, um diese als Vorgabe in den weiteren Versuchreihen zu benutzen. Es wurde in den folgenden Experimenten mit einer Viruskonzentration von 10 m.o.i. gearbeitet, da die Dosiseskulation bereits bei dieser Konzentration eine hohe durchschnittliche Interleukin 12 Konzentration ($3,43 \times 10^{-5}$ pg IL-12/pg Protein) zeigte. Unter Verwendung des induzierbaren Systems konnte bei gleicher Konzentration an adenoviralen Vektor eine durchschnittlich 1000fache Supprimierbarkeit der Interleukin 12 -Produktion nachgewiesen werden, welche unter Erhöhung der Viruskonzentration nicht signifikant gesteigert werden konnte.

4.4.3 Darstellung der Transduzierbarkeit Kolonkarzinom-Biopsien

Die im Operationssaal gewonnen Gewebeproben wurden nach Lokalisation der Entnahmestelle streng getrennt. Im Labor wurden mittels einer endoskopischen Biopsiezange an gezielten Orten des Tumormaterials 30-50 Proben entnommen, um möglichst gleich große Biopsien zu den Gewebeproben aus der Endoskopie zu erhalten. Getrennt nach Mukosa, Peripherie und Zentrum des Tumors wurden die Proben mit Doxycyclin enthaltenem Vollmedium (2µg/ml) und einem Vollmedium ohne ein Tetracyclin kultiviert. In beiden Vollmedien befand sich das Antibiotikum Metronidazol (Clont[®]: 0,2mg/ml), um die Bakterienkulturen aus dem verunreinigten Darmtrakt des Patienten zu beseitigen. In einem vorangehenden Experiment wurde nachgewiesen, dass Metronidazol weder auf die Transfektions- noch auf die Regulationseffektivität der Vektoren Einfluss nimmt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Expressionsprodukte IL-12 und Luciferase im Zellüberstand nachgewiesen. Die Biopsie wurde mittels eines Homogenisators zerkleinert und anschließend lysiert. Anhand der durch die Werte von Eichlösungen erhaltenen Funktionen wurde der IL-12- und Luciferase-Gehalt der einzelnen Proben mehrmals bestimmt und rechnerisch gemittelt. Der Proteingehalt der Zelllysate wurde anhand eines Bioassays ermittelt und direkt auf Konzentration der Genexpression die einzelnen Proben bezogen, indem ein Quotient aus der Interleukin-12- und Luciferase Konzentration in pg/ml und dem bestimmten Proteingehalt in pg/ml der selben Probe gebildet wurde. Dies ermöglichte den Vergleich der einzelnen Proben untereinander. Im Durchschnitt wurde bei der Transfektion des Tumorgewebes $3,72 \times 10^{-5}$ pg und der intakten Mukosa $4,3 \times 10^{-5}$ pg von humanen Interleukin-12 auf 1 pg Proteinmenge gemessen. Die höchsten Mengen von messbarer Interleukin-12-Produktion lagen im Tumorgewebe bei $1,12 \times 10^{-4}$ pg und in der Mukosa bei $1,26 \times 10^{-4}$ pg jeweils bezogen auf 1 pg Proteinmenge. Die Transfektionswerte wurden sowohl innerhalb des Patientenkollektives, der Gewebelokalisationen und zwischen den verwendeten Vektoren verglichen. Anhand eines T-Testes wurde ermittelt, ob es sich bei der Streuung der Transfektionswerte um signifikante Unterschiede handelt. Im Vergleich der Transfektionsdaten der verschiedenen Gewebearten (intakte Mukosa, Tumorgewebe der Peripherie und des Zentrums) zeigte sich durchgehend eine geringfügig höhere Konzentrationen an exprimiertem Genprodukt in der intakten Mukosa. Nach statistischer Berechnung besteht für diese Beobachtung jedoch keine Signifikanz. Die p-Werte des T-Testes sind in der Tabelle 2 in Kapitel 4.4.4 zusammen mit den Suppressionswerten dargestellt.

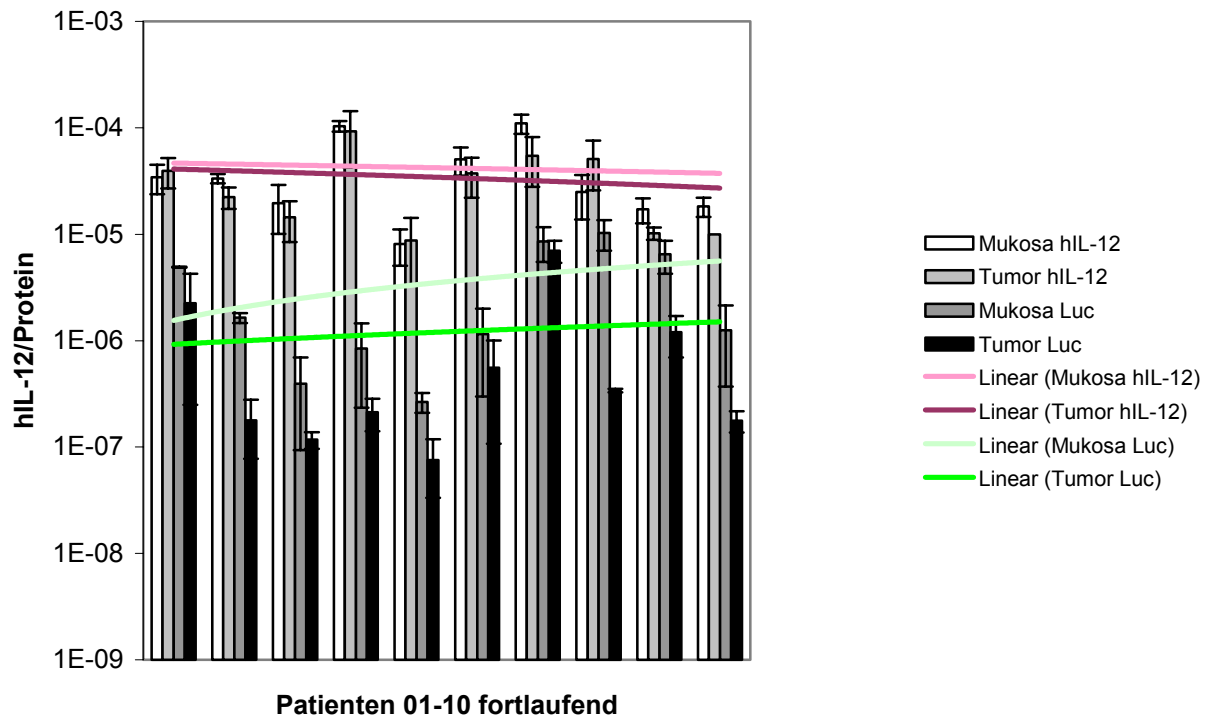


Abb.13: Die hIL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von Mukosa- und Kolonkarzinomgewebe-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 10 infiziert (IL-12: pinke Säulen; Luc: grüne Säulen) und kultiviert wurden. (hIL-12/Protein bzw. Luc/Protein) Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert aller Ergebnisse gleichen Gewebes (Mukosa oder Tumor) von identisch behandelten Kulturen und die dazugehörige Standardabweichung. Zum besseren Vergleich der Vektoren untereinander wurde für die verschiedenen Gewebelokalisationen zum zugehörigen Vektor die lineare Trendlinie dargestellt. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase)

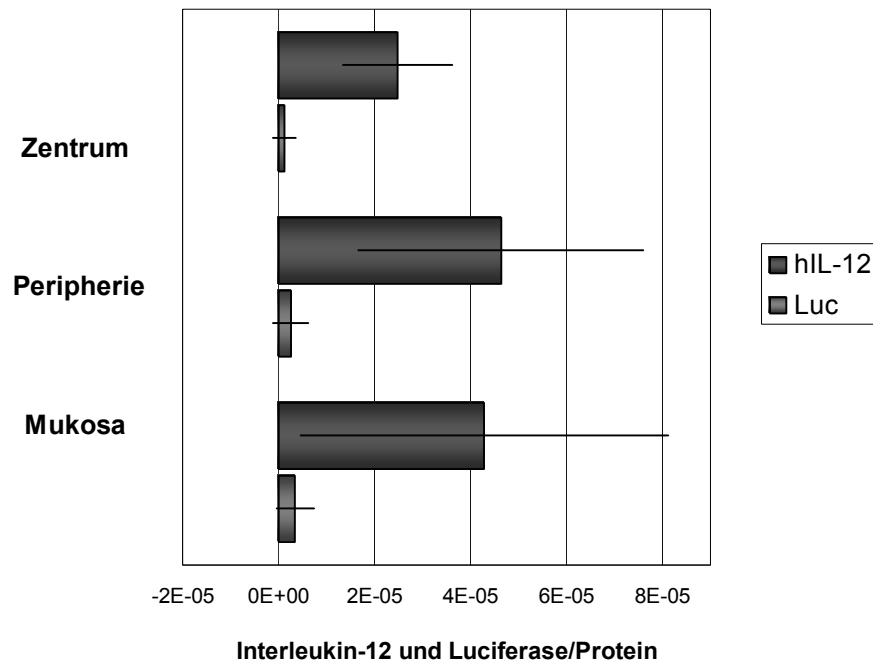


Abb.14: Die Mittelwerte der hIL-12-Konzentration und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände der Mukosa- und Kolonkarzinomgewebe-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 10 infiziert wurden. (hIL-12 bzw. Luc/Protein) Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert der aller Proben gleicher Entnahmestelle der identisch behandelten Kulturen. Die Standardabweichungen sind zur besseren Darstellung der intermediären Varianz mit schwarzen Balken dargestellt. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase)

Aus den Vergleichswerten wurde die Ratio ermittelt. Die Ergebnisse von Mukosa zu Tumor und Peripherie zum Zentrum des Tumors wurde für jeden Patienten und getrennt für beide Vektoren durch einen Quotient berechnet. Um die beiden Vektoren hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz in den verschiedenen Gewebelokalisationen besser vergleichen zu können, wurden diese zueinander ins Verhältnis gestellt und mit den Suppressionsergebnissen in Kapitel 4.4.4 (Abb.22) grafisch dargestellt.

Abb.15: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektionseffizienz von Mukosa zu Tumorgewebe beider Vektoren. Eine Ratio über 1 deutet auf eine bessere Transfizierbarkeit der Mukosa hin.

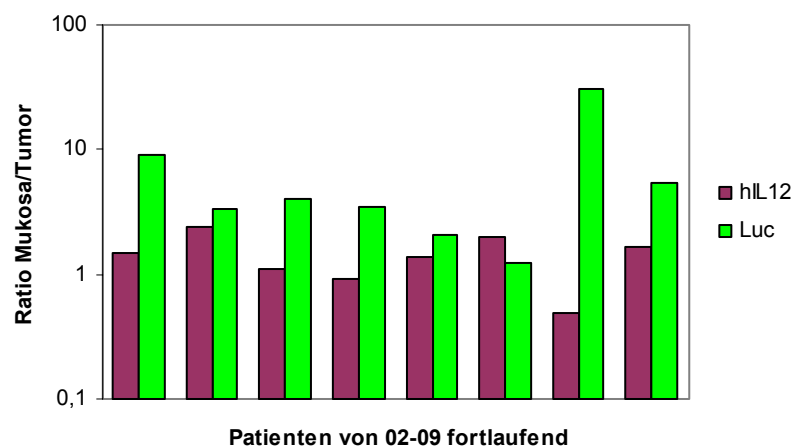
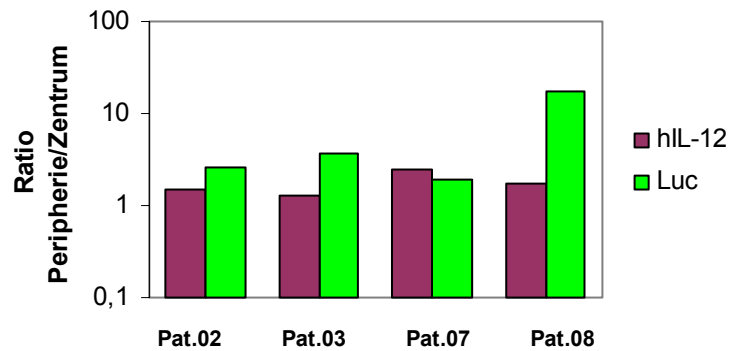


Abb.16: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektionseffizienz von vitalen Tumorgewebe (Peripherie) zum Zentrum des Tumors beider Vektoren.

Eine Ratio über 1 deutet auf eine bessere Transfizierbarkeit des vitalen Tumorgewebes hin.



4.4.4 Anwendung des induzierbaren Systems bei humanen Kolonkarzinom-Biopsien

Wie in Kapitel 4.4.3 erwähnt, wurde die Hälfte der Proben mit einem Doxycyclin enthaltenem Vollmedium (2µg/ml) kultiviert und mit den anderen Proben gleich behandelt. Ebenfalls wurde aus den Gewebeteilen ein Zell-Lysat erstellt und die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Bioassays ermittelt. Hierbei wurden die Gewebeproben wieder streng nach Mukosa, Peripherie und Zentrum des Tumors getrennt. Das Maß für die Regulationseffizienz war der Quotient aus der Konzentration der Expressionprodukte in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin: Die Suppression. Die höchsten Suppressionswerte wurden in der Mukosa mit über 10-20000facher Regulationsfähigkeit und mit über 8000facher Suppression im Tumorgewebe erreicht. Die niedrigsten Regulationswerte lagen um eine 200-500fache Suppression. Die Suppressionswerte wurden sowohl innerhalb des Patientenkollektives, den Gewebelokalisationen und unterhalb der verwendeten Vektoren verglichen. Anhand eines T-Testes wurde ermittelt, ob es sich bei der Streuung der Suppressionswerte um signifikante Unterschiede handelt.

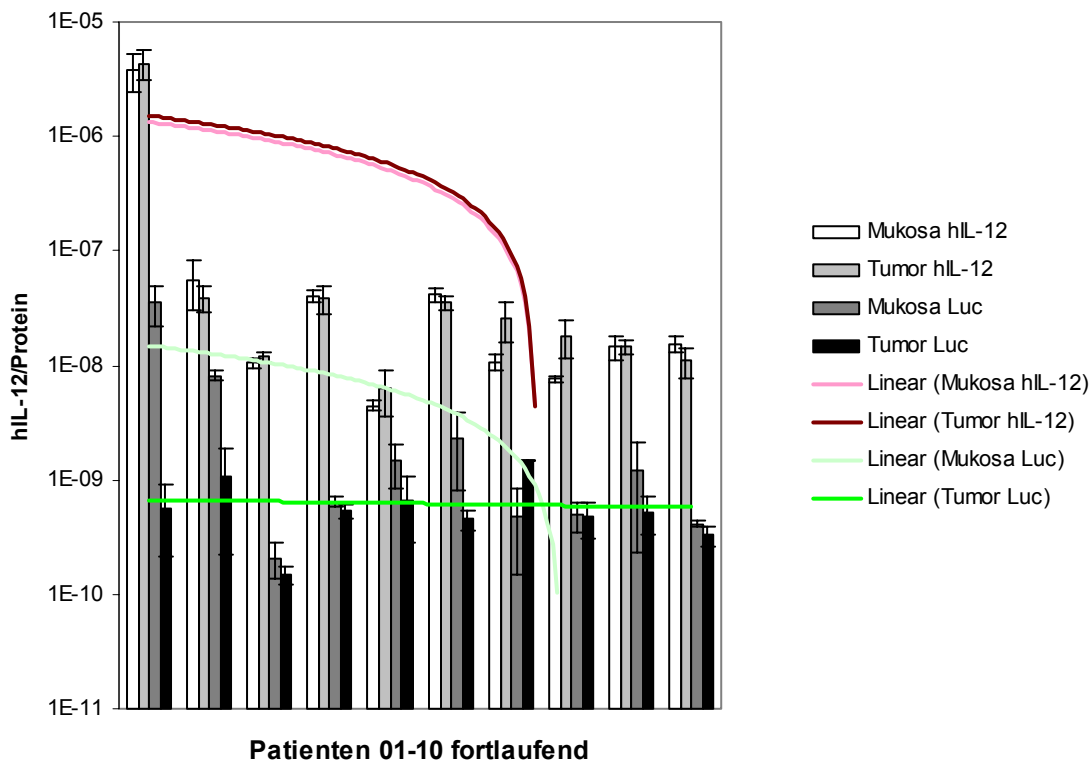


Abb.17: Die hIL-12 und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen unter Anwesenheit von Doxycyclin. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von Mukosa- und Kolonkarzinomgewebe-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 10 infiziert und in Anwesenheit von Doxycyclin (IL-12: pinke Säulen; Luc: grüne Säulen) kultiviert wurden. (hIL-12/Protein bzw. Luc/Protein) Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert aller Ergebnisse gleichen Gewebes (Mukosa oder Tumor) von identisch behandelten Kulturen und die dazugehörige Standardabweichung. Zum besseren Vergleich der Vektoren untereinander wurde für die verschiedenen Gewebelokalisationen zum zugehörigen Vektor die lineare Trendlinie dargestellt. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase)

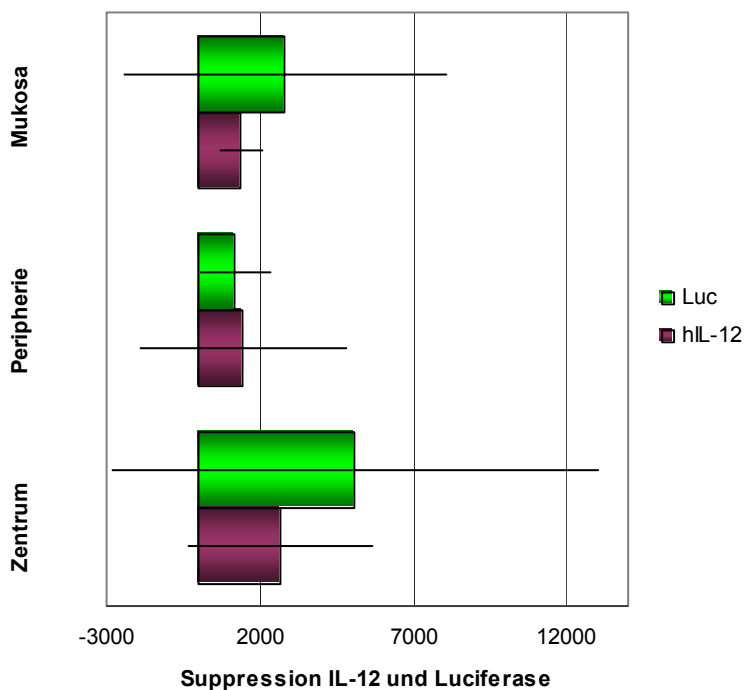


Abb.18: Darstellung der Mittelwerte der Regulationsergebnisse der Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc in Anwesenheit von Doxycyclin. Zur Berechnung der Suppressionen wurden die Ergebnisse des Expressionstest verwendet. Eine Säule steht für den Quotienten der Mittelwerte aus An- und Abwesenheit von Doxycyclin von jeweils allen Proben der identischen Gewebelokalisation. Die Standardabweichungen sind zur besseren Darstellung der intermediären Varianz mit schwarzen Balken dargestellt. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase)

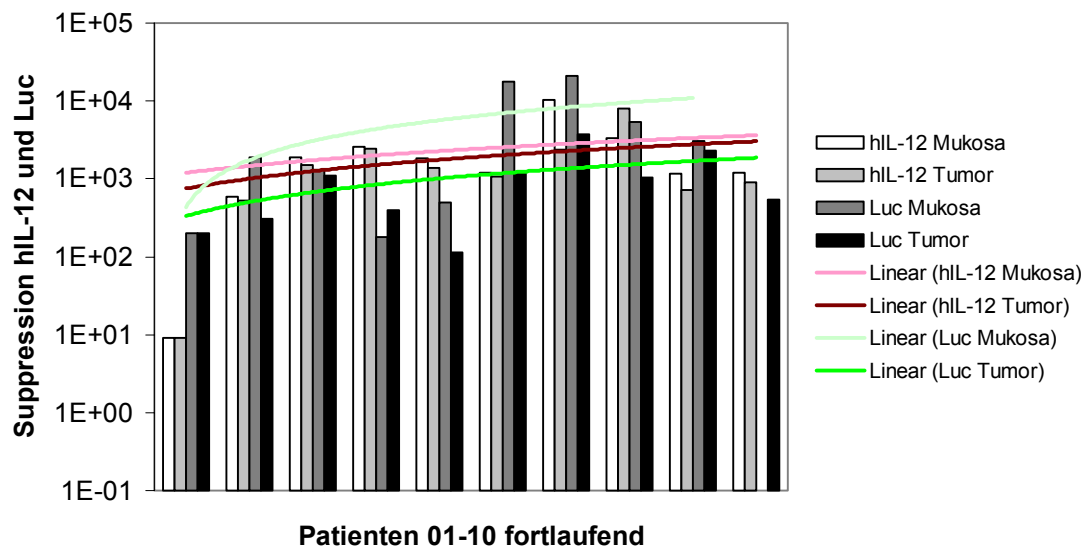


Abb.19: Die Suppressionswerte aus dem Expressionstest unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Zur Berechnung der Suppressionen wurden die Ergebnisse des Expressionstest aus Abbildung 13 verwendet. Eine Säule steht für den Quotienten der Mittelwerte aus An- und Abwesenheit von Doxycyclin von jeweils allen Proben eines Patienten einer Gewebelokalisation (Mukosa oder Tumor). Zum besseren Vergleich der Vektoren untereinander wurde für die verschiedenen Gewebelokalisationen zum zugehörigen Vektor die lineare Trendlinie dargestellt. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase)

Ergebnisse der T-Tests (p-Werte)			
	Mukosa zu Tumor	Peripherie zu Zentrum	Ad.3r-hscIL12 zu Ad.3r-Luc
1 Transfektionen			
Interleukin-12	1,47E-01	3,47E-01	1,81E-03
Luciferase	6,97E-02	3,26E-01	
2 Supprimierbarkeit			
Interleukin-12	1,85E-01	1,53E-01	4,15E-01
Luciferase	6,29E-02	2,69E-01	

Tabelle 2: Darstellung der Ergebnisse der T-Test in p-Werten. Verglichen wurden die Datenreihen der Transfektion in 1.Abwesenheit (Transfektion) und 2.Anwesenheit (Suppression) der verschiedenen Gewebelokalisationen und der Vektoren untereinander. Ein p-Wert unter 0,05 (5,0E-02) deutet auf signifikante Unterschiede der Datenreihen hin.

Aus den Vergleichswerten wurde die Ratio ermittelt. Aus den Werten von Mukosa zu Tumor und Peripherie zum Zentrum des Tumors wurde für jeden Patienten und getrennt für beide Vektoren der Quotient berechnet. Um erfassen zu können, ob die Streuungen der Suppression in Anwesenheit von Doxycyclin im selben Maße beide Vektoren betreffen, wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Ratio berechnet und mit den Ratio-werten der Transfektion aus Kapitel 4.4.3. für die jeweiligen Gewebelokalisationen (Mukosa, Peripherie und Zentrum des Tumors) grafisch dargestellt.

Abb.20: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Supprimierbarkeit beider Vektoren unter Anwesenheit von Doxycyclin bei Mukosa zu Tumorgewebe. Eine Ratio über 1 deutet auf eine bessere Supprimierbarkeit in der Mukosa hin.

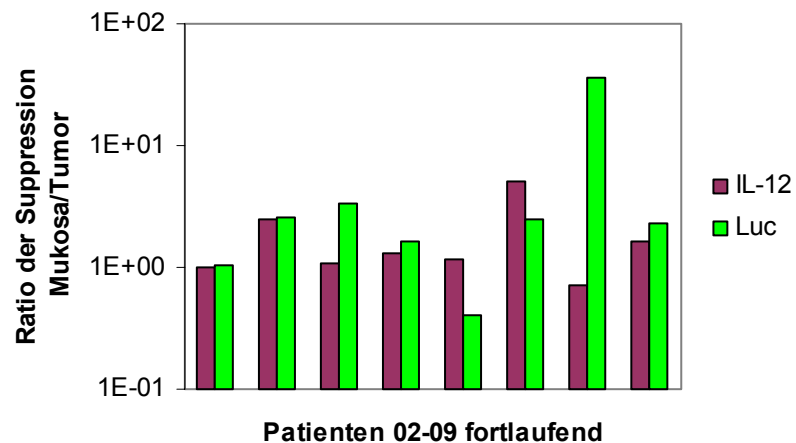


Abb.21: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Supprimierbarkeit beider Vektoren unter Anwesenheit von Doxycyclin bei vitalem Tumorgewebe (Peripherie) zu Tumorzentrum. Eine Ratio über 1 deutet auf eine bessere Supprimierbarkeit im vitalen Tumor.

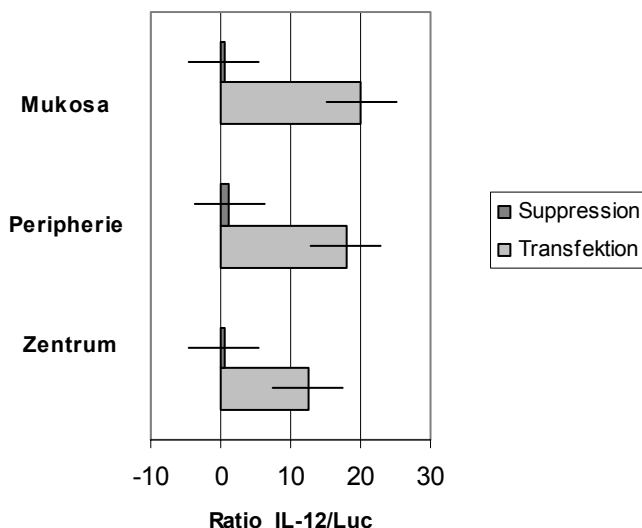
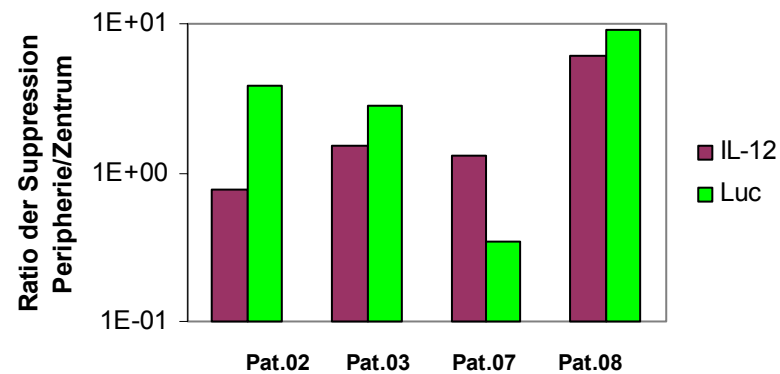


Abb.22: Mittelwertdarstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektions- und Suppressionsergebnisse der beiden Vektoren (Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc) zueinander.

4.4.5 Darstellung der Transduzierbarkeit und Supprimierbarkeit von Metastasengewebe der Leber

Das Interesse an der Transfektionsmöglichkeit von Lebermetastasengewebes ist groß, da es sich beim kolorektalen Karzinom meist um solitäre Lebermetastasen handelt, die in einer späteren klinischen Studie mittels Leberpunktion einer lokalen intratumoralen Injektion zugänglich wären. Die gewonnenen Biopsien aus dem Lebermetastasengewebe wurden wie die Biopsien aus dem Primärtumor und der Mukosa nach mehrfacher Reinigung mit einem Metronidazol-haltigen Medium mit und ohne Doxycyclin kultiviert. In allen Schritten (Infektion, Inkubation, Berechnung und Auswertung) wurde das Metastasengewebe identisch behandelt, um einen direkten Vergleich zu den Ergebnissen des Primärtumorgewebes und der gesunden Schleimhaut ziehen zu können. Die durchschnittliche Genexpression des Fusionsproteins hIL-12 lag bei einer Konzentration von $1,31 \times 10^{-5}$ pg bezogen auf eine Proteinmenge von 1 pg. Die Daten der Transfektion des Metastasengewebes wurden mittels des T-Testes mit den Ergebnissen des Primärtumors verglichen. Die errechneten p-Werte (IL-12: 0,11 und Luc: 0,4) des T-Testes bestätigten, dass es sich bei den Transfektionsergebnissen um keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Primärtumorgewebe und dem Metastasengewebe handelt. Die durchschnittliche Regulationeffizienz zeigte sich bei einer 1880fachen Suppression. Sie liegt damit oberhalb des Durchschnittes des Primärtumorgewebes (1445fache Suppression).

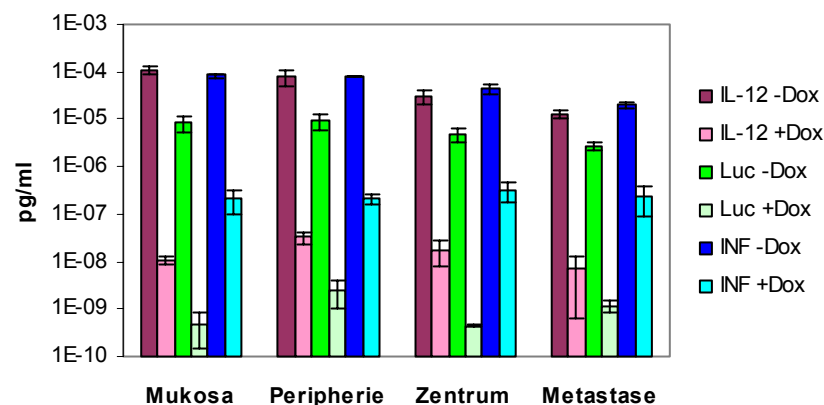


Abb.23: Die IL-12-, Luciferase- und Interferon-γ-Konzentration aus dem Expressionstest von Lebermetastasengewebe unter Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin. Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von Mukosa-, Primärtumor- und Lebermetastasen-Kulturen, die durch Ad.3r-hscIL21 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 10 infiziert wurden. Anschließend wurden humane Lymphozyten mit dem exprimierten Fusionsprotein zur Interferon-Ausschüttung stimuliert. Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert von drei gleich behandelten Kulturen mit der jeweiligen Standardabweichung. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase; INF-γ: Interferon-γ; Dox: Doxycyclin)

4.4.6 Darstellung der Transduzierbarkeit und Supprimierbarkeit von dysplastischen Gewebe

Da im Rahmen dieser Arbeit auch der Vergleich von Tumorgewebe verschiedener histologischer Grading-Einstufungen von Interesse war, wurde ebenfalls dysplastisches Gewebe (G1) transfiziert. Die gewonnenen Biopsien aus dem dysplastischen Gewebe wurden mit den Biopsien aus dem Primärtumor und der Mukosa identisch behandelt, um einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen des Primärtumorgewebes und der gesunden Schleimhaut ziehen zu können. Die durchschnittliche Genexpression des Fusionsproteins hIL-12 lag bei einer Konzentration von 1×10^{-5} pg bezogen auf eine Proteinmenge von 1 pg. Die Transfektionswerte wurden mittels des T-Testes mit den Ergebnissen im Primärtumor verglichen. Die errechneten p-Werte (IL-12: 0,09 und Luc: 0,24) des T-Testes bestätigten, dass es sich bei den Transfektionsergebnissen um keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Primärtumorgewebe und dem dysplastischen Gewebe handelt. Die durchschnittliche Regulationseffizienz der Expression von Interleukin-12 zeigte sich bei einer 909fachen Suppression. Damit liegt diese etwas unter dem Mittelwert des Primärtumorgewebes von einer 1445,32fachen Suppression.

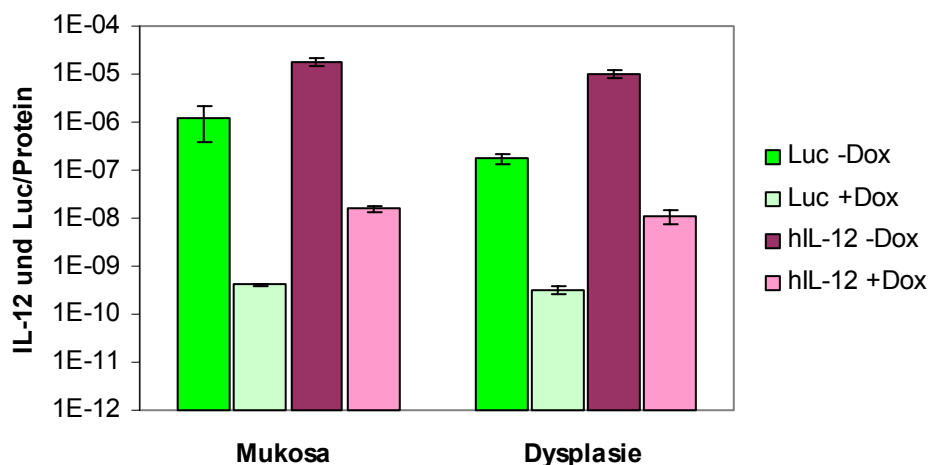


Abb.24: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest von dysplastischen Gewebe unter Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin Die halblogarithmische Grafik zeigt die Überstände von Mukosa- und dysplastischen Gewebekulturen, die durch Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc mit einer m.o.i. von 10 infiziert und entweder in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert wurden. Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert von drei gleich behandelten Kulturen mit der jeweiligen Standardabweichung. (hIL-12: humanes Interleukin-12; Luc: Luciferase; Dox: Doxycyclin)

4.5 Stimulation humaner Lymphozyten mit Interleukin-12

Zum Nachweis der Bioaktivität des exprimierten Interleukin-12 wurden humane Lymphozyten mit dem Fusionsprotein stimuliert. Dazu wurden geeignete Ansätze von drei verschiedenen Patienten evaluiert, unter anderem auch aus dem Überständen der Lebermetastasenkultur. Es wurden die gleichen Kulturen aus den Expressions- und Suppressionstests (Kapitel: 4.4.2-4.4.4) für die Ansätze in einem Bioassay verwendet. Die Ansätze wurden ebenfalls nach Entnahmestelle (Mukosa, Peripherie und Zentrum des Tumors) getrennt. Die daraus resultierenden Überstände der Lymphozytenkulturen wurden in einem INF- γ -ELISA einer Einfachmessung unterzogen. Anhand der durch die Werte der Eichlösung enthaltenen Funktionen wurde der INF- γ -Gehalt der einzelnen Proben bestimmt und die Mittelwerte von den gleichbehandelten Kulturen grafisch nebeneinander dargestellt.

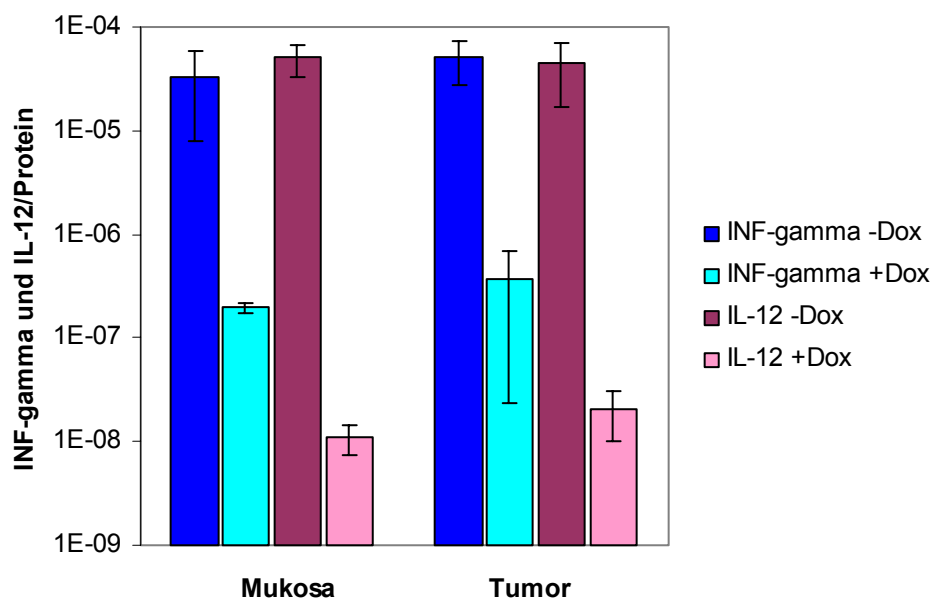


Abbildung 25: Darstellung der Interferonausschüttung unter Stimulierung humaner Lymphozyten mit dem Fusionsprotein hIL-12. Gezeigt sind die Mittelwerte der Pat. 07-09 in Anwesenheit (+) (INF:hellblau, IL-12:rosa) und Abwesenheit (-) von Doxycyclin (INF:dunkelblau, IL-12: pink). Eine Säule zeigt jeweils den Mittelwert von drei gleich behandelten Kulturen mit der jeweiligen Standardabweichung. (Dox: Doxycyclin; INF: Interferon; hIL-12: humanes Interleukin-12)

Nach der Beziehung der INF- γ Ausschüttung auf den Proteingehalt, wurden die INF- γ -Konzentrationen in Bezug zur Transfektion der behandelten Proben gesetzt. Ebenfalls wurden auf Unterschiede bezüglich der Entnahmestellen geachtet.

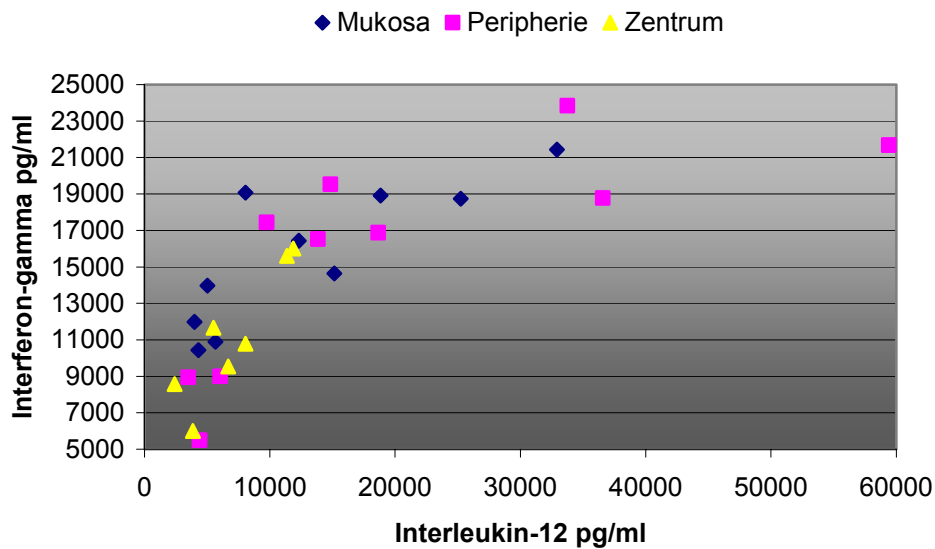


Abb.26: Humanes Interferon- γ aus dem Bioassay im Verhältnis zum eingesetzten hIL-12. Die Grafik zeigt die aus dem Bioassay erhaltenen INF- γ -Mengen (Y-Achse) gegen die jeweils eingesetzte hIL-12-Menge (X-Achse) aus den Überständen der Gewebekulturen. Dabei werden die Mukosa, die Peripherie (vitalen Tumorgewebe) und das meist nekrotische Zentrum des Tumors getrennt betrachtet.

4.6 Statistische Erhebung der Individualdaten der Patienten

Für den Vergleich von individuellen Unterschieden in Bezug auf die erhobenen Daten in den Experimenten wurden verschiedene Kriterien betrachtet:

1. Zur Person: Alter und Vorerkrankungen
2. Zum Primärtumor: Größe, Lokalisation und Histologie
3. Zum Wachstum: Wachstumsart und Metastasierung

Die gewonnenen Daten aus dem Patientenkollektiv wurden für jedes einzelne Kriterium in zwei verschiedene Gruppen unterteilt und anhand eines T-Testes auf signifikante Unterschiede bezüglich der Transfektionseffizienz geprüft. Die p-Werte der beiden Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc wurden getrennt berechnet. Hierbei entspricht ein p-Wert unter 0,05 einem signifikanten Unterschied der verglichenen Daten

Kriterien	Gruppe 1	Gruppe 2	p-Werte hIL12	p-Werte Luciferase
1. Zur Person				
Alter in Jahren	60-69	70-80	1,71E-01	4,00E-01
Vorerkrankungen (kardiopulmo)	Nein	Ja	2,72E-02	1,52E-01
2. Zum Primärtumor				
Größe in ca. cm ²	0-29	30-60	7,99E-02	1,90E-01
Lokalisation	Rektum	Sigma	2,81E-01	5,54E-02
Histologie (Grading)	G1-G2	G3-G4	2,43E-01	1,21E-01
3. Zum Wachstum				
Wachstumsart	lokalisiert	Semi/circulär	3,63E-01	2,00E-01
Metastasierung	Nein	Ja	4,29E-01	1,82E-01

Tabelle 3: Darstellung der errechneten Werte aus den T-Tests für die Interleukin-12 (hIL-12) und den Luciferasewerte, welche jeweils gemäß der oben genannten Kriterien verglichen wurden. Ein p-Wert unter 0,05 (5,0E-02) entspricht einer Signifikanz.

4.7 Immunhistologischen Färbung des Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor

Die Regulationskapazität des autoregulativen Systems erwies sich in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich.^{106,107} Es konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression eines in einem Adenovirus integrierten Expressionssystems zusätzlich von der Empfänglichkeit einer Zell-

linie für die adenovirale Infektion abhängt. Die Affinität der adenoviralen Vektoren ist abhängig von der Expression spezifischer, zelleigener Proteine wie Integrin- α V β 3 und α V β 5, aber vornehmlich von der Präsenz des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors.¹⁰⁸ Je mehr CAR-Moleküle auf der Zelloberfläche vorliegen, desto effizienter ist der Gentransfer des Adenovirus in die Zelle. Bei einigen Patienten mit größeren Tumoren wurde zusätzlich vitales Tumorzellgewebe und intakte Schleimhaut zur immunhistochemischen Untersuchung entnommen. Anhand dieser Proben sollte die Dichte des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors bestimmt werden und zwischen Tumorgewebe und intakter Schleimhaut verglichen werden. Es wurden Gewebestücke in flüssigem Stickstoff eingefroren und später mittels Kryo-Sektion geschnitten. Ein Schnitt jeder Probe wurde in Hämatoxylin (HE)-Technik gefärbt. Die restlichen Gewebeschnitte wurden mit dem mouse IgG1 monoklonalen Antikörpern Anti-CAR in 1 μ g/ml TBS und 1% FCS behandelt und mit 5 μ g/ml eines rabbit anti-mouse IgG inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-(APAAP)-System behandelt. Folgend wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin entfärbt. (Red Staining) und anschließend mit dem Envision-Horseradish-Peroxydase-System behandelt (Brown Staining). Der entstandene braun gefärbte Kryo-Schnitt markiert ausschließlich den CA-Rezeptor der Zellen und lässt einen guten Vergleich der Dichte des Rezeptors in den unterschiedlichen Geweben zu.

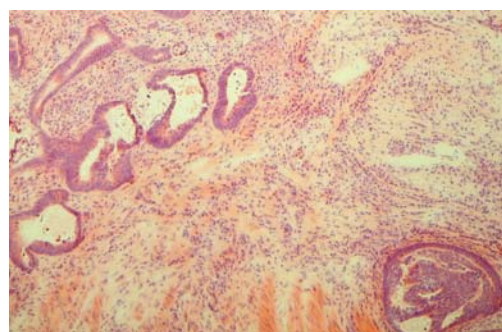
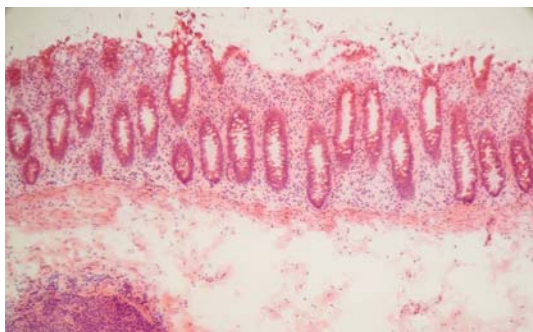


Abb.27: HE-Färbung eines gesunden kolorektalen Abschnittes (linkes Bild) des Menschen und
Abb.28: HE-Färbung eines kolorektalen Karzinoms (rechtes Bild) des Menschen

H. Schäfer (Pathologisches Institut, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf)

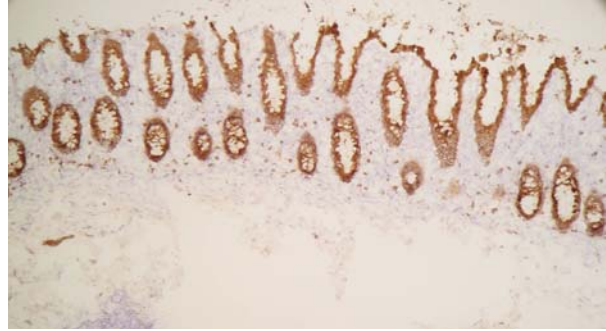
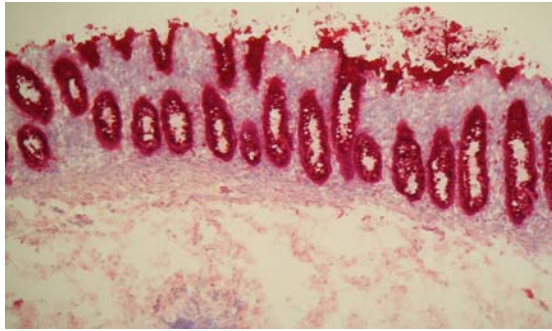


Abb.29: Red staining mit Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-System (APAAP) eines gesunden kolorektalen Abschnittes des Menschen und

Abb.30: Brown staining mit Envision Horseradish Peroxidase System eines gesunden kolorektalen Abschnittes des Menschen

H. Schäfer (Pathologisches Institut, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf)

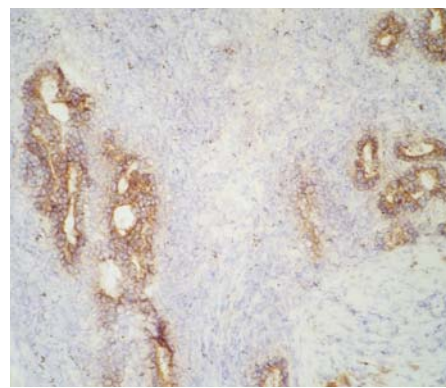
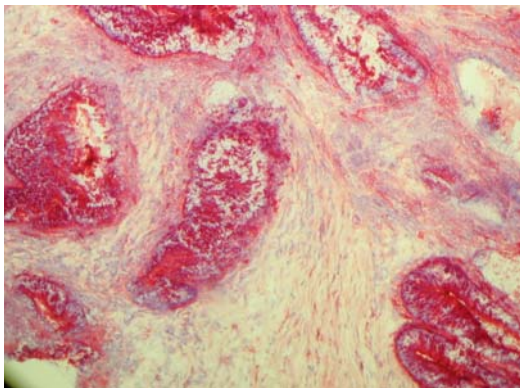


Abb.31: Red staining mit Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-System (APAAP) eines kolorektalen Karzinoms des Menschen und

Abb.32: Brown staining mit Envision Horseradish Peroxidase System eines kolorektalen Karzinoms des Menschen

H. Schäfer (Pathologisches Institut, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf)

5 Diskussion

5.1 Gründe für eine Gentherapie am kolorektalen Karzinom

5.1.1 Therapeutische Sicht

Das Kolonkarzinom ist in Deutschland das zweithäufigste Karzinom des Mannes und das dritthäufigste der Frau. Somit entwickelt jeder 20. Deutsche (5%) im Laufe seines Lebens ein kolorektales Karzinom, die Inzidenz nimmt in Industrieländern stetig zu. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist bei 25% der Patienten das Karzinom meist metastasiert. Die therapeutischen Optionen sind bis zum heutigen Zeitpunkt überwiegend chirurgisch oder chemotherapeutisch. Hierbei lassen sich häufig die Entfernung großer Abschnitte des Darmes, die Mitentfernung adhärenter Organe und ggf. das Anlegen eines Anus praeter nicht verhindern. Diese Maßnahmen bedingen eine Minderung der Lebensqualität. Bei dem chirurgischen Verfahren handelt es sich damit immer um eine „große Bauch-OP“, die eine enorme Belastung für den geschwächten Körper des Patienten darstellt. Bei einem durchschnittlichen Prädispositionsalter von 65 Jahren, befindet sich der größte Anteil der Patienten im letzten Lebensdrittel. Die allgemeinen Risiken einer Operation sowie der Anästhesie sind bereits höher anzusetzen. Nach den momentanen Erkenntnissen ist jedoch die operative Therapie des kolorektalen Karzinoms noch lange nicht wegzudenken, sondern in vielen Fällen essentiell für das Langzeitüberleben des Patienten. Durchaus diskutierbar sind die neoadjuvante Therapie im Sinne einer Tumorregression vor OP und die adjuvante Therapie, welche häufig palliativer Natur ist. Beide Begleittherapien (neo-, adjuvant) setzen sich aus entweder aus Radio-, Chemotherapien oder der Kombination beider Therapien zusammen. Die Applikation einer Chemotherapie ist meist systemisch und birgt das Risiko der Entstehung anderer Zellentartungen, vor allem des blutbildenden Systems. Die Radiotherapie verursacht erfahrungsgemäß zusätzliche lokale und systemische Beschwerden in Form von Entzündungen, Verbrennungen und Vernarbungen. Im Anschluss an die klassische neoadjuvante Therapie muss sich der geschwächte Patient einem großen operativen Eingriff unterziehen. Bei der adjuvanten Therapie stellt sich das Problem, einen postoperativen geschwächten Patienten mit aggressiven Medikamenten oder belastender Strahlentherapie zu behandeln. Oft ist schon aus Gründen des Wundheilungsprozesses eine adjuvante Therapie nicht im direkten Anschluss an die operative Therapie möglich. Der Patient verliert wertvolle Zeit zwischen der Haupt- und der Anschluss-

Therapie. Neuere Studien konnten zeigen, dass das mittlere Langzeitüberleben von Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom auch unter modernster Chemotherapie mit Medikamenten wie Irinotecan und Oxaliplatin nur 12-20 Monate beträgt. In anderen chemotherapeutischen Studien, wie z.B. einer Phase-III-Studie der AIO zur Entwicklung eines neuen Chemotherapie-Regimes, in der 5FU/FA durch Carpecicabin ersetzt wird, unterscheiden sich die Gesamtüberlebensraten nicht signifikant von den klassischen Chemotherapien. Die derzeitigen Studienergebnisse lassen vermuten, dass von der radio- und chemotherapeutischen Therapie derzeit keine entscheidenden Neuerungen zu erwarten sind, weshalb das Interesse der Onkologen neuen Therapieansätzen gilt: Seit kurzer Zeit sind gezielte Therapien gegen spezifische Tumorzellmoleküle, wie zum Beispiel gegen Rezeptoren, zur Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika zugelassen. Zu den Erfolgreichsten gehören monoklonale Antikörper, wie Cetuximab und Bevacizumab, die in klinischen Studien das mittlere Überleben von Patienten mit metastasierten soliden Tumoren steigerten.^{109,110} Zu den innovativsten Hoffnungsträgern gehört die Gentherapie. Wenn es gelänge, die systemischen Begleithapien durch eine lokale gentherapeutische Behandlung zu verdrängen, wäre dies in der Therapie des kolorektalen Karzinoms ein entscheidender Durchbruch. Durch das bessere Allgemeinbefinden des Patienten könnte die Zeit zwischen Haupt- und Begleithherapie minimiert und somit möglicherweise der therapeutische Erfolg erhöht werden. Da es sich beim kolorektalen Karzinom um einen Tumor handelt, der in einer natürlichen Körperöffnung des Menschen wächst, weist er neben den therapeutischen und histopathologischen Argumenten (Kap.5.1.2) einen weiteren entscheidenden Vorteil auf, nämlich die Erreichbarkeit mit dem Endoskop. Die endoskopische Untersuchung stellt einerseits eine elegante Methode dar, direkt an den Tumor zu gelangen, und ist andererseits kein zusätzlicher Eingriff, da diese im Rahmen der Diagnostik und Nachsorge zum Standard gehört.

5.1.2 Zellbiologische Sicht

Für eine erfolgreiche Gentherapie müssen vor allem wichtige Rahmenbedingungen auf der Zellebene des Tumors erfüllt sein. Die wichtigsten Voraussetzungen für eine effektive Transfektion eines adenoviralen Vektors in die Zielzelle sind neben der Expression von Proteinen wie Integrin- α V β 3 und α V β 5 vor allem die ausreichende Präsentation des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR). CAR vermittelt die erste Bindung des Adenovirus an die Zielzelle, während die Integrine für die Internalisierung des Virus in die Zelle verantwortlich sind. Eine Reihe von Studien haben die Expressionshöhe von CAR und die adeno-

virale Zellbindung, Zellinfektion und die Transgen-Expression in einer positiven Relation zueinander beobachtet.^{111,112} Die Bedeutung des CAR in der initialen Bindung konnte eindeutig gezeigt werden, indem infektionsresistente Zellen durch die Transfektion mit einem CAR-exprimierenden Plasmid adenoviral infizierbar wurden.^{113,114,115} In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistologischer Methoden nachgewiesen, dass die Kolonkarzinom-Zellen für die Infektion benötigten CA-Rezeptor in ausreichend hoher Dichte repräsentiert. Folglich ist davon auszugehen, dass der überwiegende Teil der Genfäden auch eine „Andockstelle“ an der Zellmembran der Zielzelle vorfindet. Die verwendeten adenoviralen Vektoren zeigten in vorangehenden Experimenten auch bezüglich der Regulationskapazität in verschiedenen Zelllinien große Differenzen. Es wurde nachgewiesen, dass vor allem humane Kolonkarzinomzellen (HT29) im Vergleich zu anderen Zelllinien eine beeindruckende Genregulation zeigen.¹¹⁶

5.2 Gründe für die adenovirale Gentherapie

5.2.1 Eignung des verwendeten Vektor

Als Vehikel beziehungsweise Vektoren für den Gentransfer können defiziente Viren, Bakteriophagen und geeignete Plasmide dienen, die mit den isolierten DNA-Fragmenten des therapeutischen Gens zuvor *in vitro* kombiniert wurden. Die heutige Gentherapie bedient sich zunehmend des viralen Gentransfers. Adenoviren sind als Vektor der aussichtsreichste Kandidat der Virotherapeuten, da sie eine hohe Infektionseffizienz bei Tumorzellen *in vivo* zeigen, ohne sich dabei stabil in das Wirtsgenom zu integrieren. Vorteilhaft ist die daraus resultierende zeitliche Limitierung der Expression des therapeutischen Genproduktes auf zwei Wochen, da eine dauerhafte oder langfristige Expression in der onkologischen Gentherapie nicht erwünscht ist. Mit dem Ad.3r-hscIL12 wurde ein Virus generiert, das auf einem sehr hohen Level bioaktives Interleukin-12 exprimiert. Die dargestellte hohe Genexpression wurde durch die Integrierung des VP 16 Promotors des Herpes simplex Virus erreicht. Auch bei einer gleichzeitigen Infektion mit zwei Vektoren wurde Expression der Genprodukte nicht vermindert. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte starke Regulation der Genexpression beruht auf der Fusion des VP16 Promotors mit einem Tetracyclin-Repressor durch die Bindung eines Fusionsproteins an den Tetracyclin-Operator. Ebenfalls wurde mittels immunhistologischen Schnitten dargestellt, dass die Kolonkarzinom-Zelle eine hohe Dichte an CAR-Rezeptoren

repräsentiert, die der adenovirale Vektor benötigt, um die Zelle zu infizieren. Die Synthese von Adenoviren ist mit dem 2-Plasmid-System unkompliziert und führte zu sehr ergiebigen Titern. Da bei allen entnommenen Geweben die intakte Mukosa geringfügig höhere Konzentrationen an therapeutischem Genprodukt aufwies, ist zu vermuten, dass der adenovirale Vektor entweder eine etwas höhere Affinität zu gesunden Zellen aufweist oder auf der Transkriptionsebene effizienter arbeitet. Die Affinität der adenoviralen Vektoren zur Zielzelle ist einerseits abhängig von der Präsenz des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors und andererseits von der Expression anderer Proteine wie Integrin- α V β 3 und α V β 5. Anhand der immunhistochemischen Färbung eines Teils des entnommenen Gewebes wurde aber nachgewiesen, dass das Tumorgewebe den CA-Rezeptor in ähnlicher Dichte wie gesundes Schleimhautgewebe präsentiert (Ergebnisse Kapitel 4.7). In anderen Arbeiten wurde beobachtet, dass es bei einer hohen CA-Rezeptordichte an der Zellmembran von Tumorzellen zu einer homophilen Assoziation des Rezeptors kommen kann, welche die adenovirale Infektion erschwert.¹¹⁷ Neben dem Einfluss der CAR-Expression auf die Infektionsaffinität muss auch die Rolle der Integrine diskutiert werden. Sie sind entscheidend für die Internalisierung der rezeptorgebundenen Adenoviren. Es konnte bei Ovarialkarzinom-Zellen gezeigt werden, dass sich gering differenzierte Zellen häufig durch den Verlust der Integrin- β 3-Untereinheit auszeichnen. Bei der adenoviralen Transfektionsrate des Ovarialkarzinoms ist die geringere Expression des CA-Rezeptors weniger entscheidend gewesen als der Verlust der Integrin-Expression.¹¹⁸ Nicht bekannt ist, ob eine Tumorzelle der kolorektalen Schleimhaut in weniger effizienter Weise die Proteine Integrin- α V β 3 und α V β 5 exprimiert. Weitere Ursachen der geringeren Genexpression in der Tumorzelle könnten auf der nuklearen Ebene zu finden sein. In Betracht zu ziehen ist, dass das Genmaterial des adenoviralen Vektors effizienter in das Genom einer normalen Schleimhautzelle integriert werden kann. Möglich ist ebenfalls, dass eine intakte Mukosazelle auf der Transkriptionsebene effektiver synthetisiert als eine unkontrolliert wachsende Tumorzelle. Im Rahmen dieser Diskussion ist unbedingt anzumerken, dass es sich bei den Unterschieden der Transfektionsergebnisse zwischen Mukosa- und Karzinomzelle nach statistischen Methoden (Tabelle 2; Kap.4.4.4) um keine signifikanten Differenzen handelt. Weitaus bemerkenswerter ist die Streuung der Expressionsdaten zwischen den Patienten zu bewerten. Während die Varianzen der Transfektionsergebnisse innerhalb des Patienten zu vernachlässigen sind, ist die intermediäre Varianz zwischen den Patienten recht ausgeprägt. Überlegungen, nach denen diese Unterschiede auf den wechselnden Differenzierungsgraden des Gewebes, auf dem Metastasierungsstatus oder ande-

ren individuellen Patienten- unterschieden beruhen könnten, haben sich innerhalb dieses Patientenkollektives nicht bestätigt (Kap. 5.5), sind aber aufgrund der kleinen Fallzahl mit beschränkter Aussagekraft zu bewerten. Möglich ist ebenfalls, dass die Ursachen dieser Beobachtungen in der Aufbereitung der Proben und beim experimentellen Ablauf entstanden. Es wurde zum Beispiel beobachtet, dass der Kontaminationssgrad der Gewebeproben die Transfektionsmöglichkeiten erheblich beeinflussen kann. Dies erklärt sich in dem vorzeitigen Aufbrauch des Kulturmediums durch mikrobielle Organismen (v.a. Bakterien). Zwar unterlagen alle Proben demselben Reinigungsprozedere und wurden mit einer antibiotischen Lösung versetzt, jedoch waren die Biopsien unterschiedlich stark und mit verschiedenen Erregern der Darmflora kontaminiert. Da sich die Ursachen der Datenstreuung nicht eindeutig klären lassen, müssen die Konsequenzen in Bezug auf eine klinische Studie diskutiert werden. (Kap.5.5.3).

5.2.2 Vergleich der verwendeten Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Transfektion der Gewebekulturen jeweils zwei Vektoren verwendet. Der Ad.3r-hscIL12 trägt das therapeutische Gen und der Ad.3r-Luc, der das Enzym Luciferase exprimiert, diente als Kontrollvektor. Um die Vektoren repräsentativ miteinander vergleichen zu können, wurden je die Hälfte aller Proben eines Probanden nach dem gleichen Verfahren mit den jeweiligen Vektoren behandelt. Die Ergebnisse der Interleukin-expression wurden im ELISA gemessen, die Luciferase wurde mittels Luminometer nachgewiesen. Es fiel auf, dass der Ad.3r-Luc das Reportergen im Mittel um eine log-Stufe geringer exprimiert. In der Zellkultur wurde dieses Phänomen bei der Einzel- sowie der Doppelinfection von HT29-Zellen analog beobachtet. Verständlich wird dieser Unterschied durch die Erkenntnis, dass es sich bei der Luciferase um ein intrazelluläres Enzym handelt, während Interleukin12 als Zytokin stark extrazellulär exprimiert wird. Da es sich bei beiden Konzentrationsbestimmungen um eine Überstandsmessung handelt, werden durch die Luciferasemessung nur die Enzyme erfasst, welche während der Zell-Lyse freigesetzt werden. In seiner Funktion als Kontrollvektor ist folglich von der Luciferase eine konstante, sich durch alle Experimente ziehende Konzentrationsdifferenz zum gemessenen Interleukin-12 zu erwarten. Da die Streuungen der Daten zwischen den Patientenproben und den Expressionsergebnissen der beiden Vektoren recht hoch und die Fallzahl des Patientenkollektives klein ist, wurde sich bezüglich des Vergleichs von Vektor und Kontrollvektor mit der Berechnung und Darstellung eines Trends beholfen. Bei acht von zehn Patienten war Folgendes zu beobachten: Sind die

Expressionswerte von Interleukin-12 sehr hoch, misst man auch in Relation hohe Luciferasewerte und umgekehrt. Überwiegend zeigen beide Vektoren eine effizientere Transfizierbarkeit der Mukosa im Vergleich zum Tumorgewebe (Abb.15). Vergleicht man die Daten der Tumorgewebe des Zentrums und der Peripherie miteinander, zeigt sich randständiges Tumorgewebe, unter der Berücksichtigung der Datenstreuung, ähnlich effizient transfizierbar wie intakte Schleimhaut (Abb.14).

In Anlehnung an die Transfektionsdaten zeigt sich unter Anwendung des induzierbaren Systems eine erkennbare jedoch nicht so kontinuierliche Parallelität beiden Vektoren. Es stellt sich zwar eine relativ konstante Konzentrationsdifferenz von 1-2 Logstufen zwischen den beiden Vektoren dar (Abb.17), jedoch ist ein klarer Trend bezüglich der Suppressionsergebnisse in den verschiedenen Gewebelokalisationen schwer festzulegen. (Abb.18) Zu beobachten ist, dass bei allen transfizierten Gewebeformen (Mukosa, vitales Tumorgewebe und Zentrum des Primärtumors, Metastasen und Dysplasien) in Anwesenheit von Doxycyclin durchschnittlich eine 1000-2000fache Suppression erreicht wurde. Ebenfalls erreichen beide Vektoren im Einzelfall enorme Regulationsfähigkeiten von über 10000facher Suppression. Im Mittel zeigte der Ad.3r-Luc eine gering höhere Supprimierbarkeit unter Doxycyclin, welche jedoch nicht als signifikant zu deuten ist. Dass die Höhe der Expression zwischen den beiden Vektoren nicht mit den Suppressionsdaten korreliert, ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die verwendeten adenoviralen Vektoren mit der autoregulierbaren tetracyclinabhängigen Expressionskassette in der Transfektion humaner Kolonkarzinomzellen bei einer m.o.i. von 10 eine optimale Regulationskapazität zeigen, die oberhalb der durchschnittlichen Genexpression ein „steady state“ erreicht. Es wurde ebenfalls in gentechnischen *in vitro*-Arbeiten beobachtet, dass auch bei höheren Viruskonzentrationen das adenovirale Vektors keine Erhöhung der Regulationskapazität zu erreichen ist.¹¹⁹

Das Verhältnis von Vektor (Ad.3r-hscIL12) zu Kontrollvektor (Ad.3r-Luc) lässt die Folgerung zu, dass die Höhe und Verteilung der Expression und Supprimierbarkeit des Fusionsproteins Interleukin-12 nicht zufälliger Natur sind. Somit stellt der Ad.3r-Luc in dieser Arbeit einen guten und soliden Kontrollparameter dar, der die gewonnenen Daten aus den Experimenten mit dem therapeutischen Vektor Ad.3r-hscIL12 stützt. Es ist zu erwarten, dass bei einem größeren Patientenkollektiv mit vermutlich geringerer Datenstreuung die oben geschilderten Zusammenhänge noch signifikanter belegt werden können.

5.2.3 Eignung des therapeutischen Gens

Interleukin-12 charakterisiert vor allem die Induzierung einer zellulären antitumoralen Immunität, indem es die Differenzierung von CD4 und CD8-T-Zellen initiiert. Ebenfalls aktiviert es natürliche Killerzellen, welche zytotoxisch das bestehende Tumorgewebe angreifen. Interleukin-12 stimuliert auch die Produktion von Interferon- γ , das zusammen mit den sekundären proinflammatorischen Chemokinen, IP10 und MIG, die Angiogenese des Tumors verhindert. Ein entscheidender Vorteil der Verwendung von Interleukinen in der Gentherapie ist, dass es sich bei Zytokinen um quasi körpereigene Proteine handelt. Sie produzieren keine schädlichen Stoffwechselprodukte und sind unabhängig von anderen Substanzeinnahmen während einer Therapie. In der systemischen Gabe von humanen rekombinanten Interleukin-12 kam es gehäuft zu toxischen Effekten ohne einen repräsentativen therapeutischen Erfolg. Damit scheidet momentan die systemische Gabe des Interleukin-12 als Therapieansatz aus. Bei intratumoralen Injektionen des Interleukin-12 kam es in verschiedenen Tiermodellen zu einer eindrucksvollen Tumorregression und zum Langzeitüberleben der Tiere. Die dargestellten Eigenschaften und das therapeutische Benefit in den Tiermodellen machen Interleukin-12 als lokales Therapeutikum zu einem überzeugenden Versuchskandidaten für die onkologische Gentherapie. Eine maximale lokale Expression des Interleukin-12 wird durch die Synthese einer bi-cistronischen m-RNA, von der beide Untereinheiten (p35, p40) des Interleukin-12 mit Hilfe einer „internal ribosome entry site“ (IRES) exprimiert werden, erreicht. Um der Möglichkeit der Homodimerbildung des p40 zu entgehen, werden hierbei Fusionsproteine mit exprimiert. (Quellen siehe Kap.2.6) In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl in der Zellkultur sowie in den *ex vivo* Versuchen am Gewebe mittels des verwendeten Vektor Konzentrationen an humanem IL12 exprimiert, die sehr viel höher sind als bislang publiziert.¹²⁰ Für eine effiziente gentherapeutische Behandlung ist nicht nur die Menge des Fusionsproteins von Bedeutung, sondern auch der Nachweis, dass das exprimierte Genprodukt seine Funktionen in der antitumoralen Abwehr zufrieden stellend ausführen kann. Es wurde anhand der Stimulation humaner Lymphozyten gezeigt, dass das Fusionsprotein über eine hohe Bioaktivität verfügt. Das exprimierte Interleukin-12 ist in der Lage das Immunsystem zu einer hohen Ausschüttung von Interferon- γ zu veranlassen. Wie schon in Kapitel 5.2.1. diskutiert, unterliegen die exprimierten Konzentrationen an Interleukin-12 und somit auch die stimulierten Interferon- γ -Konzentrationen innerhalb des Patientenkollektives signifikanten Schwankungen, die bei der Planung einer klinischen Studie zu berücksichtigen sind.

5.3 Steuerung der Expression der therapeutischen Gens über das Tet-Off-System

5.3.1 Darstellung und Nutzen des induzierbaren Systems

Für die Anwendung einer Gentherapie am Patienten ist nicht nur die Wirksamkeit der Methode wichtig, sondern auch der Nachweis, dass die Therapie sicher und verträglich ist. Eine Regulation der Genexpression ist immer dann besonders von Wichtigkeit, wenn weitere empfindliche Parameter durch das Genprodukt beeinflusst werden, die therapeutische Wirkung zeitlich begrenzt sein soll oder das Genprodukt toxische Nebenwirkungen besitzt. In dieser Arbeit spielt vor allem die zeitliche Begrenzung und die toxischen Nebenwirkungen des Interleukin-12 eine wesentliche Rolle. Die Steuerbarkeit der viralen Gentherapie ist am sichersten durch die Kontrolle der Transkriptionsebene zu erreichen. Das rekombinante Adenovirus Ad.3r-hscIL12 enthält eine autoregulierbare Tetracyclin-abhängige Expressionskassette in der E1-Region. Durch Bindung des Tetracyclins an den tetracyclin-suppressible transaktivator (tTA) findet eine Runterregulation der tTA statt und somit auch der Expression des Transgens. Die regulierte Genexpression ist für die onkologische Gentherapie ein entscheidendes Sicherheitselement, da die Wirkung des therapeutischen Gens bei malignen Erkrankungen nur temporär erwünscht ist. In der vorliegenden Arbeit hat sich das verwendete induzierbare System als sehr zuverlässig erwiesen. Bei der Transfektion der humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) in der Zellkultur konnte die Expression durchschnittlich um das 1500-2000fache supprimiert werden. Die Doxycyclin vermittelte Genexpression konnte bei humanem Kolonkarzinomgewebe die Expression durchschnittlich um das 1000-2000fache und in Einzelfällen um das über 10000fache senken. Auch bei der gleichzeitigen Infektion von humanen Kolonkarzinomzellen mit den Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc, wurde die starke Regulation der Genexpression nicht eingeschränkt. Unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit des Interleukin-12 im menschlichen Organismus ist eine Supprimierbarkeit im vierstelligen Bereich völlig ausreichend, da keine Gefahr der Kumulation des Zytokins in Blutbahn und Organen besteht. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die Integration des tetracyclinabhängigen Operons in den adenoviralen Vektor ein entscheidendes Sicherheitselement darstellt und damit die therapeutischen Indikationen und Optionen zur Gentherapie sinnvoll erweitert.

5.3.2 Zuverlässigkeit des induzierbaren Systems bei Kolonkarzinom-Zellen

Die Regulationskapazitäten der Ad.3rhsc-IL12 und Ad.3r-Luc zeigen in verschiedenen Zelllinien signifikante Unterschiede. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) bei einer durchgehend verwendeten m.o.i von 30 eine zufriedenstellende Regulation stattfand. Es konnte in einer Dosisescalation nachgewiesen werden, dass auch bei humanem Kolonkarzinomgewebe die optimale Regulationskapazität sogar zwischen 10 und 30 m.o.i. anzusiedeln ist. Wie in Kapitel 5.2.2 erwähnt und diskutiert, zeigten beide Vektoren insgesamt schwankende Suppressionswerte. Sie verzerren die Mittelwertdarstellungen (Abb.18) sind am ehesten durch die histologische Verteilung der Tumoren zu erklären. Die Auswertungen der Ergebnisse sind von überwiegend gut differenzierten Tumoren geprägt. Die Operationspräparate der besser differenzierten Tumoren (G1-G2) zeigten im Zentrum selten Zeichen von nekrotischem Gewebe. Der kleinere Anteil der Karzinome bestand jedoch aus recht entdifferenzierten und sehr schnell wachsenden Tumoren, die in den zentralen Bereichen aufgrund mangelnder Gefäßversorgung besonders stark zur Minderversorgung der Zellen mit entsprechender Syntheseeinschränkung bis hin zur Nekrosebildung neigen. Je nachdem wie hoch der Anteil des nekrotischen Gewebes in der Knipsbiopsie betrug, desto größer sind vermutlich die Schwankungen zu den Ergebnissen der anderen Biopsie derselben Testreihe. Da die Verteilung von nicht vitalem Tumorgewebe zwischen den Versuchsreihen der beiden Vektoren nicht auszumachen ist, sollte ein Vergleich der Regulationsergebnisse der zentralen Tumorregionen nur bedingt sinnvoll sein. Für die Sicherheit in klinischen Studien dürften diese Abweichungen nur eine geringe Rolle spielen, da einerseits nekrotisches Gewebe nicht mehr teilungsfähig ist und beide Vektoren durchgehend eine solide Regulationsfähigkeit nachwiesen; d.h. große Schwankungen traten in der Regel erst oberhalb der 1000fachen Suppression des Genproduktes auf. Toxische Nebenwirkungen wurden in anderen Arbeiten erst bei hohen Dosen von systemisch injiziertem Interleukin-12 nachgewiesen. Im Vergleich der nekrosefreien, vitalen Tumorregionen zueinander (Peripherie und Zentrum) besteht bei Gewebe, welches mit dem Ad.3r-hscIL12 transfiziert wurde, kein signifikanter Unterschied. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen innerhalb eines Tumors identisch sind („Zellklone“), sich jedoch von Tumor zu Tumor unterscheiden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zuverlässigkeit des Tet-Off-Systems durch die individuellen Unterschiede der kolorektalen Karzinome, ausgenommen nekrotisches Gewebe, nicht beeinträchtigt wird. Ebenfalls ist nachgewiesen, dass die Regulationseffizienz des Tet-Off-Systems nicht nur

zelllinien- sondern auch m.o.i.-abhängig ist. Dies spiegeln die Ergebnisse der Dosisescalation (Kap. 4.4.2) wieder, in der die Regulationskapazität oberhalb von 10 m.o.i. nicht signifikant gesteigert werden konnte.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine erfolgreiche Transfektion und Genregulation an metastatischem Gewebe aus der Leber demonstriert werden. Da die Regulationskapazität des Metastasengewebes sogar oberhalb der Durchschnitts-regulationskapazität des Primärtumorgewebes lag, wäre die Möglichkeit einer intrahepatischen Punktion zur intrametastatischen Injektion des Vektors im Rahmen einer klinischen Studie zu diskutieren. Im Stimulationstest mit humanen Lymphozyten ließ sich die Zuverlässigkeit der Genregulation anhand des Interferon- γ -Überstandes nachweisen. Neben der Bioaktivität des exprimierten Interleukin-12 konnte gezeigt werden, dass bei aktiviertem Tet-Off-System, durch die fehlende Expression von Interleukin-12, die Stimulierung zur Freisetzung von Interferon- γ nachließ. Anhand der oben diskutierten Ergebnisse ist zu erwarten, dass unter der Verwendung des autoregulativen Systems eine solide Genregulation in allen getesteten Geweben (Mukosa, vitales Tumorgewebe, zentrales Tumorgewebe, metastatisches und dysplastisches Gewebe des Kolon) stattfinden kann, diese aber je nach Tumorpathologie gewissen Schwankungen unterliegt.

5.4 Vergleich der Individualdaten der Patienten

5.4.1 Zur Person: Alter und Vorerkrankungen der Patienten

Die Probanden befanden sich überwiegend im Dispositionsalter für das kolorektale Karzinom. Die Altersskala reicht von 60-82 Jahre. Das mittlere Alter betrug somit 67,3 Jahre. Die Patienten wurden zum Vergleich in zwei Kollektive eingeteilt; eine Altersgruppe von 60-70 Jahren und die andere von 70-82 Jahren. Im Vergleich der Transfektionsergebnisse beider Vektoren im Tumorgewebe gibt es keine signifikanten Auffälligkeiten (p-Werte 0,18-0,4), die eine Beziehung zum Alter der Patienten zulassen. Da sich jedoch die Patienten beider Kollektive ausschließlich im letzten Lebensdrittel befinden (Streuungsmaximum 22 Jahre), wäre der Rückschluss bestimmter Signifikanzen in Beziehung zum Alter des Patienten nicht sinnvoll. Weiterhin wurden Patienten mit und ohne Vorerkrankungen verglichen. Da es sich um ältere Patienten handelte, waren die zur Beurteilung heranziehbaren Nebenerkrankungen hauptsäch-

lich kardiopulmonaler Natur. Es fiel auf, dass die Gewebebiopsien von Patienten mit kardiopulmonalen Vorschädigungen geringfügig effizienter zu transfizieren waren. Eine sinnvolle Erklärung für dieses Ergebnis ist nach momentanen Erkenntnisständen nicht zu finden, da gerade bei kardiopulmonalen Problemen von einer schlechteren Versorgung des Gewebes auszugehen ist. Möglicherweise handelt es sich um eine Beobachtung, die bei einem größeren Patientenkollektiv keine Signifikanz mehr aufzeigen würde. Die Patienten wurden unter anderem auch zu klassischen Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms befragt. Es befanden sich keine Patienten mit einer positiven Familienanamnese bezüglich der familiären adenomatösen Polyposis, des hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), des Lynch-Syndroms, des Turcot-Syndroms und des Peutz-Jeghers-Syndroms innerhalb des Kollektives. Die exogenen Risikofaktoren unterschieden sich derart gering innerhalb der Patientengruppe, dass eine Unterteilung in Risikogruppen nicht sinnvoll erschien.

5.4.2 Zum Primärtumor: Tumorgröße, Histologische und Lokalisation

Die Primärtumoren wurden vor Entnahme der Biopsie in Länge und Breite vermessen. Zum Vergleich der Größe wurde aus diesen Maßen ein ungefährer Umfang errechnet, der sich zwischen 5 und 56cm² bewegte. Das Patientenkollektiv wurde nach der Größe des Tumors in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe 1 von 0-29cm² und Gruppe 2 von 30-60cm². Allein aufgrund der Größe des Primärtumors ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Datenauswertung treffen. Es war zu beobachten, dass Tumoren, die im zentralen Gewebe zu Nekrosenbildung neigten, unabhängig von der Größe schlechter zu transfizieren waren. Ebenfalls wurde untersucht, ob der histologische Differenzierungsgrad der Tumoren untereinander und im Vergleich zum gesunden Gewebe zu Unterschieden in der Transfektionseffizienz der Gewebe führt. Hierzu wurden die Gewebe nach ihrem histologischen Grading (G1-G4) in zwei Vergleichsgruppen unterteilt (G1-2; G3-4). Diese Datengruppen beider Vektoren wurden untereinander und mit der gesunden Schleimhaut verglichen. Diese Auswertung ergab, dass weniger differenziertes Gewebe immer eine leicht geringere Transfektionseffizienz aufweist als gesundes Gewebe, diese Unterschiede sind jedoch nicht als signifikant zu bezeichnen. Im Vergleich des Tumorgewebes untereinander konnten keine richtungsweisenden Daten gewonnen werden. Die Transfektionsergebnisse der histologischen Gruppen verhielten sich im Vergleich der Vektoren sogar gegenläufig. Es konnte nicht beobachtet werden, dass der histologische Differenzierungsgrad einen besonderen Einfluss auf die Transfektionseffizienz der Tumorzelle nimmt, solange es sich um vitales Tumorgewebe handelt. Es fiel jedoch auf,

das die Gewebeanteile aus Tumoren mit hohem Nekroseanteil sich erwartungsgemäß weniger erfolgreich transfizieren ließen. Dabei spielte das histologische Grading nur in soweit eine Rolle, als dass die entdifferenzierteren Tumoren eher zu Nekrosenbildung neigten.

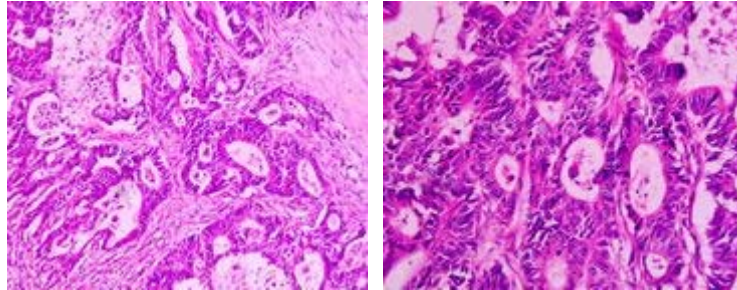


Abbildung 33: Histologische Darstellung eines gut differenzierten Adenokarzinoms des Colon (links) und eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms des Rektums (rechts).

(Quelle: Bühning, Lepenies, Witt (2000) Allgemeine und spezielle Pathologie Aufl. 2)

Von Interesse war ebenfalls die Lokalisation des Primärtumors. Verglichen werden konnten aufgrund des vorliegenden Patientenkollektives nur Tumoren des Rektums mit Tumoren von sigmoidaler Lokalisation. Während sich bei der Transfektion mit dem Ad.3r-hscIL12 keine signifikanten Unterschiede in der messbaren Expression des Interleukin-12 zeigten, kann die Expression der Luciferase aus Tumorgeweben des Sigmoids als leicht signifikant höher beurteilt werden. Da es sich um eine Beobachtung handelt, die sich nicht bei beiden Vektoren nachweisen lässt und nur auf geringen Unterschieden basiert, ist die Bedeutung dieses Ergebnisses als fragwürdig einzustufen.

Abb.34: Schema der Dickdarmanatomie:

- (1) Colon ascendens**
- (2) Colon transversum**
- (3) Colon descendens**
- (4) Sigma (Colon sigmoideum)**
- (5) Rectum und Anus.** (Quelle: Wikipedia)



5.4.3 Zum Wachstum: lokale Ausbreitung und Metastasierung

Es galt zu prüfen, ob die wesentlichen Faktoren des Wachstums, die Invasivität (Metastasierung) und die Form der Ausbreitung (semi/circulär) die Zugänglichkeit des Gewebes für den adenoviralen Gentransfer beeinflussen. Die Ausbreitung des Primärtumor wird in lokalisiert, semicirculär und circulär unterteilt. Zum Vergleich wurden lokalisiert wachsende Tumoren von semi- und circulär wachsenden Tumoren unterschieden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der messbaren Expression der Genprodukte (IL12, Luciferase) in Tumorgeweben unterschiedlicher Ausbreitung. Eine ähnliche Datenlage ergab sich beim Vergleich nichtmetastasierter Tumoren mit bereits metastasierten Tumoren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Patientengruppen in nahezu allen untersuchten Kriterien keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Jedoch kann aufgrund der kleinen Fallzahl der Probanden und der damit eingeschränkten Aussagekraft nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einer intratumoralen Injektion des rekombinanten adenoviralen Vektors zu Unterschieden in der Wirksamkeit innerhalb des Tumorgewebes bezüglich Tumorgroße, Wachstum, Histologie, Metastasierungsgrad und Nebenerkrankungen der Patienten kommen kann.

5.5 Perspektiven für eine klinische Studie

5.5.1 Gründe für eine klinische Studie

Da es zurzeit keine kurative Alternative zur chirurgischen Therapie des kolorektalen Karzinoms gibt, liegt das Interesse in der Verbesserung der adjuvanten bzw. neoadjuvanten Therapie (Chemotherapie und Bestrahlung). Da diese für den krankheitsgeschwächten Körper des Patienten durch ihre systemische Wirkung sehr belastend sind, wäre eine lokale Vor- oder Nachbehandlung des Tumors eine entscheidende Verbesserung der Gesamttherapie. Um den herkömmlichen Therapiemethoden überlegen zu sein, ist neben der nachgewiesenen Wirksamkeit und Steuerungsmöglichkeit der gentherapeutischen Methode vor allem die Schonung von gesunden Geweben und Organsystemen von hohem Interesse. Damit intaktes Gewebe nicht geschädigt wird, müssen sich die onkologischen Virotherapeuten mit der Frage beschäftigen: Wie lässt sich die Dosis verringern, ohne dabei den therapeutischen Effekt zu verlieren? Beim kolorektalen Karzinom findet sich eine elegante Art der Lösung: Da der Tumor in einer

gut zugänglichen Körperöffnung wächst, kann das Tumorgewebe mittels endoskopischer Technik gezielt mit dem transgredienten Vektor infiziert werden. Erst in der Tumorzelle, nicht im gesunden Gewebe, entfaltet die Virusinjektion durch die Expression des therapeutischen Gens ihre Wirkung. Weil die endoskopische Untersuchung zur Standarddiagnostik bei Verdacht auf ein kolorektales Karzinom gehört, wäre zu überlegen, den Vektor nach histologischer Schnellschnittsicherung der Diagnose in derselben Sitzung zu applizieren. Diese Verbindung von Diagnostik und Begleittherapie würde die Risiken einer weiteren koloskopischen Untersuchung ausschließen und eine sehr frühe und zeitnahe neoadjuvante Therapie ermöglichen. Der Patienten wäre für den anstehenden operativen Eingriff nicht risikohöher zu klassifizieren als ohne vorangehende Therapie. Die adjuvante oder palliative Therapie könnte bei einer R1- oder R2-Resektionssituation noch intraoperativ oder direkt im Anschluss an eine Operation stattfinden. Um die antitumorale Wirkung zu potenzieren, könnte in späteren Studien die Kombination aus zwei oder mehreren Vektoren (Ad.3r-hscIL12, Ad.3r-hscIL18 etc.) angedacht werden.

5.5.2 Verbesserung der Transfektionsrate

Trotz der hohen Potenz vieler neuer Therapien steht die Onkologie weiterhin dem Problem der großen Zahlen gegenüber: Bleibt nur eine einzige Tumorzelle übrig, besteht die Gefahr, dass sie sich erneut zu teilen beginnt. Anhand der Ergebnisse der Transfektion von HT29-Zellen und humanem Kolonkarzinomgewebe mit Ad.RSV.β-Gal war zu sehen, dass die Transfektionsrate von adenoviralen Vektoren noch deutlich zu optimieren ist. Eine Möglichkeit die Transfektionsrate zu erhöhen, könnte neben der Steigerung der CAR-Expressionsrate in der molekularen Veränderung des Vektors bestehen. Durch die Veränderung der „fiber knobs“ konnte eine tausendfache Steigerung der Transfektionsrate erreicht werden.¹²¹ Diese aus dem adenoviralen Kapsid herausragenden Strukturen stellen eine der wichtigsten Schaltstellen zur Bindung des Virus an den CA-Rezeptor dar.

Studien im Tierversuch haben gezeigt, dass eine erfolgreiche Transfektion von vitalem Tumorgewebe nicht nur vektorabhängig ist, sondern dass auch das Verfahren der Applikation eine entscheidende Rolle spielt. Zum Beispiel kann durch eine Modifizierung der Applikationsform die Transfektionsrate gesteigert werden. Durch eine Einbindung des adenoviralen Vektors in polykationische Liposomen konnte der Transfektionserfolg bei Tumorzellen *in vivo* signifikant gesteigert werden.¹²² Eine ebenso wichtige Rolle spielt das angewendete

Verfahren zur lokalen Vektorapplikation. Eine Möglichkeit zur verbesserten Applikation stellt das *in vitro* bewährte Verfahren der Elektroporation dar.^{123,124} Allgemein anerkannt ist die intratumorale Mikroinjektion zur Anlieferung des adenoviralen Vektors in den Tumor. Diese wird in verschiedenen Studien durch die manuelle Applikation der Injektionsnadel und die manuelle oder pumpengesteuerte Infusion des Vektors in den Tumor bewerkstelligt. Die manuelle Handhabung von Injektionsnadeln und Infusion verringert die Reproduzierbarkeit des Injektionserfolges und erhöht das Risiko unerwünschter Freisetzung der Vektoren in das umliegende Gewebe. In neueren Studien zur adenoviralen Gentherapie oberflächlicher Tumoren im Tiermodell wird ein Mikroinjektionssystem zur kontrollierten Infusion definierter Volumina sehr erfolgreich angewandt, bei der die Injektionsnadel manuell platziert wird. Es wurde dabei gezeigt, dass die Transfektionsrate durch die Veränderung der Nadeltiefe während der Injektion signifikant verbessert werden kann.^{125,126} Für die Übertragung auf das endoskopische Verfahren könnte das bedeuten: Da aufgrund der endoskopischen Rahmenbedingungen nur eine manuelle Platzierung der Nadel in Frage kommt, wird eine über das Endoskop gut handhabbare Injektionsnadel benötigt, die am oberen Ende des Schlauches mit einer steuerbaren Infusionspumpe versehen ist. Die Sitzung sollte wegen des benötigten Geschickes ausschließlich von einem erfahrenen Endoskopiker durchgeführt werden. Die endoskopische Anlage sollte die Sitzung auf einen großen Monitor übertragen können, da diese präzise Applikationstechnik gute Sichtverhältnisse voraussetzen würde.

5.5.3 Grenzen der Übertragbarkeit auf eine *in vivo*-Studie

Die grundsätzliche Fragestellung vor gentherapeutischen Phase-I-Studien lautet: Können Menschen unbeschadet derartig hohen Dosen an Genfähen ausgesetzt werden, wie sie in Zellkulturen und Tierversuchen eingesetzt wurden und erfolgreich waren? Die Antwort ist einerseits darin zu suchen, eine Art „niedrige Obergrenze“ zu finden, und zum anderen eine sichere und schonende Methode zur Applikation der Genfähen zu entwickeln. Viele frühere Arbeiten und Studien haben gezeigt, dass Interleukin-12 ein hochpotentes Zytokin in der Tumorabwehr und Ausbildung einer tumoralen Immunität darstellt. Aufgrund seiner Toxizität im hohen Dosisbereich und den damit verbundenen Nebenwirkungen, ist Interleukin-12 nicht für eine konzentrierte systemische Applikation geeignet. Die Daten der vorliegenden *ex vivo*-Arbeit deuten sehr darauf hin, dass durch die lokale Applikation und die Möglichkeit der Anwendung des induzierbaren Systems die Gefahren der Nebenwirkungen bei einer klinischen Studie kalkulierbar sind, ohne die hohe Wirksamkeit des Zytokins einzuschränken.

Allerdings sind hierbei die Risiken einer systemischen Ausbreitung über die Lymph- und Blutabflusswege des Tumors nicht berücksichtigt und fundiert erfassbar. Ebenfalls ist nicht bekannt, wie effizient das induzierbare System bei systemischer Verbreitung des Virus im menschlichen Organismus reagiert. Es wurde in Reagenzglasversuchen beobachtet, dass der adenovirale Vektor neben einer Komplementaktivierung zum Verkleben der Thrombozyten führen kann. Es ist zu vermuten, dass diese Reaktion der Thrombozyten ausschließlich bei einer hoch dosierten systemischen Applikation des Virus im Organismus zu Mikrozirkulationsstörungen führen würde. Dennoch sollte durch stetige Blutabnahmen das Blutbild und die systemische Konzentration von Interleukin-12 kontrolliert werden, um den maximal zu tolerierenden Wert (MDT) auf keinen Fall zu überschreiten. Ebenfalls ist nicht geklärt, wie sensibel der menschliche Organismus im Sinne einer Immunreaktion auf eine mögliche systemische Ausbreitung des lokal applizierten Vektors reagiert. Obwohl das Risiko durch eine intratumorale Injektion gering gehalten wird, ist nicht eindeutig klar, welche Konzentration an systemisch ausgeschwemmtem Vektor ausreicht, um eine solche Immunreaktion hervorzurufen. Im äußersten Fall ist somit nur eine einzige Injektion des Vektors bis zur Therapieresistenz möglich. Im Rahmen einer klinischen Studie wäre deshalb die Verwendung von gutless-Viren mit einer identisch genetischen Ausstattung zu diskutieren. Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, bestehen diese Vektoren lediglich aus der Virushülle und den DNA-Sequenzen an den Enden des Virus. Der Vektor wirkt durch die fehlende Expressierung viruseigener Proteine nicht toxisch, so dass es zu keiner körpereigenen Immunreaktion kommt. Ferner ist zu beachten, dass die therapeutische Einnahme von Tetracyclin oder Doxycyclin im Zeitraum vor und während der Studie durch den Probanden untersagt ist. Es konnte jedoch in Studien belegt werden, dass die allein nahrungsassoziierte Aufnahme von Antibiotika und deren Anreicherung im Serum keinen Einfluss auf die *in vitro*-Regulationskapazität der Vektoren hat.¹²⁷

Der Aufbau des Experimentes simuliert nur zu einem Teil die Situation einer klinischen Studie. Um späteren realklinischen Situation etwas näher zu kommen, wurden Gewebeproben aus verschiedenen Regionen des Tumors und der gesunden Schleimhaut infiziert und nach festgelegten Kriterien individueller Patientendaten ausgewertet (Kap.5.3). Es handelt sich hierbei jedoch um überschaubare, möglichst gleich große Gewebeproben, nicht um einen diffus wachsenden Tumor. Die Biopsien wurden von einem Medium umspült, das eine definierte Konzentration des adenoviralen Vektors enthielt. Es zeigte sich schon in der kontrollierten Laborsituation, dass sich trotz gleicher Konzentration von adenoviralem Vektor die Expres-

sion des therapeutischen Gens innerhalb der Patientenproben unterschiedlich ausfiel. Im Sinne der Übertragbarkeit auf eine klinische Studie bedeutet dies, dass es zwar in allen Tumoren zu einer zufrieden stellenden Expression kommt, diese sich jedoch aufgrund der Größe des Tumors nicht mit einer gültigen Einheitsformel für alle Patienten berechnen lässt. Der adenovirale Vektor muss zur intratumoralen Injektion bei einer geringen Initialkonzentration langsam titriert und gegebenenfalls über das induzierbare System gesteuert werden, um eine spätere Individualdosis für jeden Patienten zu finden. Bei der intratumoralen Injektion einer fixen Konzentration von adenoviralen Vektoren kam es jedoch in verschiedenen Tiermodellen zu einer eindrucksvollen Tumorregression und zum Langzeitüberleben der Tiere. Da der Vergleich von Tier und Mensch nur bedingt erlaubt ist, soll die vorliegende Arbeit das Bindeglied zu der geplanten klinischen Studie am Menschen darstellen und eine sinnvolle Orientierung zur Herangehensweise an die lokale adenovirale Gentherapie am menschlichen Tumor darstellen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generation präklinischer Daten zur Gentherapie des kolorektalen Karzinoms mit Hilfe eines Interleukin-12 exprimierenden rekombinanten Adenovirus. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das adenovirale Vektorsystem in Kolonkarzinomzellen der Zellkultur (HT29) sowie in Zellen aus Kolonkarzinombiopsien verschiedener Regionen des Tumors effektiv zur Expression des p40-p35 Fusionsproteins Interleukin-12 führt. Als Kontrollparameter diente der Ad.3r-Luc, welcher das Reportergen Luciferase exprimierte. Bei geringen Vektorkonzentration von 10- 30 m.o.i. waren hohe Mengen an Interleukin-12 und Luciferase im Überstand der Zellkulturen sowie der Gewebekulturen bestimmbar. Anhand des Lymphozyten-Stimulationstestes wurde die Bioaktivität des exprimierten Fusionsproteins durch die Messung von hohen Konzentrationen an Interferon- γ nachgewiesen. Die immunhistochemische Darstellung des für den Transfektionserfolg bestimmenden Cocksackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) zeigte eindrucksvoll eine dichte Repräsentation des Rezeptors auf der Oberfläche der Tumorzellen. In der Zellkultur (HT29) sowie den Kulturen der Gewebeproben wurde eine starke Genregulation des induzierbaren Systems dargestellt, die im Mittel eine 1000-2000fache und in Einzelfällen sogar eine mehr als 10000fache Regulationskapazität aufwies. Die Mukosa ließ sich in den meisten Fällen effizienter transfizieren und genregulieren, das Zentrum des Tumors zeigte sich, wahrscheinlich aufgrund von Nekrosenbildung, unbedeutend schwächer. Bei gleichzeitiger Infektion der beiden adenoviralen Vektoren konnte weder eine Einschränkung der Expression der Genprodukte noch der Regulation mittels Doxycyclin festgestellt werden. Die Datenstreuungen der Expressions- und Regulationswerte waren zwischen den Proben desselben Patienten zu vernachlässigen, jedoch gab es innerhalb des Patientenkollektives Schwankungen. Es gibt somit keine zu empfehlende Einheitsdosis für die lokale Injektion, deshalb sollte eine titrierte Individualdosis angesteuert werden. Jedoch geben die ausgewerteten Individualdaten der Patienten keinen Anhalt für eine Einschränkung der Indikation zur lokalen Behandlung. Die Expressionseffizienz und Regulierbarkeit bei geringer Vektordosis des Ad.3r-hscIL12 bieten eine gute Erfolgs- und Sicherheitsperspektive für die lokale, intratumorale Injektion beim Menschen im Rahmen einer klinischen Studie. Aufgrund der endoskopischen Technik ist das kolorektale Karzinom sehr gut zugänglich und ermöglicht eine zielgenaue intratumorale Applikation des rekombinanten Adenovirus.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Statistisches Bundesamt
- 2 „Krebs in Deutschland“ von der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) und dem Robert-Koch-Institut (2006)
- 3 Deutsche Medizinische Wochenschrift (2004) 129: 2118-2121. Review
- 4 Larsson, S.C. et al. (2005): Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: The Swedish Mammography Cohort. Int J Cancer. 2005 Feb 20; 113(5): 829-34
- 5 Norat, T. et al.(2005): Meat, Fish, and Colorectal Cancer Risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97:906–916. PMID 15956652.
- 6 Bianchini, F. et al.(2002): Overweight, obesity, and cancer risk. Lancet Oncol. 2002;3: 565–574
- 7 Reddy, G. K. (2006). “Prognostic significance of increasing lymph node count in stage III colorectal cancer.” Clin Colorectal Cancer 5: 403-404.
- 8 Sarli, L. et al. (2005). “Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer.” Eur J Cancer 41: 272-279.
- 9 Lanza, G. Gafa, R., Santini, A., Maestri, I., Guerzoni, L., and Cavazzini, L. (2006). “Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients.” J Clin Oncol 24: 2359-2367.
- 10 Bühning, K.J., Lepenies, J., Witt, K. (2004) Verdauungstrakt. In: Allgemeine und spezielle Pathologie, Urban & Fischer Verlag München/Jena, Aufl.3, S.219-259

-
- 11 Renz-Polzer, H., Braun, J. (2004, überarbeitet 2006) Magen-Darm-Trakt. In: Basislehrbuch Innere Medizin, Urban & Fischer Verlag München/Jena 3. korrigierte Auflage, S.503-580
 - 12 Scientific American, (1990/11) ,Inder M. Verma, “Gene Therapy”
 - 13 Suzuki, D.T., Griffith A.J.F., Miller, J.H, Lewontin, R.C., (1991) „Genetik“ VCH Verlag
 - 14 Lewin, Benjamin (1994) „Genes V“, Oxford University Press
 - 15 Deutsches Ärzteblatt (2003); 100: A 314-318 (Heft 6)
 - 16 Human Gene Therapy, (2005/9) “Gendicine: The first Commercial Gene Therapy “Product” (1) und (2) 16: 1014
 - 17 Gasbar, H.B. et al. (2004/12) „Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. Lancet 18;364(9452):2181-2187
 - 18 Gesetz zur Regelung der Gentechnik ,GenTG § 1 und § 2, BGBl. I 1993 S. 2066
 - 19 Ruuskanen, O., Meumann, O., Akusjävri, G., Adenoviruses. (1997) In: Richmann, D.D. Withley, R.J., Hayden, F.G.: Clinical Virology. Churchill Livingstone, New York 1997, 525-547
 - 20 Stewart, P.L., Burnett, R.M. (1995) “Adenovirus Structure by X-ray Cristallography and Electron Microscopy” In: Doerfler, W., Böhm, P., „The Molecular Repertoire of Adenoviruses“ Topics in Microbiology Immunology Vol.199/I Sringer Berlin 1995
 - 21 Wadeli, G.: Adenoviruses. (2000) In: Zuckerman, A.J.,J.E. Banatvala and J.R.Pattison Principles and Practice of Clinical Virology, 4th ed., John Wiley and Sons, Chichester 2000

-
- 22 Anderson, C.L., Johnson, D.E., Harris, M.P., Engler, H., Hancock, W., Huang, W.M., Wills, K.N., Gregory, R.J., Sutjopto, S., Wen, S.F., Lofgren, S., Shepard, H.M., Maneval, D.C. (1998) "p53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma; intraarterial delivery of a recombinant adenovirus" *Clin Cancer Res* 4(17): 1649-59
- 23 Pützer, B.M., Bramson, J.L., Addison, C.L., Hitt, M., Siegel, P.M., Muller, W.J., Graham, F.L. (1998) "Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer" *Human Gene Therapy* 9(5): 707-18
- 24 Rosenberg, S.A., Zhai, Y., Yang, J.C., Scharfetter, Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., Roberts, B., White, D.E. (1998) "Immunizing patient with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens." *J Natl Cancer Inst* 90 (24): 1894-900
- 25 Gahery-Segard, H., Molinier-Frenkel, V., Le Boulaire, C., Saunier, P., Opolon, P., Legagne, R., Gautier, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., Venet, A., Schatz, C., Courtney, M., Le Chevalier, T., Tursz, T., Guillet, J.G., Farace, F., (1997) „Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. „Longitudinal study of the immune response to transgene and viral products." *J Clin Invest* 100(9): 2218-26
- 26 Clayman, G.L., Frank, D.K., Brusco, P.A., Goepfert, H., (1999) "Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers" *Clin Cancer Res* 5(7): 1715-22
- 27 Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. (1999) "High-capacity 'gutless' adenoviral vectors." PMID: 11699889 [PubMed - indexed for MEDLINE] 8: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12816-21.
- 28 Alba, R. Bosch, A. Chillon, M. (2005) Gutless adenovirus: "last-generation adenovirus for Gene therapy" *Gene Ther*. 2005 Oct; 12 Suppl 1: S18-27

-
- 29 Gossen, M., Bujard, H. (1992) "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (12): 5547-51
- 30 Holger Wulff, Thorsten Krieger, Karen Krüger, Ingrid Stahmer, Friedrich Thaiss, Hansjörg Schäfer, Andreas Block (2007) "Cloning and characterization of an adenoviral vector for highly efficient and doxycycline – suppressible expression of bioactive human single – chain Interleukin-12 in colon cancer" 31: *BMC Biotechnol.* 2007 Jun 26;7:35.
- 31 Bronstein, I., Fortin, J., Standley, P.E., Steward, G.S., Kricka, L.J. (1994) "Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays." *Anal Biochem* 219(2): 169-81
- 32 Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, J., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowl, R. L., Finberg, R. W. (1997) „Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5" *Science* 275 (5304): 1320-3
- 33 "Lösliche Cocksackie-Adenovirus-Rezeptoren" http://www.medizin.fu-berlin.de/index.php?bereich=forschung&viewpage=kardiomyo_car&open=2
- 34 Beiträge der Münchener Arbeitsgruppe zur Tagung der aktion benni & co e.V. am 20. Oktober 2001 Mainz, Autor: Priv.-Doz Dr. Hans Lochmüller
- 35 Steinwaerder, D. S., Lieber, A. (2000) „Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo" *GeneTher* 7 (7): 556-67.
- 36 Burcin, M.M., Schiedner, G., Kochanek, S., Tay, S. Y., O'Malley, B.W. (1999) „Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo" *Proc Natl Acad Sci USA* 96(2): 355-60.

-
- 37 Rivera, V. M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J. F., Keenan, T., Margari, S., R., Phillips, T., Courage, N. L., Cerasoli, F. Jr., Holt, D. A., Gilman, M. (1996). "A humanized system for pharmacologic control of gene expression" *Nat Med* 2(9): 1028-32.
- 38 Gossen et al.(1992), vgl. Nr. 29
- 39 Gossen, M., Bujard, H., (2002) "Tetracyclins in control of gene expression in eukaryotes"
In: Nelson, M.L., Hillen, W., Greenwald, R.A., (Hrsg.) *Tetracyclines in Biology, Chemistry, and Medicine*. Birkhäuser, Basel, 139-157
- 40 Chopra, I., Roberts, M., (2001) „Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. " *Microbiol. Mol.Rev* 65: 232-260
- 41 Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W., Niederweis, M., (2002) „Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*." *Eur.J.Biochem.*, 267: 527-534
- 42 Hillen, W., und Behrens, C., (1994) „Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracyclin resistance" *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 345-369
- 43 Saenger, W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W., Hinrichs, W., (2000) „The Tetracycline Repressor-A, Paradigm for a Biological Switch. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39: 2042-2052
- 44 Gossen, M., Freundlieb, M., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995) „Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells" *Science* 268: 1766-176
- 45 Gatz, C., Quail, P.H. (1988)„Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1394-1397

-
- 46 S. A-Mohammadi, L. Alvertz-Vallina, L.J. Ashworth and R. Hawkins (1997) "Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues." *Gene Therapy* 4:991-997
- 47 Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., Gately, M.K. (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin-12 against murine tumors." *J Exp Med* 178 (4): 1223-30.
- 48 Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J., Gately, M.K., Wolf, S.F., Schreiber, R.D., Storkus, W.J., et al. (1994). "Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production." *J Immunol* 153 (4) 1697-706
- 49 Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Gee, M.S., LaTemple, D.C., Kontenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J.E., Liu, L., Liao, F., Farber, J.M., Pestka, S., Trinchieri, G., Lee, W.M. (1998) "Tumor cells responses to IFN-gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." *Immunity* 9 (1): 25-34
- 50 Yu, W.G., Yamamoto, N., Takenaka, H., Mu, J., Tai, X.G., Zou, J.P., Ogawa, M., Tsutsui, T., Wijesuriya, R., Yoshida, R., Herrmann, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T. (1996) "Molecular mechanism underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12." *Int Immunol* 8 (6): 855-65.
- 51 Gazinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., Sher, A., (1996) "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4 T-cells and accompanied by overproduction of IL-12, INF-gamma and TNF-alpha." *J Immunol* 157 (2): 798-805.

-
- 52 Leonard, J.P., Sherman, M.L., Fisher, G.L., Buchanan, L.J., Larsen, G., Atkins, M.B., Sosman, J.A., Dutcher, J.P., Vogelzang, N.J., Ryan, J.L. (1997) "Effects of single-dose Interleukin-12 exposure on Interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production." *Blood* 90 (7): 2541-8
- 53 Sung, M. W., et al. (2002) „Intratumoral delivery of adenovirus-mediated interleukin-12 gene in mice with metastatic cancer in the liver.“ *Hum Gene Ther* 13: 731-743.
- 54 Tahara, H., Zitvogel, L., Storkus, W.J., Zeh, H.J., 3rd, Mc Kinney, T.G., Schreiber, R.M., Gubler, U., Robbins, P.D., Lotze, M.T. (1995) „Effective eradication of established murine tumor with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector.“ *J Immunol* 154(12): 6466-74.
- 55 Qiao, J., Chen, S.H., Pham-Nguyen, K.B., Mandeli, J., Woo, S.L. (1999) "Construction and characterization of a recombinant adenoviral vector expressing human interleukin-12." *Cancer Gene Ther* 6(4): 373-9.
- 56 Klein, Jan: *Immunologie*. (1991) Übersetzt von Reinhold E. Schmidt, New York, Basel, Cambridge: VCH, 1991, ISBN 3-527-28071-5
- 57 Vilcek, J. et al. (1989) *Lymphokines*, 11, 1-32
- 58 Tarner, I.H., Nakajima, A., Seroogy, C.M., Ermann, J., Levicnik, A., Contag, C.H., Fathmann, C.G. (2002) "Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4." , *Clin Immunol* 105 (3): 304-14
- 59 Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., Mallet, J. (1999) "Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (21): 12120-5.

-
- 60 Tevæarai, H.T., Eckhart, A.D., Walton, G.B., Keys, J.R., Wilson, K., Koch, W.J. (2002) "Myocardial gene transfer and overexpression of beta2-adrenergic receptors potentiates the functional recovery of unloaded failing hearts." *Circulation* 106 (1): 124-9
- 61 Eguchi, J., Hiroishi, K., Ishii, S., Baba, T., Matsumura, T., Hiraide, A., Okada, H., Imawari, M. (2005) "Interleukin 4 gene transduced tumor cells promote a potent tumor-specific Th1-type response in cooperation with interferon-alpha transduction. *Gene Ther.* 12 (9): 733-4
- 62 Eguchi, J., Hiroishi, K., Ishii, S., Mitamura, K. (2003) "Interferon-alpha and Interleukin-12 gene therapy of cancer: Interferon alpha induces tumor specific immune responses while Interleukin-12 stimulates non specific killing." *Cancer Immunol Immunother.* 52 (6): 378-86. Epub 2003 Mar 18
- 63 Osaki, T., et al. (1999) "Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin 18 (IL-18)" *Gene Ther* 6, 808-15.
- 64 Cao, X., Wang, Q., Ju, D.W., Tao, Q. & Wang, J. (1999) "Efficient induction of local and systemic antitumor immune response by liposome-mediated intramural co-transfer of interleukin 2 gene and interleukin 6 gene." *J Exp Clin Cancer Res* 18, 191-200.
- 65 Brunda, M.J. (1995) Role of IL 12 as an anti-tumor agent: Current status and future directions. *Res Immunol* 146, 622-628
- 66 Brunda, M.J., Luistro, L., Warrier, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K. (1993) "Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin-12 against murine tumor." *J Exp Med* 178, 1223-1230
- 67 Fujiwara, H., Hamaoka, T. (1996) "Antitumor and antimetastatic effects of Interleukin-12." *Cancer Chemother Pharmacol* 38 Suppl, S22-26

-
- 68 Noguchi, Y., Richards, E.C., Chen, Y.T., and Old L.J. (1995) Influence of Interleukin-12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2219-2223
- 69 Zou, J.P., Yamamoto, N., Takenaka, H., Kobayashi, M., Herrmann, S.H., Wolf, S.F., Fujiwara, H., Hamaoka, T. (1995): Systematic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: Response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production of anti-tumor T-cells. *Int Immunol* 7, 1135-1145
- 70 Ozmen, L., Pericin, M., Hakimi, J., Chizzonite, R.A., Wysocka, M., Trinchirie, G., Gately, M., and Garotta, G. (1994) „Interleukin-12, Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines generalized Shartzman reaction.“ *J Exp Med* 180, 907-915
- 71 Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Aktins, M. B., Sosman, J. A., Dutscher, J. P., Vogelzang, N. J. (1997) „Effects of single dose Interleukin-12 exposure on inteerleukin 12 associated toxicity and interferon gamma production.“ *Blood* 90(7): 2541-8
- 72 Colombo, M.P., Vagliani, M., Spreafico, F., Parenza, M., Chiodini, C., Melani, C., Stoppacciaro, A., (1996) “Amount of Interleukin-12 available at the tumor side is critical for tumor regression.” *Cancer Res* 56 (11): 2531-4
- 73 Heinzerling, L., Burg, G., Dummer, R., Maier, T., Oberholzer, P.A., Schultz, J., Elzaouk, L., Pavlovic, J., and Moelling, K. (2005): Intramural injection of DNA encoding human Interleukin-12 into patients with metastatic melanoma: clinic efficacy. *Hum Gene Ther* 16, 35-48
- 74 Heinzerling, L., Dummer, R., Pavlovic, J., Schultz, J., Burg, G., and Moelling, K. (2002) „Tumor regression of human and murine melanoma after intramural injection of IL-12-encoding plasmid DNA in mice.“ *Exp Dermatol* 11, 232-240

-
- 75 Heinzerling, L., Feige, K., Rieder, S., Akens, M.K., Dummer, R., Stranzinger, G., and Moelling, K. (2001) „Tumor regression induced by intramural injection of DNA coding for human Interleukin-12 into melanoma metastases in gray horses.“ *J Mol Med* 78, 692-702
- 76 Schultz, J., Pavlovic, J., Strack, B., Nawrath, M., and Moelling, K. (1999) „Long-lasting anti-metastatic efficiency of Interleukin-12-encoding plasmid DNA.“ *Hum Gene Ther* 10, 407-417
- 77 Bamson, J.L., Hitt, M., Addison C.L., Muller, W.J., Gauldie, J., and Graham, F.L. (1996) „Direct intratumoral injection of an adenovires expression Interleukin-12 induces regression and long lasting immunity that is associated with highly localized expression of Interleukin-12.“ *Hum Gene Ther* 7, 1995-2002
- 78 Caruso, M., Pham-Nguyen, K., Kwong, Y.L., Xu, B., Kosai, K.I., Finegold, M., Woo, S.L., and Chen, S.H. (1996) „Adenovires mediated Interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11302-11306
- 79 Anderson, R., Macdonald, I., Corbett, T., Hacking, J., Lowdell, M.W., and Pentice, H.G., (1997). Construction and biological characterization of an Interleukin-12 fusion protein (Flexi 12): Delivery to acute myeloid leukemic blast using adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 8, 1125-1135
- 80 Lee, Y.J., Tao M.H., Chow, Y.H., and Chaing, B.L., (1998) „Construction of vectors expressing bioactive heterodimeric and single change murine Interleukin-12 for gene therapy.“ *Hum Gene Ther* 9, 457-465
- 81 Lieschke, G.J., Roa, P.K., Gately, M.K., and Mulligan, R.C., (1997) „Bioactive murine and human Interleukin-12 fusion protein which retain antitumor activity in vivo.“ *Nat Biotechnol* 14, 35-40

-
- 82 Lode, H.N., Dreier, T., Xiang, R., Varki, N.M., Kang, A.S., and Reisfeld, R.A. (1998) „Gene therapy with a single chain Interleukin-12 fusion protein induces T-cell dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2475-2480
- 83 Block, A., Puls, F., Müller, J., Milasinovic, D., Igelmann, D., Schäfer, P., Kupfermann, N., Schmoldt, A., Ameis, D., Greten, H. (2003) „Highly suppressible expression of single-chain Interleukin-12 by doxycyclin following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system.“ *J Gene Med* 5: 190-200
- 84 Waehler, R. Ittrich, H., Mueller, L. Krupski, W., Ameis, D., and Schnieders, F.(2005). „Low dose of adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain Interleukin-12.“ *Hum Gene Ther* 16, 307-317
- 85 Eguchi, J., Hiroishi, K., Ishii, S., Mitamura, K. (2003) “Interferon-alpha and Interleukin-12 gene therapy of cancer: interferon alpha induces tumor specific immune responses while Interleukin-12 stimulates non specific killing.” *Cancer Immunol Immunother.* 52 (6): 378-86. Epub 2003 Mar 18
- 86 Pajtasz-Piasecka, E., Szyda, A., Rossowska, J., Krawczyński, A., Indrova, M., Grabarczyk, P., Wysocki, P., Mackiewicz, A., Dus, D. (2004) “Loss of tumorigenicity of murine colon carcinoma MC 38/0 cell line after transduction with a retroviral vector carrying murine IL-12 genes.” *Folia Biol (Praha)* 50 (1): 7-14
- 87 Glorioso, J.C., D.N., Fink, D.J. (1995) “Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy.” *Annu Rev Microbiol* 49, 675-710
- 88 Iizuka, Yukihiko MS; Suzuki, Ayuko MD; Kawakami, Yutaka MD, PhD; Toda, Masahiro MD, PhD (2004/04). “Augmentation of Antitumor Immune Responses by Multiple Intratumoral Inoculations of Replication-Conditional HSV and Interleukin-12.” *Journal of Immunotherapy.* 27(2):92-98

-
- 89 Kurarta, H., Valkova, J., Koch, A.E., Yssel, H., Inoue, T., Yokota, T., Arai, K. (1999)
“Recombinant adenovirus vector for cytokine gene therapy in mice.” J Allergy Clin
Immuno 103, S471-84
- 90 Mühle, C., Neuner, A., Park, J., Pachó, F., Jiang, Q., Waddington, S.N., Schneider, H.,
(2007) „Evaluation of intra-amniotic LAMB3 gene delivery in a mouse model of
Herlitz disease“ Abstract7, Adenovirus-Tagung Ulm 2007; Novel and recurrent
mutations in the laminin-5 genes causing lethal junctional epidermolysis bullosa:
molecular basis and clinical course of Herlitz disease Journal Human Genetics;
Publisher: Springer Berlin / Heidelberg;
- Issue Volume 116, Numbers 1-2 / January, 2005 Category Original Investigation
DOI 10.1007/s00439-004-1210-y, Pages 33-42
- 91 Larochelle, N., Stucka, R., Rieger, N., Schermelleh, L., Schiedner, G., Kochanek, S.,
Wolf, E., Lochmüller, H. (2007) “Genomic integration of adenoviral gene transfer
vectors following transduction of fertilized mouse oocytes” Abstract10,
Adenovirustagung 1. und 2. März 2007
- 92 Thirion, C., Lochmüller, H., Ruzsis, Z., Boelhauve, M., König, C., Thedieck, C., Kutik, S.,
Geiger, C., Kochanek, S., Volpers, C., Burgert, H.G. (2006) „Adenovirus vectors
based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed
therapy” Human Gene Ther. 2006 Feb;17(2):193-205
- 93 Hoffmann, D., Heim, A., Nettelbeck, D.M., Steinstraesser, L., Wildner, O. (2007)
„Evaluation of twenty human adenovirus types and one infectivity-enhanced
adenovirus for the therapy of soft-tissue sarcoma” Abstract19: Adenovirustagung 1.
und 2. März 2007; Human Gene Therapy, in: www.liebertonline.com.

-
- 94 Morral, N., O'Neal, W., Rice, K., Leland, M., Kaplan, J., Piedra, P.A., Zhou, H., Parks, R.J., Velji, R., Aguilar-Córdova, E., Wadsworth, S., Graham, F.L., Kochanek, S., Carey, K.D., Beaudet, A.L. (1999) „Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26; 96(22):12816-21.
- 95 Cichon, G., Boekh-Herwig, S., Schmidt, H. H., Wehnes, E., Muller, T., Pring-Akerblom, P., Burger, R., (2001) „Complement activation by recombinant adenoviruses“ *Gene Ther* 8(23): 1794-800.
- 96 Volker Stollorz „Wenn das Blut erstarrt. Droht der Gentherapie nach einem Todesfall das Aus?“ *Die Zeit - Wissen* (Internetausgabe) 1999
- 97 Sangro, B., et al. (2004). „Phase-I-trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors.“ *J Clin Oncol* 22: 1389-1397.
- 98 Crettaz, J., Berraondo, P., Mauleon, I., Ochoa, L., Shankar, V., Barajas, M., van Rooijen, N., Kochanek, S., Qian, C., Prieto, J., Hernandez-Alcoceba, R., Gonzalez-Asiguinolaza, G. (2006) „Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice“ *Hepatology*, 2006 Sep; 44(3):623-32.
- 99 Gossen und Bujard (2002), vgl. Nr. 44
- 100 Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., Bujard, H., (1995) „Co-regulation of two gene activities by tetracyclin via a birectional promotor.” *Nucleic Acids Res* 23(17): 3605-6
- 101 A-Mohammadi (1997), vgl. Nr. 46
- 102 Block, A., Milasinovic, D., Mueller, J., Schaefer, P., Schaefer, H., and Greten, H. (2002) „Amplified Muc1 spezific gene expression in colon cancer cells utilizing a binary system in adenoviralen vectors.“ *Anticancer Res* 22, 3285-3292

-
- 103 Block, A., Puls, F., Müller, J., Milasinovic, D., Igelmann, D., Schäfer, P., Kupfermann, N., Schmoldt, A., Ameis, D., Greten, H. (2003) „Highly suppressible expression of single-chain Interleukin-12 by doxycyclin following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system.” J Gene Med 5: 190-200
- 104 Block, A., Milasinovic, D., Mueller, J., Schaefer, P., Schaefer, H., and Greten, H. (2002) “Amplified Muc1 spezific gene expression in colon cancer cells utilizing a binary system in adenoviralen vectors”. Anticancer Res 22, 3285-3292
- 105 Deutsches Ärzteblatt (2005/06) „Kolomkarzinom: Von der Chemo- zur Genthherapie“ Deutscher Ärzte-Verlag
- 106 Howe, J.R., Skryabin, B.V., Belcher, S.M., Zerillo, C.A., Schmauss, C. (1995) “The responsiveness of a tetracyclin sensitive expression system differ in different cell lines.” J Biol Chem 270(23): 14168-74
- 107 Ackerland-Berglund, C.E., Leib, D.A. (1995) „Efficacy of tetracyclin-controlled gene expression is influenced by cell type” Biotechniques 18(2): 196-200
- 108 Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P., Bergelson, J.M., Hackett, N.R., Finberg, R.W., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Roelvink, P., Crystal, R.G. (1999) “CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector mediated gene transfer and expression in human fibroblasts.” J Clin Invest 103(4): 579-87
- 109 Cunningham, D. et al. (2004) “Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.” N Engl J Med 351: 337-345.
- 110 Hurwitz, H., et al. (2004). “Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.” N Engl J Med 350: 2335-2342.
- 111 Hemmi, S., Geertsens, R., Mezzacasa, A., Peter, I., Dummer, R. (1998) “The presence of human coxsackie and adenovirus receptor ia associated with efficient adenovirus-

-
- mediated transgene expression in human melanoma cell cultures.” Hum Gene Ther 9, 2363-73
- 112 Tomko, R.P., Xu, R., Philipson, L. (1997) HCAR and MCAR : “The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses.” Proc Natl Acad Sci USA 94 3352-6
- 113 Hidaka et al (1999), vgl. Nr. 108
- 114 Li, D., Duan, L., Freimuth, P., O'Malley, B.W. Jr. (1999) “Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancers” Clin Cancer Res 5: 4175-81.
- 115 Wickham, T.J. Matthias, P., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R. (1993) “Integrins alpha v beta 3 und alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment.” Cell 73, 309-19
- 116 Block und Puls (2003), vgl. Nr. 103
- 117 Runnebaum, M., (2001) “Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors in Ovarialkarzinom-Zellen und ihr Bezug zur adenoviralen Gentherapie.“ Med. Dissertation, Universität Freiburg
- 118 Brüning, A., Kohler, T., Quist, S., Wang-Gohrke, S., Moebus, V.J., Keienberg, R., Runnebaum, I.B. (2001) „Adenovires transduction efficiency of ovarian cancer cells kann be limited by loss of integrin beta 3 subunit expression and increased by reconstitution of integrin alpha v beta 3.” Hum Gene Ther 12, 391-9
- 119 Block, A. und Puls, F. (2003), vgl. Nr.103
- 120 Block, A. und Puls, F. (2003), vgl. Nr.103

-
- 121 Cripe, T.P., Dunphy, E.J., Holub, A.D., Saini, A., Vasi, H.N., Mahller, Y.Y., Collins, M.H., Snyder, J.D., Krasnykh, V., Curiel, D.T., Wickham, T.J., DeGregori, J., Bergelson, J.M., Currier, M.A. (2001) „Fiber Knob Modifications Overcome Low, Heterogeneous Expression of the Coxsackievirus-Adenovirus Receptor That Limits Adenovirus Gene Transfer and Oncolysis for Human Rhabdomyosarcoma Cells1“ Cancer Research 61, 2953-2960, April 1, 2001; © 2001 American Association for Cancer Research Experimental Therapeutics
- 122 Lee, S.G., Yoon, S.J., Kim, C.D., Kim, K., Lim, D.S., Yeom, Y.I., Sung, M.W., Heo, D.S., Kim, N.Y. (2000) „Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes in vivo.“ Cancer Gene Ther Vol 7, pp1329-35
- 123 Zaharoff, D.A., Barr, R.C., Li, C-Y., Yuan, F. (2002) „Electromobility of plasmid DANN in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery” Gen Ther. Vol.9 pp 1286-1290
- 124 Li, S., Thang, X., Xia, X. (2002) „Regression of tumor growth and induction of long term antitumor memory by interleukin-12 elektro-gene therapy” J National Cancer Institute Vol.94 pp 762-768
- 125 Lammering, G., Hewit, Th. H., Hawkins, W.T., Contessa, J.N., Reardon, D.B., Lin, P-S., Dent, P., Mikkelsen, R.P., Schmidt-Ullrich, R.K. (2001) “Epidermal growth factor receptor as genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization” Journal of the National Cancer Institut Vol.93 pp 921-929
- 126 Lammering, G., Contessa, J.N., Lin, P-S., Valerie, K., Mikkelsen, R.P., Schmidt-Ullrich, R.K. (2003) “Anti erbB receptor strategy as a gene therapeutic intervention to improve radiotherapy in malignant human tumors” Int J Radiat Biol Vol.79 pp 561-568
- 127 Puls, F. (2004) „Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Gentherapie“ Med Dissertation, Universität Hamburg

8 Abbildungsverzeichnis und Abkürzung

8.1 Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms	1
Abb. 2: Adenokarzinom des Colon ascendens während der Koloskopie	6
Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus	14
Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines adenoviralen Partikels	16
Abb. 5: Aufbau des verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektors	20
Abb. 6: Funktionsweise des tetracyclinabhängigen autoregulativen Tet-Off-Systems	24
Abb. 7: Die biologischen Wirkungen von Interleukin-12 und Interferon- γ	27
Abb. 8: Darstellung des Anteils der gefärbten HT29-Zellen nach Transfektion mit dem Vektor Ad CMV. β -Gal und anschließender Entfärbung mit X-Gal	58
Abb. 9: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest in der Zellkultur	59
Abb. 10: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Zellkultur-Expressionstest in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin	60
Abb. 11: Darstellung der Regulationsmöglichkeiten der Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc bei Einzel- und Doppelinfection	61
Abb. 12: Kolorektales Tumorgewebe nach Transfektion mit dem Ad.RSV. β -Gal und anschließender Entfärbung mit X-Gal	62

Abb. 13: Die hIL12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen	64
Abb. 14: Die Mittelwerte der hIL-12-Konzentration und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen	65
Abb. 15: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektionseffizienz von Mukose zu Tumorgewebe beider Vektoren	65
Abb. 16: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektionseffizienz von vitalen Tumorgewebe (Peripherie) zum Zentrum des Tumors beider Vektoren	66
Abb. 17: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest mit Gewebekulturen unter Anwesenheit von Doxycyclin	67
Abb. 18: Darstellung der Mittelwerte der Regulationsergebnisse der Vektoren Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc in Anwesenheit von Doxycyclin	67
Abb. 19: Die Suppressionswerte aus dem Expressionstest unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin	68
Abb. 20: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Suppressierbarkeit beider Vektoren unter Anwesenheit von Doxycyclin bei Mukosa zu Tumorgewebe	69
Abb. 21: Darstellung des Verhältnisses (Ratio) der Suppressierbarkeit beider Vektoren unter Anwesenheit von Doxycyclin bei vitalem Tumorgewebe (Peripherie) zu Tumorzentrum	69
Abb. 22: Mittelwertdarstellung des Verhältnisses (Ratio) der Transfektions- und Suppressionsergebnisse der beiden Vektoren (Ad.3r-hscIL12 und Ad.3r-Luc) zueinander	69
Abb. 23: Die IL-12-, Luciferase- und Interferon- γ -Konzentration aus dem Expressionstest von Lebermetastasengewebe unter Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin	70

Abb. 24: Die IL-12- und Luciferase-Konzentration aus dem Expressionstest von dysplastischen Gewebe unter Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin	71
Abb. 25: Darstellung der Interferonausschüttung unter Stimulierung humaner Lymphozyten mit dem Fusionsprotein hIL-12	72
Abb. 26: Humanes Interferon- γ aus dem Bioassay im Verhältnis zum eingesetzten hIL-12	73
Abb. 27: HE-Färbung eines gesunden kolorektalen Abschnittes des Menschen	75
Abb. 28: HE-Färbung eines kolorektalen Karzinoms des Menschen	75
Abb. 29: Red staining mit Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-System (APAAP) eines gesunden kolorektalen Abschnittes des Menschen	76
Abb. 30: Brown staining mit Envision Horseradish Peroxidase System eines gesunden kolorektalen Abschnittes des Menschen	76
Abb. 31: Red staining mit Alkaline-Phosphatase-Antialkaline-Phosphatase-System (APAAP) eines kolorektalen Karzinoms des Menschen	76
Abb. 32: Brown staining mit Envision Horseradish Peroxidase System eines kolorektalen Karzinoms des Menschen	76
Abb. 33: Histologische Darstellung eines gut differenzierten Adenokarzinoms des Colon und eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms des Rektums	88
Abb. 34: Schema der Dickdarmanatomie	88

Tabelle 1: Einteilung der Adenoviren	15
Tabelle 2: Darstellung der Ergebnisse der T-Tests in p-Werten	68
Tabelle 3: Darstellung der errechneten Werte aus den T-Tests für die Interleukin-12 (hIL-12) und die Luciferasewerte	74

8.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A	Adenosin
Ad	Adenovirus
Amp	Ampicillin
#	Artikelnummer
β-Gal	β-Galaktosidase
bzw.	beziehungsweise
CCLR	Cell-Culture-Lysis Reagent
c	Centi
CD	Cluster of differenz
cDNA	copy DNA

CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CPE	cytopathic effect
C	Cytosin
DNA	Desoxiribonucleinacid
Dox	Doxycyclin
E	early
E.coli	Escherichia coli
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	Et alii (und andere)
FBS	fetales Kälberserum
G	Gramm
hIL-12	humanes Interleukin-12
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGDMEM	High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin

IL	Interleukin
IRES	internal ribosom entry side
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
L	Ligand
LB	Luria_Bertani
Log	logarithmisch
Luc	Luciferase
Lsg	Lösung
m	Milli, Meter, murin
M	Molar
μ	Mikro
m.o.i.	multiplicity of infection
MEM	Mod. Eagle Medium
Min	Minute
mRNA	messenger Ribonucleinsäure

mu	map units
n	Nanometer
NK	natürliche Killerzellen
n/v	nicht vorhanden
p	pico
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration
RNA	Ribonucleinsäure
rtTA	Reverser Tetracyclin abhängiger Aktivator
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
Tet-OFF	Tetracyclin reguliertes System mit Verwendung des tTA
TetR	Repressordomäne des tTA
Th	T-Helferzellen
TK	Thymidinkinase
TNF α	Tumor Necrosis Faktor alpha

TRE	Tetracyclin- respondibles Element
tTA	Tetracyclin- abhängiger Aktivator
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
VP	Virales Protein
V	Volt
v/w	Volumen/Gewicht
w/o	without
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

9 Anhang: Firmenliste

1. Amersham International, Amersham, Großbritannien
2. American Tissue Culture Collektion (ATCC), Manassas, VA, USA
3. Beckmann-Coulter, München, Deutschland
4. Bio-Rad, München, Deutschland
5. Boehringer-Roche, Mannheim, Deutschland
6. Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
7. Braun Diessel Biotech International, Melsungen, Deutschland
8. Clontech, Heidelberg, Deutschland
9. Dianova, Hamburg, Deutschland
10. EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
11. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland
12. Fluka, Ulm, Deutschland
13. GFL, Burgwedel, Deutschland
14. Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
15. Gilson, Middleton, USA
16. Greiner, Frickenhausen, Deutschland

-
17. Heraeus, Hanau, Deutschland
 18. Hybaid, Ashford, England
 19. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 20. J.T..Baker, Deventer, Holland
 21. Köttermann, Uetze, Deutschland
 22. Labor Optik, Deutschland
 23. Merck, Darmstadt, Deutschland
 24. Milipore, Eschborn, Deutschland
 25. MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
 26. Nalge-Nunc, Wiesbaden-Biebrecht, Deutschland
 27. Nalgene, Rochester, NY, USA
 28. New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland
 29. Pfizer, Zürich, Schweiz
 30. Pharmingen über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
 31. Pierce über KMF, St, Augustin, Deutschland
 32. Promega, Mannheim, Deutschland
 33. Qiagen, Hilden, Deutschland

34. Qbiogene, Heidelberg, Deutschland

35. R&D System, Minneapolis, USA

36. Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

37. Stratagene, Heidelberg, Deutschland

38. Wolf, Geislingen, Deutschland

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. A. Lohse für die Möglichkeit, die beschriebene Arbeit in seiner Klinik anzufertigen.

Bei den weiteren Mitgliedern der Prüfungsgruppe möchte ich mich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Diese wurde unter der Leitung von PD Dr. A. Block in seiner Arbeitsgruppe für Gentherapie gastrointestinaler Tumoren an der I. Medizinischen Klinik des UKE angefertigt. Herrn PD Dr. A. Block danke ich für die interessante Themenstellung und für die hilfreiche Betreuung. Während der Zeit im Labor sowie bei der Auswertung der Daten war er stets ein kompetenter und motivierender Ansprechpartner.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das gute Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfestellung danken. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Holger Wulff für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, die auch an den Wochenenden keine Grenzen kannte, und für die freundliche Überlassung seiner professionellen Grafiken. Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Henning Wege, für die methodische Unterstützung des experimentellen Teils meiner Arbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre im gemeinsamen Labor.

Ich danke Herrn Prof. N. Sohendra und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der endoskopischen Probengewinnung. Ich danke ebenfalls Herrn Prof. J. Izibicki und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit der Probensammlung in den Operationssälen der Allgemeinchirurgischen Klinik des UKE. Des Weiteren danke ich Prof. H. Schäfer für die professionelle Anfertigung der Gewebeschnitte im Pathologischen Institut des UKE.

Meinem Freund Armin Buchter danke ich für seinen unermüdlichen Glauben an mich und seine Unterstützung während der gesamten Studienzeit. Beim Korrekturlesen war er mir eine große Hilfe.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern für die stetige Unterstützung meiner Ziele, für das Vertrauen das sie in mich setzen und ihre liebevolle Art mir zur Seite zu stehen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Karen Krüger

Geburtsdatum: 07.Oktober 1980

Geburtsort: Berlin-Buch

Schul Ausbildung

1987 – 1992 35. Grundschule, Berlin

(Berliner Regelung 1990: Grundschule bis zur 6.Klasse)

1992 – 2000 Abitur, Heinrich-Heine-Gymnasium, Hamburg

Hochschulausbildung

2000 Beginn des Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg

2002 Physikum

2005 Freisemester WS/05 zur Beenden der experimentellen Dissertation

2007 Examen nach der neuen Approbationsordnung

Wissenschaftliche Tätigkeiten

2004 – 2007 Promotionsarbeit: „Virale Expression eines humanen Interleukin-12 Fusionsproteins im Kolonkarzinoms mittels Doxycyclin- regulierbarer adenoviraler Vektoren“ Leitung: Dr.A.Block und Prof.N.Sohendra, Labor für Gentherapie gastrointestinaler Tumoren an der Medizinischen Klinik I, UKE

Klinische Tätigkeit

Seit 08/2007 Assistenzärztin im Pneumologischen Zentrum Berlin,
Leitung: Prof. Dr. P. Dorow, DRK-Klinken-Berlin Mitte

12 Erklärung

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

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

Unterschrift.....