

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Bokemeyer

Entwicklung eines Dox-regulierten adenoviralen Vektors zur Expression von Antikörpern gegen den EGFR

Dissertation

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

vorgelegt von:

Stephanie Seeger aus Neuruppin

Hamburg 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.07.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Andreas Block

Der Langsamste, der sein Ziel nicht
aus den Augen verliert,
geht noch immer geschwinder als jener,
der ohne Ziel umherirrt.

Gotthold Ephraim Lessing

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Zielsetzung	8
Einleitung	10
Die Entstehung von Tumoren	10
Das Kolonkarzinom.....	11
Risikofaktoren	12
Früherkennung.....	14
Adenom-Karzinom-Sequenz	15
Symptome	17
Diagnostik.....	17
Klassifikation des Kolonkarzinoms.....	18
TNM-Klassifikation der Kolonkarzinome.....	18
Therapie	20
Der EGFR-Signaltransduktionsweg	23
Therapeutischer Antikörper mit Spezifität für EGFR - Cetuximab.....	25
Gentherapie und Vektorsysteme.....	26
Adenoviren	27
Klassifizierung.....	27
Klinik der humanen Adenoviren	28
Aufbau und Lebenszyklus	28
Verschiedene Generationen der Vektoren und Immunantwort auf adenovirale Infektionen.....	29
Tetrazyklin-induzierbare und –supprimierbare Transgenexpressionssysteme	31
Tet-Off-System	31
Tet-On-System	32

Weiterentwicklung zum autoregulativen TetOff-Systems	33
Material und Methoden.....	34
Material.....	34
Zellen	34
Bakterienstämme	34
Säugerzelllinien	34
Adenoviren	35
Nukleinsäuren	35
Oligonukleotide	35
Vektoren	36
Rekombinante Plasmide	36
Bacmide	37
Antikörper.....	37
Verbrauchsmaterialien, Reagenzien sowie Enzyme.....	38
Größen- und Molekulargewichtsmarker.....	38
Kommerzielle Systeme.....	38
Geräte.....	39
Software und Datenbanken.....	39
Methoden.....	41
Bakterien und DNA	41
Transformation	41
Transformation und Vermehrung in chemisch kompetente E.coli.....	41
Elektroporation	41
DNA-Isolierung	42
Restriktionsverdau	42
Ligation.....	43
PCR.....	43
Gelelektrophorese.....	44

Gelextraktion aus Agarosegelen.....	45
Lagerung von <i>E.coli</i> -Klonen	45
DNA-Konzentrationsmessung (Nanodrop)	45
Sequenzierung	46
Zellkultur und Generierung von Adenoviren	46
Splitten von Zellen.....	46
Lagerung und Kryokonservierung von Säugerzellen	47
Vitalitätsprüfung durch Trypanblau und Zellzählung	47
Transfektion.....	47
Polyethylenimin (PEI-) Methode	47
Lipofektion	48
Reinfektion und Vermehrung des Virusstocks	48
Titerbestimmung mittels Fluoreszenztest.....	49
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	50
Western Blot.....	51
Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	52
Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay.....	53
Ergebnisse	54
Klonierung des Transfervektors 542.3r.225huIgG ₁ 2A/Fu	54
Herstellung des AdEasy-Konstrukts.....	60
Virusproduktion.....	61
Virustitration.....	62
Funktionsanalysen	63
Western Blot.....	63
ELISA zum Nachweis der Expression	65
Ergebnisse der Virusinfektion von Tumorzelllinien	66
Sequenzierungsergebnisse	69
Diskussion	71

Adenovirale Vektoren für die Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	71
Infizierbarkeit der Zelllinien.....	73
Regulationskapazität des AdCetuximab im Rahmen des Tetrazyklin-regulierbaren Systems.....	74
Einschätzung der Ergebnisse der Funktionsanalyse und der Sequenzierung	77
Eignung des therapeutischen Gens - Cetuximab	78
Ausblick.....	81
Zusammenfassung.....	83
Deutsche Version.....	83
Summary.....	84
Abkürzungsverzeichnis.....	86
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	93
Abbildungen	93
Tabellen	94
Literaturverzeichnis.....	95
Danksagung.....	107
Lebenslauf.....	108
Anhang	109
Sequenzen.....	109
542_pAD3r luc	109
pShuttleCetuximab (Klon 3).....	116
Eidesstattliche Erklärung.....	121

Zielsetzung

Um Therapieoptionen für das kolorektale Karzinom weiterzuentwickeln und neue Therapieansätze zu untersuchen, ist das Verständnis der Interaktion aller beteiligten Komponenten von größter Wichtigkeit.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher ein rekombinanter adenoviraler Vektor hergestellt werden, der doozyklingesteuert das Transgen in bestimmten Tumorzellen, insbesondere Kolonkarzinomzelllinien, exprimiert. Als Transgen wurde der zugelassene Antikörper zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms Cetuximab verwendet, der durch Integration einer autoregulativen Expressionskassette in die E1 Region replikationsdefizienter Adenoviren einen neuen gentherapeutischen Ansatz zur Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor vom IgG1-Typ darstellen könnte.

Der Anti-EGFR-AK war dabei bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurde unter Verwendung spezifischer Primer isoliert. Anschließend erfolgt die Klonierung der Gene für die leichte und schwere Kette des IgG1 in die Expressionskassette der adenoviralen Expressionsplasmide. Dabei wird die Expression beider Ketten durch die Verwendung einer 2A-Site zum ribosomalen Skipping realisiert und unter Kontrolle eines Doozyklin-abhängigen Promoter-Systems gestellt.

Die Generation rekombinanter, replikationsdefizienter Adenoviren vom Serotyp Ad5 erfolgt letztlich durch homologe Rekombination im AdEasy-System nach Protokoll von Luo et al. von 2007. Diese Technik erfolgt in drei Schritten:

1. das gewünschte Gen muss in einen Shuttlevektor subkloniert werden (z.B.: pShuttle)
2. der Shuttlevektor muss zusammen mit dem Backbone-Vektor (z.B.: AdEasy-1 = Deletion von E1 und E3) in kompetente Bakterienzellen BJ 5183 eingebracht werden
3. nach erfolgtem PacI Verdau erfolgt die Transfektion von 293-Zellen zur Virusproduktion, die 14-20 Stunden später geerntet werden können.

Nach diesem Protokoll folgt entsprechend, dass der BstZ17I-Verdau anschließend zur Elektrotransformation in die superkompetenten BJ5183 E. coli, bei dem ein Antibiosenwechsel entsprechend von Ampicillin- auf eine Kanamycinresistenz erfolgte, eingesetzt wird.

Hierbei soll die homologe Rekombination des Vektors, welcher das Transgen enthält und des AdEasy-1-Bacmids, welcher die adenoviralen Anteile außer die E1 und die E3-Region einschleust, in die BJ5183 stattfinden.

Nach der Generierung ausreichender Mengen Virus in 293-Zellen soll die Infektion von Tumorzellen erfolgen, was die funktionelle Charakterisierung des Zellkultur-Überstands als auch des Lysats in Hinblick auf die gegen den EGFR gerichteten Antikörper anschließt.

Zunächst sollen die Antikörper mittels ELISA auf ihre Funktion überprüft werden, als auch quantitativ durch einen fixierten sEGFR bestimmt werden. Nachfolgend sollen vor allem Kolonkarzinomzelllinien, die den EGFR auf ihrer Oberfläche exprimieren, im Rahmen von Western Blot- und ELISA-Untersuchungen eingesetzt werden.

Perspektivisch könnte sich aus den genannten Experimenten sowohl eine in vivo Studie zur Therapie humaner Kolonkarzinome in der immuninkompetenten Maus, als auch weitere Grundlagenforschung insbesondere auf dem Gebiet der adenoviralen Vektoren (Herstellung, Immunmodulation, rekombinante Varianten mit mehreren Transgenen) oder auch neuer Strategien im Bereich des steuerbaren Tet-Off/Tet-On-Systems ergeben.

Einleitung

Die Entstehung von Tumoren

Das Wort Tumor (lateinisch tumor = "Schwellung") wird im Duden definiert als eine Geschwulst bzw. krankhafte Anschwellung eines Organs oder eines Teils eines Organs (www.duden.de, abgerufen 19.08.2019, 13.09 Uhr).

Eine präzisere Bezeichnung ist "Neoplasie" (griechisch: neo = neu, plastein = formen), was die Neubildung von Gewebe aus körpereigenen Zellen beschreibt und sowohl bösartig (maligne) als auch gutartig (benigne) sein kann. Der Begriff "Krebs" (von lateinisch carcinoma und griechisch genesis = „Schöpfung“ oder „Zeugung“) beschreibt ausschließlich die Entstehung von malignen Tumoren. („Allgemeine Onkologie - Wissen für Mediziner (Begriffe: Neoplasie, Krebs)“, 2019, abgerufen 19.08.2019, 13.28 Uhr)

Am Anfang einer Krebszelle steht jedoch immer eine normale Zellentwicklung. Doch warum entarten gesunde Zellen? Eine feine Abstimmung aus „guten“ und „bösen“ Regulatoren hält das Zellwachstum normalerweise im Lot und sorgt dafür, dass geschädigte Zellen „Selbstmord“ begehen oder vom körpereigenen Immunsystem „zur Strecke gebracht“ werden. Dies ist eine Eigenschaft, die Krebszellen verloren haben. Doch sie sind noch zu viel mehr fähig. Weitere wesentliche Unterschiede sind zum Beispiel ihre Fähigkeit sich unabhängig von Wachstumssignalen zu teilen, ihre Resistenz gegenüber hemmenden Wachstumssignalen oder solchen, die den Zelltod oder ein unbegrenztes Wachstumspotenzial bewirken, unabhängig von Telomerlängen oder Gewebebegrenzungen. Des Weiteren besitzen Krebszellen die Möglichkeit der Angiogenese und somit ihre eigene Blutversorgung neu zu bilden. Durch die dadurch bessere Nährstoffversorgung ist es ihnen möglich, in andere Gewebe „einzuwandern“ (Invasion) und Absiedlungen (Metastasen) auszubilden. Diesen Eigenschaften wurden durch Mutationen erworben, was im Modell der zwei Wissenschaftler Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg bereits dargelegt wird (Hanahan & Weinberg, 2000).

Der Krebsinformationsdienst zeigt verständlich die zwei nicht konkurrierenden Modelle der Krebsentstehung auf, die jeweils mit einer Schädigung des Erbmateri als einhergehen:

Das "klonale Evolutionsmodell", oder auch als stochastisches Modell bezeichnet, orientiert sich an der Darwinschen Evolutionstheorie: Zufällige Veränderungen in Zellen geben diesen einen „Überlebensvorteil“, der dann im weiteren Verlauf in den nachfolgenden Generationen von Zellen sozusagen durch abermals zufällig auftretende Mutationen ausgebaut wird und so zur Tumorentstehung führt. Dieses Modell will zeigen, dass Tumorwachstums und Metastasenbildung offenbar von jeder Zelle des Tumors starten können. (Wagener & Müller, 2010; Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, o. J.)

Das "Modell der Tumorstammzelle" rückt in den letzten Jahren weiter in den Vordergrund. Es besagt, dass alle Krebszellen in einer Geschwulst von Tumorstammzellen abstammen.

Stammzellen sind nicht ausgereifte Zellen, die die besondere Eigenschaft besitzen, sich unbegrenzt teilen zu können. Diese Eigenschaft wurde für Tumorzellen bereits nachgewiesen. Allerdings zeigen sich nicht alle Krebsarten konform mit diesem Modell, so dass aktuell noch viele Fragen insbesondere bzgl. der Entstehung offen sind. Allerdings wird vermutet, dass diese Zellen auch eine Art „Schlaffunktion“ haben, die sie resistent gegen Radiatio- und Chemotherapien macht, was eventuell erklären könnte, warum eine vermeintlich besiegte Erkrankung nach vielen Jahren erneut ausbricht. Auch Zellen, die aus eben diesen Tumorstammzellen hervorgehen, vermehren sich nach den gleichen Regeln der Evolutionstheorien, weil sie, verglichen mit anderen Stammzellen, Überlebensvorteile entwickelt haben. Vor Jahren wurde davon ausgegangen, dass sich eine Neoplasie grob in drei Stufen entwickelt: Am Anfang steht ein Risikofaktor -> der die Schädigung des Erbmaterials begünstigt -> was zur Krebsentstehung führt. Neuere Wissen zeigt jedoch, dass die Entstehung wesentlich umfangreicher und differenzierter ist. Es wird daher eher von einem "Mehrstufen-Modell der Krebsentstehung" ausgegangen. (Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum, 2018). Ein relevantes Beispiel dafür ist die Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen (Fearon & Vogelstein, 1990) auf die später noch eingegangen werden soll.

Vereinfachend lässt sich die Karzinogenese jedoch in drei verschiedene Phasen einteilen, bei der es grundsätzlich eine Störung im Verhältnis von Zellwachstum und Zelltod gibt.

Während der Initiationsphase kommt es zur Bildung von Mutationen an der betroffenen Zelle, wobei dies in Genen sein muss, die für den Zellzyklus bzw für die Zellteilung verantwortlich sind, z.B Tumorsuppressorgene. Werden an diesen Genen Veränderungen vorgenommen, so dass sie ihre eigentliche Funktion nicht oder nur ungenügend ausführen können, nennt man diese Onkogene. Normalerweise werden diese „Unfälle“ sofort durch das körpereigene Reparatursystem erkannt und behoben. Sollte dies nicht möglich sein, werden die Zellen in den Zelltod geschickt oder bleiben, bei Ausbleiben der Reparatur, dauerhaft mutiert (Krebs-Info, Fachinformationen Krebs und Komplementäre Onkologie & Prall, o. J). In der Promotionsphase erhalten genau diese Onkogene Wachstumssignale, so dass die Tumorbildung stimuliert wird und eine präneoplastische Zelle entsteht. Die Promotion ist jedoch noch reversibel, solange ein gewisser Schwellenwert nicht überschritten wird. In der Progression entsteht durch weitere Mutationen und Umwandlung in den ehemaligen Tumorsuppressorgenen ein invasiv wachsender Tumor mit Entdifferenzierungsmerkmalen. (DocMedicus Verlag GmbH & Co. Gesundheitsportal der Deutschen Gesellschaft für Nährstoffmedizin und Prävention DGNP e.V, o. J.)

Das Kolonkarzinom

Der Begriff Kolonkarzinom fasst maligne Erkrankungen sowohl des Dickdarms als auch des Mastdarms sowie seltener Malignome des Afters zusammen. Im Jahr 2014 wurde bei ca. 61.100 Deutschen diese Diagnose gestellt. Für 2016 sind laut des deutschen epidemiologischen Krebsregisters und des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut, 32.300 Männer und 25.990 Frauen erstmals an Darmkrebs erkrankt. Schätzungen für 2020 zeigen einen weiteren Rückgang der Neuerkrankungen bei Frauen

auf 24100 und bei Männern auf 31300 je 100000 Personen. (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut, 2019)

Je älter die Patienten, desto höher ist das Erkrankungsrisiko. Über 50% der Betroffenen sind zur Diagnosestellung älter als 70 Jahre. Nur ein geringer Anteil (10%) der Darmkrebspatienten haben maligne Tumore vor der ersten Vorsorgeuntersuchung diagnostiziert bekommen, also vor ihrem 55. Geburtstag (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut, 2019).

Die altersstandardisierten Erkrankungsraten sind jedoch seit etwa 2003 bei beiden Geschlechtern leicht rückläufig, ebenso wie die absolute Zahl der Inzidenz. Auch die altersstandardisierten Sterberaten sinken seit Jahren stetig: bisher zeigt sich eine 20 %ige Reduktion in den letzten 10 Jahren. Darmkrebs gehört dabei zu den Malignomen mit einer mittleren Prognose, was in etwa bedeutet, dass fünf Jahre nach der erstmaligen Diagnose noch etwa 62-63% der Patienten leben. (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut, 2019)

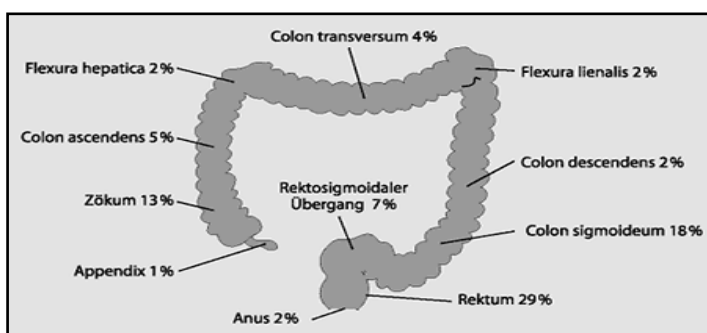


Abbildung 1: Verteilung der Lokalisation kolorektaler Karzinome

Quelle: www.onkodin.de : H.-J. Schmoll, D. Arnold, A. Lang, U. Graeven , Letzte Änderung: 22.05.2007, Stand 31.03.2016, 14.56 Uhr

Risikofaktoren

Die Ursachen sind mannigfaltig, zum Teil sind es auch mehrere Faktoren zusammen. Es können genetische Veränderungen als auch äußere Einflüsse wie Infektionen, Chemikalien oder auch der persönliche Lebensstil sein. Allerdings entstehen Mutationen im Laufe des Lebens auch einfach zufällig, ohne nachvollziehbaren Grund. Und vor allen Dingen nehmen die Reparaturmechanismen mit steigendem Alter ab und daher die Krebserkrankungen im höheren Alter entsprechend zu. (Der Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrums, 2016)

Die äußeren Risikofaktoren können also auch im Lebensstil begründet sein. Die Hauptrisikofaktoren für die Krebsentstehung sind bekannt und spielen auch beim Kolonkarzinom eine wichtige Rolle. Ein normales Gewicht (BMI < 25) mit täglicher Bewegung (30-60 min.), der überwiegende Verzicht auf Tabak und Alkohol würde laut Experten bereits helfen, dass Erkrankungsrisiko zu senken. (Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, 2016). Es wird daher aufgezeigt, dass sie in 90 - 95 % aller Fälle die unmittelbare Ursache für Krebserkrankungen sind (Anand et al., 2008).

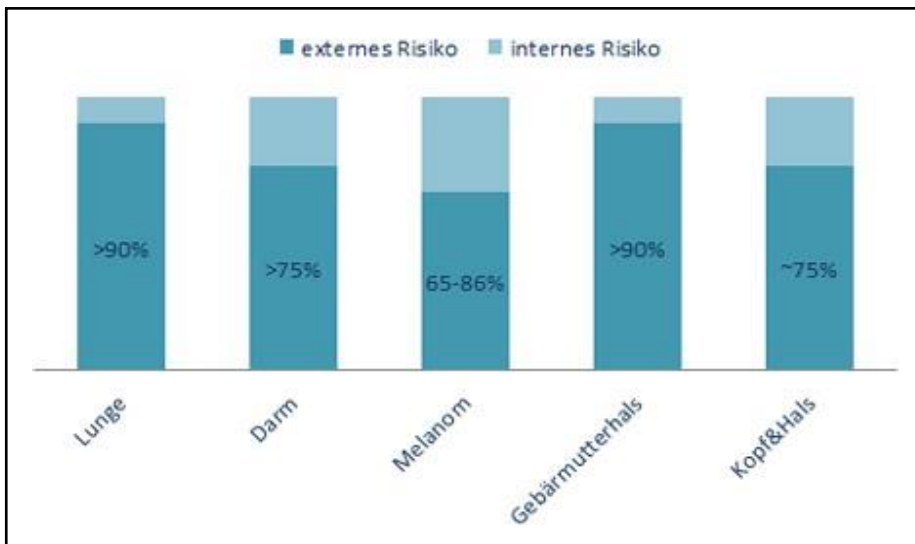


Abbildung 2: Anteil der externen Risikofaktoren an der Krankheitsentstehung für ausgewählte Karzinome

Quelle: Wu S., Powers S., Zhu W. & Hannun YA. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. Nature (2016)

Neben äußeren Risikofaktoren spielt jedoch auch die genetische Disposition des Einzelnen eine wesentliche Rolle. So erkranken zum Beispiel auch erstgradig Verwandte von Patienten mit Darmkrebs prozentual häufiger. Deren Risiko liegt aktuellen Studien folgend zwei- bis dreifach höher als bei anderen. (Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, 2016)

Bei seltenen erblich bedingtem KRK (FAP, HNPCC) ist das Risiko zu erkranken bereits in auffallend jungen Jahren deutlich erhöht. Diese Gruppe ist jedoch mit maximal 5 von 100 Erkrankten sehr gering. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen gehören zu den Risikofaktoren. Insbesondere sollten Betroffene mit Colitis ulcerosa etwa 8 Jahre nach Ausbruch der Erkrankung eine Koloskopie durchführen lassen, in der das Ausmaß der Entzündung gesehen werden und je nach Befund das weitere Procedere festgelegt werden kann. Bei Patienten mit M. Crohn wird analog eine gleiche Behandlung empfohlen. (Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, 2016)

Aber auch bei Zellteilungen und Vorgängen, die wesentlich an Wachstum und Regeneration beteiligt sind, könnte es zu Defekten in der DNA kommen, ohne dass es merkliche Faktoren von außen gegeben hätte, die eingewirkt hätten. Das Konzept der "genetischen Instabilität" baut auf diesen Beobachtungen auf und meint damit, dass je instabiler eine Zelle durch Alterung wird, also je weiter die Telomerlänge abnimmt (Wege & Brümmendorf, 2010, S. 271), desto größer die Möglichkeit ist, dass sie zur Krebszelle wird. Dies würde erklären, warum Tumorerkrankungen häufiger im höheren Alter auftreten (Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, o. J.).



Abbildung 3: Früherkennung von Darmkrebs: Das gehört zum gesetzlichen Früherkennungsprogramm in Deutschland. © Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum

Quelle: www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/frueherkennung.php ©2019 Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum, Stand Juli 2019.

Früherkennung

Zwischen 50 -54 Jahren hat jede gesetzlich versicherte Frau den Anspruch, im Rahmen der Krebsfrüherkennung des Kolonkarzinoms, einen jährlichen Stuhltest auf diskretes Blut durchführen zu lassen. Ab dem 55. Lebensjahr sollte dann alle 10 Jahre eine Koloskopie terminiert werden, bei der gegebenenfalls Darmpolypen entfernt werden, die potenziell entarten können. Eine Polypektomie senkt entsprechend mehrerer Studien das Risiko an einem KRK zu versterben um etwa 53% (Zauber et al., 2012, S. 694).

Alternativ kann auch alle 2 Jahre ein Stuhltest durchgeführt werden. Bei Männern unterscheidet sich dieses Vorgehen lediglich beim Anfangsalter der Darmspiegelung, welches bei Männern auf 50 Jahre herabgesetzt wurde.

In der deutschen Leitlinie des KRK von 2017 wird diese Empfehlung sogar noch erweitert, so dass für Angehörige von Menschen, bei denen Krebsvorstufen, also Adenome oder

Polypen, entfernt wurden, ebenfalls eine Koloskopieempfehlung gilt. (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Deutschen Krebshilfe, & Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), 2017). War der Betroffene auch noch jünger als 50, wird empfohlen, dass auch erstgradig Verwandte bereits 10 Jahre vor der Diagnosestellung erstmals eine Darmspiegelung durchführen lassen. (Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum, 2016). Allerdings ist die Teilnahme am Screening immer noch zu gering. Die Teilnahmerate am KKK-Screening mittels Koloskopie nach einer ärztlichen Beratung ab 55 Jahren betrug laut der GEDA Studie 2014/2015 –EHIS retrospektiv bei den Männern 61% und bei den Frauen 57%, die in den letzten 10 Jahren an einer Koloskopie teilgenommen haben (Starker, Buttman-Schweiger, Kraywinkel & Kuhnert, 2017).

Neben den genannten Verfahren stehen auch neuere Untersuchungsmethoden zur Verfügung (z.B. Hämatoporphyrin- und immunochemische Tests [engl.: iFOBT]), die eine höhere Sensitivität aufzeigen sollen im Vergleich zum Guajakbasierten Stuhltest [engl.: gFOBT]. Seit dem 01. April 2017 sollte der quantitative immunologische Stuhltest den chemischen in der Diagnostik weitestgehend verdrängt haben. Blut im Stuhl, als Hinweis auf Darmkrebs, wird hierbei besser erkannt und durch Antikörper nachgewiesen. Die Störanfälligkeit z.B. durch Nahrungsmittel ist daher deutlich reduziert.

(Krebsinformationsdienst des Deutsches Krebsforschungszentrum, 2020)

Dennoch bleibt es weiterhin ein Test auf occultes Blut im Stuhl.

Ähnlich sieht es bei der Untersuchung von Biomarkern, zum Beispiel M2-PK, aus. Bei relativ schlechter Spezifität (82%), wird er aktuell „nur“ als individuelle Gesundheitsleistung (IGeL) angewendet (Haug, Hundt, & Brenner, 2008, S. 133) wird aber in einer Metastudie von Tonus et al 2012 (Tonus, Sellinger, Koss, & Neupert, 2012, S. 4004) bereits uneingeschränkt in der Klinik als ELISA und auch in der Praxis als Lateral-Flow-Test empfohlen, da der Vorteil darin bestehen soll, dass sowohl blutende als auch nicht-blutende Adenome/Karzinome im Stuhltest erkannt werden können.

Viele neuere Studien zeigen auch eine Korrelation zwischen der Einnahme von ASS (>75mg/d) und einem deutlich erniedrigtem Kolonkarzinomrisiko, auch bei den familiären Syndromen (Rothwell et al., 2010, S. 1746)

Des Weiteren waren andere Mikronährstoffe und Elektrolyte, wie Kalzium, Magnesium oder auch Vitamin D Konzentrationen als korrelierende Marker im Verdacht. Allerdings konnten bisher sowohl beim ASS als auch bei den Anderen keine ausreichend validen Ergebnisse vorgestellt werden, so dass in den aktuellen Leitlinien keine Empfehlung diesbezüglich vorgenommen wurden.

Adenom-Karzinom-Sequenz

Ein regelmäßiges und flächendeckendes Vorsorgescreening des Kolonkarzinoms erscheint angesichts der Adenom-Karzinom-Sequenz von größter Bedeutung, da dieser gesamte Ablauf etwa 5-10 Jahre in Anspruch nimmt.

Im klassischen Modell der Mehrschrittkarzinogenese von Fearon und Vogelstein (1990, S. 762) von zufällig auftretenden kolorektalen Karzinomen kommt es im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz zu einer vermehrten Ansammlung von genetischen Hits. Dieses Modell wurde über die Jahre mehrfach modifiziert und angepasst und vielfach durch Forschung entsprechend bestätigt und weiterentwickelt. So führen sowohl Funktionsverluste von Tumorsuppressorgenen (p53, DCC) als auch Aktivierungen von Onkogenen (ras) zu einem Adenom, aus dem ein metastasierendes Karzinom entstehen kann, was durch eine altersentsprechende Vorsorge und Polypektomie zumeist verhindert bzw. in einem frühen Stadium der Erkrankung entdeckt werden könnte. Nach der heutigen Sachlage entstehen circa 60 % der sporadischen Karzinome durch eine Adenom-Karzinom-Sequenz. (Tannapfel, Neid, Aust, & Baretton, 2010, S. 760)

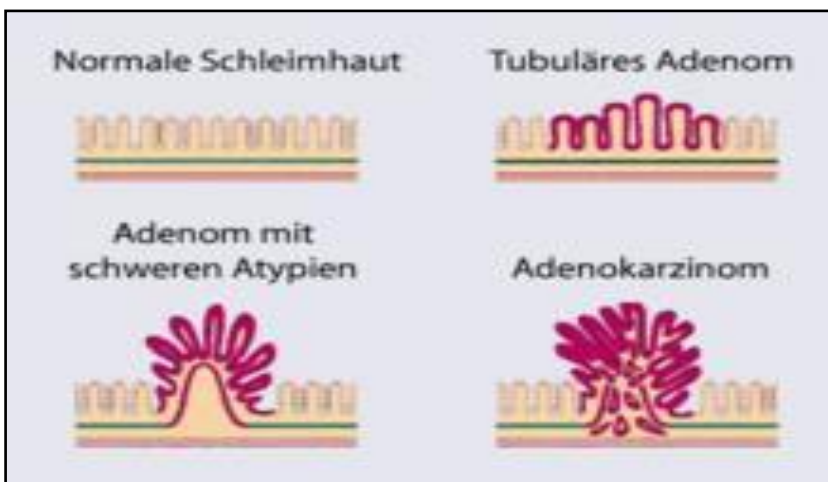


Abbildung 4: Schema der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein

Quelle: www.commons.wikimedia.org, erstellt 2006, Stand 31.03.2016, 14.25 Uhr

Durch die Inaktivierung des APC-Gens entsteht aus der unauffälligen Kolonmukosa ein überdurchschnittlich proliferatives Epithel. Das APC-Genprodukt zeigt seine Funktion wahrscheinlich in Zelladhäsion und Stabilisierung des Zytoskeletts, was durch Mutation in einem unkontrollierten Wachstum des Kolonepithels endet. Es entsteht ein frühes Adenom, was durch weiteren Verlust von Methylgruppen (Hypomethylierung) begünstigt zu werden scheint (Fearon & Vogelstein, 1990, S. 760). In einem nächsten Schritt wird durch Veränderung im ras-Gen (Onkogen) die Umwandlung in eine entartete Neoplasie fortgesetzt. Das nun veränderte ras-Protein sorgt für anhaltende Signale an die Zelle, so dass diese unkontrolliert wächst und schwerere Atypien in den größeren Adenomen verursacht. Durch den weiteren Verlust von anderen Tumorsuppressorgenen, wie dem DCC-Gen (deleted in colon carcinoma) und/oder p53, verwandelt sich das Adenom nun endgültig in ein Karzinom. Durch die DCC-Mutationen kommt es zum Verlust der Zelladhäsion, welche in den meisten KKR nachzuweisen sind. Die häufigsten Mutationen stellen aber Veränderungen im p53-Protein dar. Durch die Inaktivierung von p53 bleibt der programmierte Zelltod schlichtweg aus und so kann es überhaupt zu einem invasiven Wachstum der Tumorzellen kommen. (Schäferhenrich, 2003)

Zwei weitere Wege, die vorrangig mit erblich gehäuft auftretenden Karzinomen assoziiert sind, sollen hier nur kurz erwähnt werden. Zum einen die Dysplasie-Karzinom-Sequenz,

die im Zusammenhang mit den CED genannt wird und die Genetische-Instabilität-Karzinom-Sequenz, die gehäuft bei HNPCC-Tumoren vorkommt (Schäferhenrich, 2003).

Symptome

Erstbeschwerden können allgemein im Rahmen von Schwäche und Abgeschlagenheit auftreten, sind aber zumeist erst spätere Symptome einer Tumoranämie. Häufig haben die Patienten lange Zeit keinerlei Beschwerden, warum die meisten symptomatischen Karzinome erst in einem höheren Stadium diagnostiziert werden, wenn der Tumor beginnt zu bluten oder das Darmlumen relevant einengt. Dadurch bedingte Symptome sind dann häufig Flatulenz sowie auch abwechselnde Durchfälle mit Verstopfungen sowie Blutauflagerungen bzw. – beimengungen oder Schmerzen. Häufig mit vielen Tumorerkrankungen vergesellschaftet und auch ein häufiges Symptom, dass den Patienten zum Arzt treibt, ist ein zumeist deutlicher Gewichtsverlust ohne erkennbaren Grund.

Weitere Symptome können bei bereits erfolgter Metastasierung Leberinsuffizienz und Ikterus bei Fernabsiedlung in die Leber, Husten und /oder Dyspnoe bei pulmonalen Filiae oder seltener Knochenschmerzen bei Skelettbefall oder neurologische Ausfallerscheinungen bzw. Defizite bei Hirnmetastasen sein.

Dennoch befinden sich erstaunlicherweise bei geringer Screeningteilnahme 70% der diagnostizierten Karzinome bei Diagnosestellung im Stadium I/II (Pox et al., 2012, S. 1460). Häufig sind dies jedoch Zufallsbefunde, da das KRK in der Literatur passenderweise als „stille“ Erkrankung betitelt wird und daher auch nicht so selten in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird.

Diagnostik

In der üblichen Reihenfolge sollte anfangs ein ausführliches Anamnesegespräch, insbesondere in Hinblick auf die Familienanamnese erfolgen. Es schließt sich eine körperliche Untersuchung an. Anschließend sollte bei Beschwerden oder im Rahmen der Vorsorge ein Stuhltest auf okkultes Blut erfolgen, wobei sich bei positivem Ergebnis eine vollständige Koloskopie anschließen sollte. Bei Verdacht können bereits während dieser Untersuchung Biopsien entnommen werden, die vom Pathologen begutachtet werden müssen. Etwaige Polypen können meistens vollständig entfernt werden, so dass es gar nicht erst zu einer möglichen Entartung dieser kommen kann, wie es in der Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben ist.

Sollte sich hierbei das Vorliegen einer Darmkrebserkrankung bestätigen, würde sich ein Tumorstaging zur Stadieneinteilung, bestehend aus Abdomen-Sonographie, Röntgen Thorax in zwei Ebenen und einer Computertomographie je nach Risikolage des Thorax sowie des Bauchraums anschließen. Eine Magnetresonanztomographie oder Endosonographie wird eventuell zur Bestimmung des Weichteilgewebes (Lymphknoten) oder zur Bestimmung der Eindringtiefe des Tumors verwendet, ist aber ebenso wie die Skelett-Szintigraphie bei Verdacht auf Knochenmetastasen oder die

Positronenemissionstomographie kein Mittel der ersten Wahl in der Primärdiagnostik. Ausnahmen ergeben sich selbstverständlich aus individuellen Gegebenheiten.

Die Abnahme von Tumormarkern (CEA, CA 19-9) wird in der Klinik eher als Verlaufskontrolle, als im Rahmen der Primärdiagnostik gesehen, gehört jedoch dennoch zum Primärstaging entsprechend der aktuellen Leitlinie. Da die geringe Spezifität eine Früherkennung fehleranfällig macht, der Verlauf aber zumindest zum Teil mit der Gesamttumormasse korreliert, erreichen sie daher in der Tumornachsorge einen höheren Stellenwert.

Klassifikation des Kolonkarzinoms

Entsprechend der gängigen Tumorklassifikation wird auch das KKK nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, um die beste Therapie entsprechend der Ausbreitung des Tumors planen zu können. T bezieht sich dabei auf die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, N meint die Anzahl der regionären Lymphknoten, die befallen sind und M steht für das Vorhandensein von Fernmetastasen bzw. auch z.T für deren Lokalisation. Des Weiteren können, zumeist nach pathologischer Begutachtung, d.h. nach erfolgter Operation, weitere wichtige Kriterien erhoben und festgelegt werden. („Kolonkarzinom | Universitätsklinikum Ulm - Klassifikation und Stadieneinteilung“, o. J.)

Dabei wird zum einen nach mikroskopischer Untersuchung die Bösartigkeit mittels Vergleich der Ähnlichkeit zu den „gesunden“ Organzellen festgelegt und mit G für Grading (engl.: für Zellähnlichkeit) bezeichnet. Zum anderen ist es von entscheidender Bedeutung für die weitere Therapie, ob das Malignom komplett reseziert werden konnte, was sich in der sogenannten R-Klassifikation i.S. von Resttumor oder Residualtumor widerspiegelt.

Die Einteilung wurde entsprechend des Universitätsklinikum Ulm übernommen („Kolonkarzinom | Universitätsklinikum Ulm - Klassifikation und Stadieneinteilung“, o. J.)

TNM-Klassifikation der Kolonkarzinome

T= Größe und Ausdehnung

N= regionäre befallene Lymphknoten

M= Auftreten und Lokalisation von Fernmetastasen

Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

Tis Carcinoma in situ, nur in den oberen Schleimhautschichten

T1 Tumor infiltriert die Submukosa (Darmschleimhaut)

T2 Tumor infiltriert zusätzlich die Muscularis propria (Muskularis)

- T3 Tumor infiltriert die M. propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolonisches oder perirektales Gewebe (alle Schichten der Darmwand)
- T4 Tumor infiltriert in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
- NX Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
- N0 Benachbarte Lymphknoten sind frei von Metastasen (mindestens 12 Lymphknoten wurden untersucht)
- N1 Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
- N2 Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
- MX Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- M0 Kein Anhalt für Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen sind vorhanden (am häufigsten in Leber, Lunge und Lymphknoten, seltener im Gehirn und im Skelett)

G= Grading (Zellähnlichkeit)

- G1 Hochdifferenzierter Tumor, niedriger Malignitätsgrad
- G2 Mäßig differenzierter Tumor, mittlerer Malignitätsgrad
- G3-4 Schlecht differenzierter/undifferenzierter Tumor, hoher bis sehr hoher Malignitätsgrad

R = Residualtumor (Resttumor nach OP)

- RX Residualtumor kann nicht bestimmt werden
- R0 Kein Residualtumor, also vollständige Entfernung im Gesunden
- R1 Residualtumor mikroskopisch vorhanden
- R2 Visuell erkennbarer Residualtumor

Zusätzlich werden histologisch auch die Lymph- (L0-1) und Blutgefäße (V0-1) beurteilt, ob eine Infiltration vorliegt (zusätzlich Brierley, Gospodarowicz, & Wittekind, o. J.) Zur weiteren Einteilung nach Stadien wird die UICC-Einteilung benutzt. Diese wurde von der „Union internationale contre le cancer“ (UICC, Internationale Vereinigung gegen

Krebs, 1997) eingeführt und ist aktuell die gängigste und modernste Version der Stadieneinteilung. Entsprechend der Einteilung kann somit eine genauere Therapieplanung und Prognose abgeleitet werden. Die Dukes-Klassen A-D des britischen gleichnamigen Pathologen (1890–1977) von 1932, werden in der Klinik weniger verwendet, entsprechen aber den UICC Stadien I-IV und werden daher hier nicht aufgeführt. (Brierley et al., o. J.)

UICC 2010	TNM-System		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1, N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Therapie

Bei der Therapie ist insbesondere in Hinblick auf die chirurgischen und strahlentherapeutischen Maßnahmen zwischen Kolonkarzinom und Rektumkarzinom zu unterscheiden. Diese Arbeit soll daher auf die Therapie des Kolonkarzinoms beschränkt bleiben.

Werden bei der Vorsorgekoloskopie Adenome abgetragen, die nach histologischer Begutachtung bereits teilweise karzinomatöse Anteile enthalten, reicht die Abtragung bereits unter gewissen Gesichtspunkten als vollständige Therapie aus. Dabei muss histologisch ein R0-Resektat vorliegen, das heißt, es muss mindestens ein 2 mm breiter Resektionsrand karzinomfrei sein, alle im Resektat vorhandenen Lymph- und Blutgefäße sollen ebenfalls tumorfrei sein und können somit als L0 und V0 bezeichnet werden und es liegt ein gut differenzierter Tumor vor (G1-2). Sollten diese Kriterien nicht eingehalten werden können, muss chirurgisch entsprechend nachreseziert werden.

Solange der Tumor noch nicht metastasiert ist (Stadium I-III) wird zunächst versucht, chirurgisch eine En-bloc Resektion inklusive der umgebenden Lymphabflusswege durchzuführen. Dabei sollen, laut Leitlinie, mindestens 12 Lymphknoten mit entfernt werden. Auch in fortgeschrittenen Stadien muss über eine Operation zumindest diskutiert werden. Sinn der Operation ist es natürlich, den kompletten Tumor zu entfernen. Falls der Tumor aufgrund seiner Größe oder Verwachsungen nicht mehr vollständig entnommen werden kann, sollte zumindest der Erhalt der Darmdurchgängigkeit Priorität haben, um dem Patienten einen künstlichen Darmausgang zu ersparen. Heutzutage können auch schon etwaige Metastasen (Leber, Lunge oder Bauchraum) bei guten Voraussetzungen chirurgisch entfernt werden. (Christmann, Yiallourous, & fachlich beratend Graeven, 2017).

Im Stadium III, seltener auch in Stadium II bei ausgewählten Risikosituationen (T4, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering, Operation unter Notfallbedingungen, Tumorperforation/-einriss), schließt sich in der Regel nach erfolgreicher Operation eine halbjährige Chemotherapie an. (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019) Die Basis der Chemotherapie bei in kurativer Absicht reseziertem Kolonkarzinom besteht aus 5-Fluorouracil, entweder in Kombination mit Folinsäure (5-FU/FA-Schema) oder häufiger noch entsprechend der Leitlinie in Kombination mit Oxaliplatin (FOLFOX-Schema), da hierdurch ein Überlebensvorteil von 15-20% gezeigt werden konnte. Bei Gegenanzeigen gegen Oxaliplatin wird alternativ auf Capecitabin oral zurückgegriffen. Bolusschemata des 5-FU werden heute nicht mehr eingesetzt (Schmiegel et al., 2009, S. 843).

Bei ausgedehntem Tumorwachstum (ggf. mit Metastasierung) können Chemotherapien auch neoadjuvant angewendet werden, um die Tumormasse zu verkleinern und im Anschluss ggf. eine komplette Resektion und Heilung möglich zu machen. Dies gelingt etwa bei einem Viertel der Patienten. Die Wahl der systemischen Therapie erfolgt also je nachdem, ob eine R0-Resektion, vor oder nach Therapie, potenziell überhaupt in Frage kommt.

Seit Jahrzehnten besteht also der Standard der adjuvanten und teils auch neoadjuvanten Chemotherapie des Kolonkarzinoms wie oben bereits beschrieben aus 5-FU und Leukovorin/Folinsäure, wobei dies bereits seit Jahren durch zusätzliche Substanzen, wie Oxaliplatin (FOLFOX) erweitert wurde und dadurch auch die Überlebenszeit der Patienten bzw. die progressionsfreie Zeit deutlich verlängert werden konnte. Daher steht Oxaliplatin als Kombinationspartner aktuell im Vordergrund. Laut der onkologischen Leitlinie von 2019 sollen Substanzen wie Irinotecan und monoklonale Antikörper in der adjuvanten Therapie zunächst keine Anwendung finden (Schmiegel et al., 2009, S. 843; Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019)

In mehreren Studien der European Organisation for Research and treatment of Cancer (EORTC) ergeben sich Hinweise darauf, dass durch diese Standardtherapie das Risiko, die verbleibende Leber stark zu schädigen, erhöht ist (Rosa, de Jesus, de Mello, Cesar, & Correia, 2015, S. 582).

Seit 2001 steht aber auch ein Wirkstoff als sogenanntes Prodrug-Capecitabin (UFT) bereit, der in Tablettenform oral eingenommen werden kann und erst am Wirkort, vorrangig erst in den Tumorzellen, in 5-FU umgewandelt wird. Außerdem kann Capecitabin je nach Tumorausbreitung entweder als Monotherapie oder auch in Kombination mit platinhaltigen Regimen verwendet werden (Moser (Leiter Online-Redaktion), Dölger, Egermeier, Endris, & Hüttemann, 2017).

Danach erfolgt die strukturierte Nachsorge mit dem Ziel, einen möglichen Rückfall frühzeitig zu erkennen. Alle Patienten mit einem pT1- Tumor sollen 6 Monate postoperativ eine erneute Koloskopie bzw. lokale Nachsorge erhalten, spätestens sollte nach 3 Jahren eine komplette Koloskopie durchgeführt werden. Eine weitere Nachsorge ist im UICC – Stadium I angesichts der geringen Rezidivrate und guten Prognose nach operativer

kurativer Therapie nicht nötig, so dass die Patienten je nach Befund der Koloskopie (Polypenanzahl und –beschaffenheit) einbestellt werden sollten (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019). Im Stadium II-III sollte hingegen eine regelmäßige Nachsorge für 5 Jahre erfolgen; bestehend aus der bereits genannten endoskopischen Kontrolle 6 Monate postoperativ bzw. innerhalb 1 Jahres postop. Bei unauffälligem Befund sollte eine endoskopische Kontrolle nach 5 Jahren erfolgen. Finden sich in der Untersuchung allerdings Auffälligkeiten i.S.e Neoplasie sollte eine Nachsorge wiederum 6 Monate und dann nach 3 Jahren erfolgen. Jährliche Röntgenkontrollen des Thorax analog zum Rektumkarzinom und halbjährliche Laborkontrollen bezüglich des Tumormarkerverlaufs CEA werden empfohlen. Die sonographische Nachsorge des Abdomens, um Lebermetastasen zu erkennen, wird von Experten befürwortet. Der Guajak-Stuhltest sei für die Nachsorge nicht mehr geeignet. Die Nachsorge sollte jedoch nur erfolgen, wenn sich daraus therapeutische Konsequenzen im Falle eines Rezidivs ergeben (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019). Um eine selektive Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms möglich machen zu können, wurden in den letzten Jahren die monoklonalen Antikörper in der Therapie des mKRK eingesetzt. Der Einsatz dieser gezielten Medikamente kann die Überlebenszeit in diesem Stadium um weitere mehrere Monate verlängern, dies wurde bereits in mehrfachen Studien bestätigt (Tol & Punt, 2010, S. 437; Wang, Chen, Li, & Sheng, 2012, S. 155).

Die modernen zielgerichteten Therapien, die einerseits gegen Wachstumsfaktoren für Tumore wirken, deren Blutversorgung verhindern oder dafür sorgen, dass Signalübertragungswege nicht mehr funktionieren, werden bereits Jahre intensiv beforscht und weiterentwickelt. Zwei vielversprechende Ansätze in diesem Bereich sind die Angiogenesehemmer und die Wachstumsrezeptorblocker. Beide Medikamente sind in Kombination mit Chemotherapie beim metastasierten Kolonkarzinom zugelassen. (Christmann et al., 2017)

Der Angiogenesehemmer Bevacizumab sei hier nur kurz erwähnt. Dies ist ein Antikörper, der sich gegen den VEGF (vascular endothel growth factor) richtet, der u.a. von Darmkrebszellen freigesetzt wird und die Angiogenese in Richtung Tumorgewebe bewirkt. Dadurch gelangen einerseits vermehrt Sauerstoff und Nährstoffe ins Gewebe und andererseits wird dadurch der Anschluss des Tumors an den Blutkreislauf hergestellt, so dass eine Metastasierung über den Blutweg stattfinden kann. Bevacizumab blockiert VEGF, wodurch die Bildung der Blutversorgung des Tumors verhindert wird und damit auch dessen Wachstum und Ausbreitung gehemmt wird (Christmann et al., 2017). Insbesondere soll in dieser Arbeit auf Cetuximab (Erbix®) eingegangen werden, um einen interessanten neuen Therapieweg aufzuzeigen.

In der Mehrheit der Tumore kann nämlich auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen der EGFR nachgewiesen werden, der ein Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) darstellt. Wie der Name bereits verrät, fördert er das Wachstum von Krebszellen, indem er an der Bindungsstelle andockt und eine Signalkaskade auslöst. Wird sein Rezeptor nun aber durch etwas anderes blockiert, kann der eigentliche Signalweg, der im Tumorwachstum endet, nicht mehr ausgelöst werden. Das „Andere“ sind zum Beispiel

Wirkstoffe, die die Bindungsstelle des EGF blockieren. Diese heißen Cetuximab und Panitumumab. Beide Wirkstoffe zeigen effiziente Ergebnisse bei Patienten ohne Mutation vor allem im KRAS-Gen, daher sollte eine vorherige Analyse dieser Genregion erfolgen um toxische und unerwünschte Nebenwirkungen bei Patienten zu vermeiden. Der KRAS-Status wird daher bereits häufig in der Literatur als Biomarker für die Effizienz der Therapie des Cetuximab bezeichnet (Li, Liang, Huang, & Cai, 2015, S. 7022) Dies wird allerdings in der Literatur auch kontrovers diskutiert, da sich gewisse KRAS-Mutationen trotzdem als Target der Antikörpertherapie zeigten, worauf im Laufe dieser Arbeit noch zum Teil eingegangen werden soll (Christmann et al., 2017). Die Strahlentherapie spielt in der Primärtherapie des Kolonkarzinoms eine eher untergeordnete Rolle und kommt vor allem beim Rektumkarzinom zum Einsatz und wird dabei häufig im Stadium II und III vor einer operativen Entfernung eingesetzt.

Der EGFR-Signaltransduktionsweg

Komplexe Veränderungen in zelleigenen regulatorischen und Signaltransduktionsprozessen führen im Verlauf zu einer ungehinderten Zellteilung und somit zur Ausbildung von Tumoren. Einer der zentralen Signalwege, welcher Zellteilung und Zelltod reguliert, ist der EGFR-Signalweg.

Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Transmembranprotein auf allen Zellen im Körper, an dessen extrazellulären Teil Epidermale Wachstums Faktoren (Epidermal Growth Factor EGF) binden können. Er gehört zur Familie der ErbB/HER-Familie, die in vier Rezeptor-Tyrosinkinasen unterteilt wird. EGFR aktiviert drei hauptsächliche nachgeordnete Signalwege: 1) den RAS-RAF-MAPK Signalweg, welcher an der Zellteilung, Tumorausbreitung und Metastasenbildung beteiligt ist, 2) den PI3K/AKT Signalweg, welcher zelluläre Überlebenssignalwege und anti-apoptische Signale, wie z.B. NFkB aktiviert, und 3) den JAK/STAT Signalweg, ein zentraler Signalweg der angeborenen Immunantwort, welcher desweiteren in der Aktivierung von Genen für das Zellüberleben beteiligt ist (Vincenzi, Zoccoli, Pantano, Venditti, & Galluzzo, 2010, S. 80).

Da bereits im Vogelstein-Modell der MAPK-Pathways für KRK hervorgehoben wurde, soll im Weiteren darauf eingegangen werden.

Durch Bindung des Liganden (EGF, TGF-alpha) an den Rezeptor dimerisieren diese durch Autophosphorylierung. Kofaktoren werden an der Membran versammelt, so dass Ras durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. Die Effektoren der Ras-Familie, die über Farnesyl-Anker membrangebunden sind, sind kleine GTPasen. Danach werden zytosolisch sukzessive verschiedene Proteine (Raf-MEK-Erk) aktiviert, die letztendlich im Zellkern zu verschiedenen und umfangreichen Reaktionen führen. (s. Skizze).

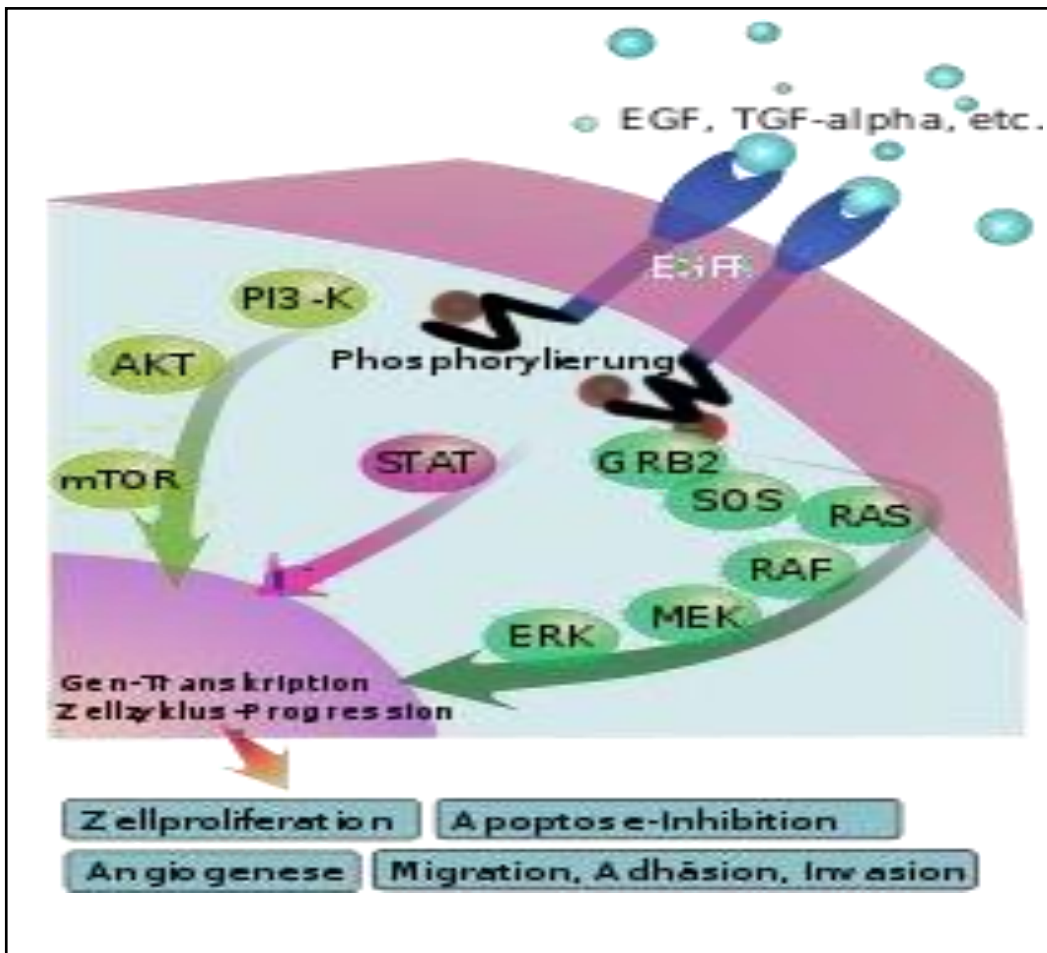


Abbildung 5: Schematische Signalkaskaden EGFR

Quelle: www.wikipedia.org/wiki/EGF-Rezeptor, Stand 08.04.2016, 11.28 Uhr

Bei passager suboptimalen Bedingungen wird die vermehrte Expression des EGFR-Gens erreicht und ist normalerweise reversibel. Durch Mutationen auf dieser Ebene oder im Bereich des EGFR selbst oder auch auf Ebene des Raf wird die Signalkaskade dauerhaft angeschaltet und führt dazu, dass die Zelle in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren weiterhin Signale erhält, die sie zum unkontrollierten Wachstum anregen, so dass eine Krebszelle entsteht. Mutationen in Exon 12 oder 13 des KRAS-Gens liegen häufig bei Kolonkarzinomen vor.

Die neuen gezielteren Formen der Therapie (engl. targeted therapy) sind darauf gerichtet, das Signal von EGFR zu blockieren, was dazu führt, dass das Tumorstadium zum Stillstand kommt. Zu den neuen Substanzen, die bereits erfolgreich getestet und zugelassen wurden, zählen unter anderem Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva) und Afatinib (Giotrif) oder die monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix) und Panitumumab (Vectibix) („EGF-Rezeptor“, Wikipedia.; Ciardiello & Ma, 2005, S. 18).

Therapeutischer Antikörper mit Spezifität für EGFR - Cetuximab

Karzinome, die den EGFR auf ihrer Oberfläche überexprimieren, zeigen häufig Resistenzen gegen die üblichen zytotoxischen Agenzien und sind auch häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Der erste monoklonale Antikörper (M225) gegen den EGFR wurde 1983 entwickelt. In präklinischen Studien zeigten sich bereits damals erste Erfolge, allerdings zeigte sich, aufgrund der komplett murinen Struktur, eine humane-Anti-Maus-Antikörper-Reaktion (HAMA, human anti mouse antibody, was die Neutralisierung zur Folge hatte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser mit ähnlicher Affinität wie die ursprünglichen Liganden kompetitiv an den Rezeptor bindet, um somit die Proliferation von epithelialen Tumorzellen zu inhibieren (Vincenzi et al., 2010, S.80).

Cetuximab hingegen, oder mit Handelsnamen Erbitux, ist ein chimärer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, der therapeutisch gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet ist. („Cetuximab“, Wikipedia)

Er bindet an die Domäne III des EGFR und verhindert damit sowohl die Bindung von Liganden, als auch den Wechsel in die entspannte Form des Rezeptors, was die Dimerisierung verhindert, wodurch einerseits die Zellinvasion in gesundes Gewebe vermindert wird, als auch andererseits die Metastasierung reduziert wird. Außerdem wird eine Down-Regulation des Rezeptors erreicht. (S. Li et al., 2005, S. 301)

Erbitux ist in 114 Ländern weltweit für die Behandlung von Kolorektalkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses zugelassen. („Cetuximab“, Wikipedia; Merck Serono GmbH & Olaniran, 2013; Eckhardt (Merck), 2019)

Die Kombinationstherapie aus Cetuximab und Irinotecan konnte in der BOND-Studie bei Patienten mit einem mKRK und Irinotecan-Vorbehandlung eine signifikante Verbesserung von progressionsfreiem Überleben und Ansprechrare darstellen. Auch in der Zweitlinientherapie konnte eine Verbesserung der Überlebenszeit gesehen werden, die jedoch noch nicht signifikant war (Stintzing et al., 2009, S. 202; Cunningham et al., 2004, S. 337).

Insbesondere konnte jedoch in aktuellen Studien und Metaanalysen gezeigt werden, dass vor allem Patienten von der Erstlinien-Kombinationstherapie mit Cetuximab profitieren, wenn deren KRAS-Status nicht mutiert ist, allerdings scheinen aktuelle Ergebnisse auch Hinweise darauf zu geben, dass bestimmte Mutationen, die bisher noch nicht eindeutig identifiziert worden sind, dennoch auf Cetuximab ansprechen. Insgesamt konnte die Überlebensrate des metastasierten kolorektalen Karzinoms seit der Einführung von Irinotecan, Oxaliplatin und den monoklonalen Antikörpern mindestens verdreifacht werden. Allerdings zeigten auch mehrere Studien, beispielsweise NORDIC VII oder auch teils die COIN-Studie kontroverse Ergebnisse, die die Wirksamkeit von Cetuximab in diesem Setting in Frage stellen (Sotelo, Garcia-Paredes, Aguado, Sastre, & Diaz-Rubio, 2014, S. 4208). Verglichen mit den meisten Zytostatika ist Cetuximab jedoch relativ nebenwirkungsarm, bis auf einen häufig auftretenden akneartiger Hautausschlag, der allerdings mit einem Therapieerfolg zu korrelieren scheint, aber dennoch die

Lebensqualität der Patienten nicht unerheblich einschränkt sowie einer Hypomagnesiämie und leichten bis mittelschweren Infusionsreaktionen. Überempfindlichkeitsreaktionen werden in der Monotherapie aber eher seltener beobachtet („Cetuximab“, Wikipedia; Eckhardt (Merck), 2019)

Gentherapie und Vektorsysteme

Gentherapeutische Möglichkeiten werden bereits seit mehr als 30 Jahren erörtert und sind aktuell immer noch Bestandteil der Forschung. Der ursprüngliche Gedanke der Gentherapie, defekte Gene einfach durch Neue, Gesunde zu ersetzen und somit Krankheiten zu heilen, wurde in den letzten Jahrzehnten doch deutlich erweitert. Unter der Gentherapie wird heute auch die Einführung von Substanzen verstanden, die beispielsweise die Expression schädlicher Gene ganz gezielt verhindern.

Nachdem 1982 erste Erfolge in der Gentherapie erzielt werden konnten (Rubin & Spradling, 1982, S. 348), dauerte es noch bis 1990 bis die erste Studie im Rahmen einer Gentherapie mit Adenosin-desaminasemangelkrankheit (ADA) am Menschen durchgeführt wurde (Anderson, Blaese, & Culver, 1990, S. 331). Seither wird dieses Gebiet, insbesondere wegen der gewünschten Reduktion der Nebenwirkungen und Verbesserung des Therapieerfolgs intensiv beforscht. Eine „gute“ Gentherapie sollte neben einem geeigneten therapeutischen Ansatz (Gen), auch einen Weg finden, in die Zielregion der entsprechenden Zelle zu gelangen sowie dann auch noch eine im Idealfall regulierbare Produktion des Transgens zur Therapie von Krankheiten oder ihren Symptomen zu erreichen.

Man unterscheidet virale von nicht-viralen Vektorsystemen, die für den Gentransfer genutzt werden. Virale Vektoren (Retroviren, Adeno-assoziierte Viren, Adenoviren, Lentiviren) haben den Vorteil, dass sie deutlich höhere Transfektionseffizienz erreichen und sich hohe Virustiter produzieren lassen. Dabei ist sowohl eine Transduktion von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen möglich. Diesen Viren ist es daher möglich, DNA in Wirtszellen einzubringen und zu exprimieren, ohne sich jedoch zu vermehren. Dazu werden einige virale Funktionen verändert, indem spezifische Gene entfernt und durch das therapeutische Gen ersetzt werden, so dass die Virusreplikation und Assemblierung nicht mehr möglich sind. Später transfiziert man diesen Virus in Verpackungszelllinien, durch die die fehlenden Proteine bereitgestellt werden, da die deletierten Virusgene stabil in ihrem zellulären Genom inseriert sind. Insbesondere rekombinante Adenoviren erhielten daher besondere Aufmerksamkeit. Mit Insertionsgrößen bei Zweitgenerationsviren von bis zu 8kb (Transgen) sowie sogar 36kb in der dritten Generation, sind sie anderen Vektoren schlicht überlegen.

Allerdings gibt es dennoch Probleme bei der Verwendung dieser Vektorsysteme. Durch die viralen Proteine können die zelluläre und humorale Immunantwort aktiviert werden, wodurch der Vektor abgebaut wird und eine Re-Infektion dann nicht mehr möglich ist und es wird auch theoretisch die Möglichkeit der Rekombination zurück zu einem Wildtyp-Virus bei der Generierung in den Helferzelllinien beschrieben. Bisher konnte davon jedoch in vorklinischen oder klinischen Studien noch nicht viel beobachtet werden (Eck &

Wilson, 1996, S. 77). Die nicht-viralen Vektorsysteme beruhen auf chemisch-physikalischen Methoden wie zum Beispiel die Liposomenmethode, bei der die Fremd-DNA in Liposomen verpackt wurde, um sie dann den Zielzellen anzubieten. Dabei ist die Aufnahme durch Endozytose in die Zellen noch sehr effizient, nur leider gelangen die eigentlichen Informationen, also die DNA, nicht bzw. nur zu einem ganz kleinen Teil in den Zellkern. Der restliche Teil des Lipids wird von entsprechenden Abbausystemen entsorgt. Im Gegensatz zum viralen System wird hierbei keine Immunantwort provoziert, dennoch auch keine dauerhafte Expression des Wunschprodukts ermöglicht.

Eine weitere Gentransfermethode ist die Elektroporation, bei der ein Spannungsfeld erzeugt wird, so dass die Methode im Stande ist, Moleküle, die die Größe wie DNA besitzen, über eine gesteigerte Permeabilität der Zellmembran ins Innere aufzunehmen. (Andreason & Evans, 1988, S. 650).

Die direkte Injektion zählt ebenfalls zu den nicht-viralen Gentransfermethoden. Alle haben sie jedoch gemeinsam, dass die Transduktion der Zielzellen ineffizient erscheint.

Daher werden in den meisten Fällen, insbesondere in den meisten klinischen Studiendesigns, vorrangig virale Vektorsysteme verwendet, die in der Mehrzahl der Fälle aus Adeno- und Retroviren bestehen. Wobei beide unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen, die den Einsatz limitieren.

Der ideale Vektor, der kostengünstig und einfach herzustellen ist, selektiv und effizient Zielzellen infiziert und dann auch noch eine regulierbare Genexpression ohne hervorgerufene Immunantwort zeigt, konnte allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entwickelt werden.

Adenoviren

Klassifizierung

Erstmals wurden Adenoviren 1953 von Rowe und Kollegen aus Rachenmandeln („adenoides Gewebe“) kultiviert und beschrieben (Neumeister et al., 2009, S. 785). Bisher sind aus der Familie der Adenoviridae 47 human- und tierpathogene Virusspezies mit zahlreichen Subtypen bei Säugetieren, Reptilien und Vögeln sowie Fischen bekannt, die in 5 Gattungen unterteilt werden. Aus Schimpansen isolierte Adenoviren werden aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zu menschlichen Adenovirus-Arten klassifiziert. („Adenoviridae“, 2009, Stand 22.08.2019). Die humanen Adenovirus-Spezies A-G gehören zur Gattung der Mastadenoviren und umfassen derzeit über 50 Virustypen. Diese werden nach bestimmten Kriterien, wie Sequenzhomologie, Hämagglutination und anderen biologischen Mustern eingruppiert (Alonso-Padilla et al., 2016, S. 6)

Klinik der humanen Adenoviren

Die humanpathogenen Adenoviren sind extrem widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse aller Art und können lediglich durch starkes Erhitzen über einen längeren Zeitraum inaktiviert werden. Aufgrund ihres ikosaedrischen und stabilen Kapsid ohne eine empfindliche Hülle bleiben die Viren lange infektiös und können so auf verschiedensten Eintrittspforten zahlreiche Erkrankungen auslösen, in erster Linie jedoch Atemwegserkrankungen, die auch lebensbedrohlich sein können, aber auch Gastroenteritis, Keratoconjunctivitis epidemica, Zystitis, Rhinitis, Pharyngitis oder Durchfälle können durch die verschiedenen Serotypen ausgelöst werden. Da die meisten Erkrankungen jedoch einen milden Verlauf zeigen und auch mangels virusspezifischer Therapie, beschränkt sich die Behandlung auf eine Symptomlinderung. (Neumeister et al., 2009, S. 787)

Aufbau und Lebenszyklus

Die Adenoviridae-Familie besteht aus unbehüllten dsDNA-Viren mit einem Kapsid, das ikosaedrische Symmetrie besitzt und einen besonderen Aufbau aus 12 Penton- und 252 Hexon-Kapsomeren zeigt. Dabei bestehen die Kapsomere aus insgesamt 240 Hexonen, die als Trimere aufgebaut sind. An den 12 Ecken befindet sich dann jeweils von den Pentonbasisproteinen ein Pentamer, an die ein charakteristischer Fiber, was Fiber-Protein-Trimer genannt wird, mit einer knopfähnlichen Struktur am Ende gekoppelt ist (Heim, 2020, S. 514) Diese „Antennen“ sind für das Andocken des Virus an die Wirtszelle über bestimmte CAR-Rezeptoren verantwortlich (Neumeister et al., 2009). Im Inneren des Kapsids liegt die dsDNA mit einer Länge von ca. 36-38kb, an den Enden finden sich ITRs (inverted terminal repeats) sowie am 5'-Ende ein kovalent gebundenes terminales Protein, welches als Primer für die Replikation des Virusgenoms sowie auch für die Verpackung in Virionen dient. Die Replikation der Virus-DNA beginnt am Replikationsursprung (origin of replication), der sich an den Enden der Moleküle befindet. Dabei wird der andere DNA-Strang verdrängt (strand displacement) (Schwarz, 1999).

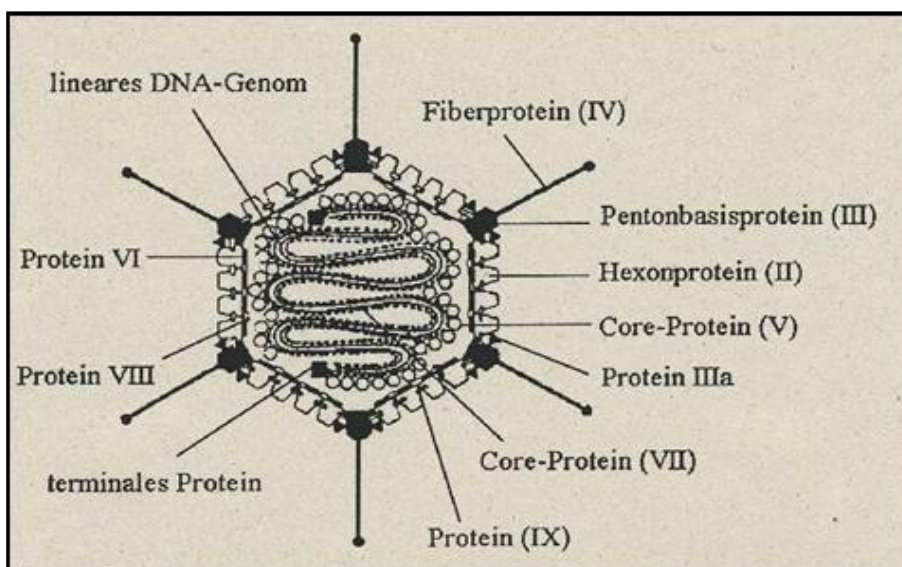


Abbildung 6: Aufbau des Adenovirus - schematisch

Quelle: Modrow und Falke, 1997, entnommen aus Dissertation Dannowski, 2004

Das Genom enthält fünf kodierende Bereiche und kann beidgerichtet transkribiert werden. In der frühen Phase der Infektion werden vier kodierende Bereiche exprimiert (E1-E4, E wie early). Deutlich mehr Anteile des Genoms kodieren allerdings für die späte Phase RNA, d.h nach der Replikation. Diese späte RNA (L wie late) kodiert für Strukturproteine und entsteht aus einem größeren Vorläufermodell durch Spleißen (Löhr, 2003). Die Viruspartikel werden anschließend im Zellkern zusammengesetzt. Erfolgt nun eine Infektion weiterer Zellen über eine rezeptorvermittelte Adsorption und Endozytose, führt dies in der Wirtszelle zur Abschaltung der zellulären DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese. In Versuchen mit Zellkulturen erkennt man dabei einen typischen cytopathogenen Effekt. Die E3 Region sorgt ebenfalls durch Codierung des Adenovirus Death Protein für die Lyse und vollständige Zerstörung der Zelle. Im Genom der humanen Adenoviren liegt die transformierende Region im linken terminalen Bereich, der für die E1A und E1B codiert. E1A bindet dabei das Tumorsuppressorgen pRB und verhindert somit die inhibitorische Funktion bei der Zellteilung. E1B dagegen bindet sich an p53 und verhindert ebenfalls dessen Aufgaben bei Zellteilung und Apoptose (Schwarz, 1999).

Verschiedene Generationen der Vektoren und Immunantwort auf adenovirale Infektionen

Wie bereits besprochen, zeigen sich Adenoviren als besonders fähige Vektoren. Problematisch ist jedoch die relativ zügig einsetzende und daher limitierende Immunantwort und damit verbundene Entzündungsreaktion gegen die Vektoren durch die gebildeten viralen Proteine, welches die dauerhafte Genexpression limitiert und ein erneutes Einbringen der Adenoviren deutlich erschwert, da sich neutralisierende Antikörper bilden (Wilson, 1996, S. 1186). Die Immunantwort setzt sich dabei aus mehreren Phasen zusammen (Kovesdi et al., 1997; Benihoud et al., 1999)

Initial kommt es durch zytotoxische T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK) zu einer Leukozyteninfiltration, die etwa in den ersten 4 Tagen beobachtet werden kann. Durch die Darstellung viraler Proteine auf den MHC-I-Molekülen infizierter Zellen, die ansonsten in allen kernhaltigen Zellen des Körpers vorkommen, werden die T-Zellen aktiviert und wirken zytotoxisch (Yang et al., 1995 S. 7259). Nach Aktivierung werden Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interferone und weitere Botenstoffe ausgeschüttet und es wird der Interleukin-2-Rezeptor synthetisiert, der zusammen mit Interleukin-2 (IL-2) für die Proliferation der CD8⁺-T-Zellen verantwortlich ist. Durch IFN- γ (Interferon- γ) wird die Rezeptordichte der MHC-I-Moleküle ebenfalls erhöht (Yang et al., 1995, S. 7259). Insgesamt wirkt dies den immunmodulatorischen Steuermechanismen des Adenovirus, vermittelt über die E3-Region, entgegen. Durch Hemmung der Glykosidierung und Transport der MHC-Klasse I-Moleküle kommt es zur verminderten Dichte an der Zelloberfläche, dadurch kann sich die betroffene Zelle vor Zugriffen der zytotoxischen T-Zellen schützen, wird allerdings gleichzeitig sensibler für die Angriffe und Zerstörung durch Natürliche Killerzellen, weil diese durch die verminderte Anzahl von MHC-Klasse-I-Moleküle vermehrt aktiv sind (Lanier, 1998). Fünf Tage nach der Infektion beginnt die zweite Phase. Dort werden durch die Prozessierung viraler Gene CD4⁺-T-Lymphozyten durch MHC-Klasse II- Moleküle, die durch antigenpräsentierende Zellen

exprimiert werden, aktiviert. Die aktivierten T-Lymphozyten werden in zwei Gruppen unterteilt: die T_H1-Zellen und die T_H2-Zellen. Die T_H1-Lymphozyten schütten typischerweise IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α , so dass sie die oben genannten Mechanismen weiter verstärken und zusätzlich eine Vasodilatation im Gewebe verursachen und somit ebenfalls die Durchblutung steigern, so dass bei gesteigerter Permeabilität der Gefäße weitere Immunzellen aus dem Blut einwandern können. Eine der Hauptfunktionen der Typ2-CD4⁺- T-Zellen ist die Kommunikation mit B-Lymphozyten vorrangig über Zytokine, aber auch andere zellständige Moleküle. Dadurch werden diese zur Produktion und Freisetzung von neutralisierenden Antikörpern angeregt. Das ist ein wesentlicher Schritt für die humorale Immunantwort und wird durch die Ausschüttung der Interleukine IL-4, 5, 6, 10 und 13 charakterisiert („T-Helferzelle“, 2009, abgerufen 22.08.2019). Eine erneute adenovirale Infektion wird dadurch limitiert (Yang et al., 1995 S. 7259). Es wurde daraufhin einerseits versucht, durch Deletion der viralen Gene sowohl die Transgengröße zu erhöhen und aber auch die Effizienz, durch Minimierung der Immunantwort, weiter zu steigern. Dadurch entstanden mehrere Generationen von adenoviralen Vektoren.

Die erste Generation zeichnet sich durch eine Deletion der E1- und E3- Region aus, wodurch Replikationsdefizienz erreicht wurde, jedoch weiterhin eine effiziente Infektion der Zielzelle stattfindet. Die E1-Region wird in der Virusherstellung von entsprechenden Verpackungszelllinien in-trans zur Verfügung gestellt. Ansonsten hat die Region wesentliche Aufgaben für die Expressionsregulation der viralen Gene. Die 293-Zelllinie ist eine menschliche embryonale Nierenzelllinie, die erstmals 1977 von Graham etabliert wurde und eine solche „Verpackungszelllinie“ darstellt, da vom Adenovirus 5 über 10% des Genoms stabil transfiziert werden (Graham et al., 1977, S. 59-72).

Bei der Zweitgeneration wurden außerdem die E2- und E4-Region entfernt. Sie sind für wichtige zellulärer Abläufe, wie Regulation oder Translation sowie Transkription zuständig gewesen. Dadurch konnte noch mehr Platz für die gewünschten Inserts geschaffen werden, die nun bis zu 10-13kb groß sein konnten. Durch die verringerte Expression viraler Gene konnte nun auch ein weiterer Vorteil gesehen werden. Es zeigte sich ein geringeres Nebenwirkungsprofil durch die verringerte Immunantwort und auch durch eine geringere Toxizität. Allerdings stellt sich dann das Problem der Produktion dar, da die benötigten Zelllinien schwer hergestellt werden können und daher eher geringere Virustiter abrufbar sind (Relph et al., 2005). Um weiter noch größere Transgene einbringen zu können, wurden die sogenannten „gutless“ oder *high-capacity vectors* geschaffen. Dabei wurden alle DNA-Sequenzen, bis auf die Wichtigsten Regionen (ITRs) rechts und links, die den Startpunkt der DNA-Replikation und das Verpackungssignal enthalten und etwa zusammen 520bp ausmachen, deletiert. Somit konnte in adenoviralen Vektoren die Insertgröße auf 36kb gesteigert werden. Alle notwendigen Funktionen für die Replikation und die Hülle des Virus werden durch Helferviren bereitgestellt, dessen DNA selbst, aufgrund eines Defekts in der Verpackungsdomäne, nicht in die Virionen eingebaut wird. Daher werden sie auch helferabhängige Vektoren genannt (Schiedner et al., 1998; Mitani et al., 1995; Parks et al., 1996). Dennoch zeigen sich in 2 Dekaden der intensiven Forschung Probleme, die vor allem die weltweite spezifische Immunität und die Lebertoxizität des am häufigsten verwendeten adenoviralen Serotyp-5 betrifft und somit

die klinischen Einsatzmöglichkeiten weiter limitiert. So zeigen auch hohe intravenös verabreichte Dosen des Vektors allergische zytokinvermittelte Schockreaktion, die zum Tod von Patienten in einer klinischen Studie führte. Alonso-Padilla et al. gibt in einem Review von 2015 verschiedene Ansätze wider, die insbesondere die Immunantwort und die Lebertoxizität bei gleichbleibender Effizienz und Transgengröße verringern sollen, so werden beispielsweise HAd-5 (humaner Adenovirus Serotyp 5) mit Mauskapsidbestandteilen oder Ad5 mit veränderten Fiber hergestellt oder völlig andere Serotypen bzw. sogar andere Gattungen an Adenovirusvektoren ausprobiert, um neue Generationen der sicheren und effizienten Vektoren zu ermöglichen.

Tetrazyklin-induzierbare und –supprimierbare Transgenexpressionssysteme

Als Grundlage dient für diese Arbeit das System zur Genexpressionsregulation, welches von Bujard et al. entwickelt wurde: das Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem. Die Genexpression kann damit relativ einfach und genau in Abhängigkeit der Antibiotikadosis reguliert werden (Gossen & Bujard, 1992, ab S. 5547). Es reagiert dabei auf bereits geringe Konzentrationen von Tetrazyklin oder seiner Abkömmlinge, vor allem Doxyzyklin, was natürlich auch der Sicherheit im klinischen Bereich dient. Dabei werden zwei Systemmöglichkeiten unterschieden: zum einen das Tet-Off- und zum anderen das Tet-On-System.

Beide Systeme basieren auf dem Tetrazyklin-Resistenz-Operon von *Escherichia coli*. Wobei die Resistenz gegen Tetrazyklin ein relativ verbreiteter Mechanismus im gram-negativen Bereich der Bakterien darstellt. Das Membranprotein, welches für die Resistenz des Bakteriums gegen Tetrazyklin/Doxyzyklin verantwortlich ist, heißt Tetrazyklin-Resistenzprotein TetA und schleust Tetrazyklin und seine Derivate im Austausch mit einem Proton heraus (Eckert & Beck, 1989, ab S. 11663). Die Transkription des Tetrazyklin-Resistenz-Operon wird bei Nichtvorhandensein von Tetrazyklin durch den Tet-Repressor verhindert und durch Andocken des Tetrazyklins oder seiner Derivate an den Repressor erst aktiviert (TET Systems: Kontrollierte Genexpression bei Eukaryonten, 2010).

Tet-Off-System

Bujard und Mitarbeiter vereinten den Tet-Repressor mit der VP16-Aktivierungsdomäne vom Herpes simplex Virus, dadurch wurde der Repressor in einen Transkriptionsaktivator verwandelt. Das neu entstandene Fusionsergebnis wird in dieser Form (Hybridprotein) Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (tTA) genannt und auf einem der beiden Vektoren des Tet-Expressionssystems kodiert (TET Systems: Kontrollierte Genexpression bei Eukaryonten, 2010). Dieser Transaktivator (tTA) verbindet sich als dimeres Protein durch den TetR-Anteil an eine von sieben nacheinander geschalteten Operatorsequenzen (tetO₇-Sequenz), so dass der VP16-Teil die Transkriptionsinitiation über einen minimalen CMV-Promotor (CMV_{min}, Cytomegalie Virus) eines nachgeschalteten Gens starten kann. Der

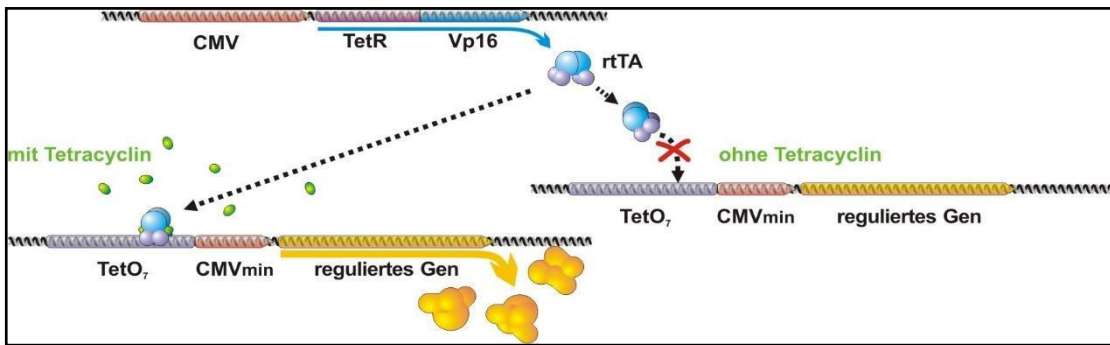


Abbildung 8: Tet-On System schematisch

Quelle: Dissertation Seda Cinar 2006

Weiterentwicklung zum autoregulativen TetOff-System

Der Operator wurde hinsichtlich der Lage der bi-direktionalen tetR-Bindungssequenz gentechnisch durch Strathdee und Mitarbeiter 1999 verändert (Strathdee et al., 1999). Diese Sequenz wurde zwischen dem CMV- und einem Thymidinkinase (TK)-Minimalpromotor eingesetzt. Der starke CMV-Promotor ist verantwortlich für das Zielgen, wohingegen der schwächere TK-Promotor für das Gen des fTA bzw. rtTA zuständig ist, welches hinter diesem inkloniert wurde. Da der Aktivator sich selbst beeinflussen kann, nennt man es auch ein selbstregulierendes System mit einem positiven Rückkopplungsmechanismus.

Material und Methoden

Material

Zellen

Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet. Alle aufgeführten Stämme wurden im Rahmen von Klonierungsarbeiten und Plasmidvermehrung verwendet und zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus bei gleichzeitiger Restriktions- und Rekombinationsnegativität.

- DH5 α Hocheffizienter E.coli, besonders geeignet und hergestellt für rekombinante DNA-Methoden (Hanahan, 1983)
- XL1-blue E. coli, rekombinationsdefizient, Tetrazyklin-resistent (Bullock et al., 1987)
- BJ5183 E.coli, superkompetente Zellen, für homologe Rekombinationen mit linearer dsDNA Fragmenten. Komponente des AdEasy system zur Konstruktion adenoviraler Vektoren
- pUC 19 Künstlich hergestellte bakterielle Plasmide zur Klonierung und Expression von Proteinen im E.coli, high copy number-plasmid

Säugerzelllinien

Die nachfolgenden Zelllinien wurden in den beschriebenen Experimenten und Anzuchten verwendet.

- HEK 293 „Human embryonic kidney“-Zellen, enthalten Virusgenom (E1)
- HT 29 humane adenokarzinomatöse kolorektale Zelllinie (Fogh et al., 1964)
- A431 humane epitheliale Karzinomzelllinie mit hoher EGFR-Dichte
- HCT116 humane kolorektale epithelzellähnliche Tumorzelllinie, Beta-Catenin- und K-Ras-Mutation (aktivierte Ras-Erk-Kaskade) (Brattain et al., 1981; Schroy et al., 1995)
- Colo320 humane adenokarzinomatöse kolorektale Zelllinie mit ungewöhnlichen Zellprodukten (z.B serotonin; norepinephrine; epinephrine; ACTH) (Quinn et al., 1979)
- LoVo humane adenokarzinomatöse kolorektale Zelllinie, aus Lymphknotenmetastase gewonnen, 1971

Adenoviren

Adenovirus Typ 5 humanpathogene Viren aus der Familie Adenoviridae und der Gattung Mastadenovirus, unbehüllte doppelsträngige, lineare DNA-Viren, stabiles ikosaedrisches Kapsid

Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Die Tabelle zeigt Oligonukleotide (Metabion), die sowohl in Sequenzierungen als auch in PCRs verwendet wurden.

Tabelle 1: Primer zur Sequenzierung und PCR

Bezeichnung	Sequenz [5' – 3']	Verwendung
Cet4720R	CTG TGA CAC TCT CCT GGG AG	Sequenzierung
Cet3900R	GGT CTT GTA GTT GTT CTC CG	Sequenzierung
Cet3090R	CTT GGT GGA GGC GCT CGA G	Sequenzierung
CetR1EcoRV	TTC GAT ATC AGA AGC CAT AGA GCC	PCR/Sequenzierung
CetmPmeF	GAG AGT GTT AGG TTC AAA CGT CGA GCA TGC	Sequenzierung
CetF1KpnI	TCA GGT ACC ATA GAG CCC ACC G	Sequenzierung
CetmPmeR	GCA TGC TCG ACG TTT GAA CCT AAC ACT CTC	QC-PCR

Vektoren

Folgende Vektoren wurden bei Klonierungsarbeiten verwendet bzw. als Vergleichskonstrukte herangezogen.

Tabelle 2: Vektoren und Vergleichskonstrukte

542 Ad3r.luc	Startkonstrukt 2009 mit Luciferase, zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Block
pShuttle	Transfervektor zur Herstellung von Adenoviren im AdEasy-System (Luo et al., 2007)
pcDNA 3.1 225huIgG1His IHRES	Klonierungsvektor und Vergleichskonstrukt, von Dr. Ingke Braren zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1 225huIgG1.2A/Fu	Klonierungsvektor A, von Dr. Ingke Braren zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1225huIgG1His/Stop 2A/Fu	Klonierungsvektor B, von Dr. Ingke Braren zur Verfügung gestellt
582	Hergestellter Vektor 542 mit Cetuximab-Insert (542.3r.225huIgG1.2A/Fu), Ausgangskonstrukt für die Arbeit ab 2011 im HPI AG Dobner
pBud225huIgG ₁ His	Vergleichskonstrukt, von Dr. Ingke Braren und Melanie Plum zur Verfügung gestellt

Rekombinante Plasmide

Die Tabelle gibt die in dieser Arbeit verwendeten/hergestellten rekombinanten Plasmide an.

Tabelle 3: Rekombinante Plasmide

542 Ad3r.luc	Startkonstrukt 2009 mit Luciferase, zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Block
pShuttleCetuximab	Ausgehend vom 582, Umklonierung ins pShuttle-System, = Klon 3
Ad5Cetuximab2A	Ad5 mit vollständiger regulierbarer Cetuximab-Kassette und 2A-Peptid

pShuttleCetuximabIRES	Umkloniertes Konstrukt, Cetuximab Kasette mit IRES in pShuttle- Transfervektor, als Vergleichsvektor konstruiert
-----------------------	--

Bacmide

pAdEasy I Adenovirusgenom ohne E1 und E3 Region

Antikörper

Hier werden Antikörper aufgelistet, die für *Western-Blot*-Analysen, Immunfluoreszenzen oder ELISA-Verfahren eingesetzt wurden.

Tabelle 4: Antikörper

B6-8	gegen das E2A-Protein von Adenovirus 5, Maus- IgG-AK monoklonal, 1:10 in TBS-BG
AC – 15	Monoklonaler Maus-AK gegen Beta-Aktin, zur Ladekontrolle der Menge an Zelllysate
Erbitux	EGF-Rezeptor Antikörper
Goat-anti-huIgG-FC-HRP	IgG (Ziege) Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt (Blot)
TetR Antikörper	Monoklonaler Maus Antikörper gegen den Tetrazyklin-Repressor (Blot)
Alexa™ 488 Antikörper	IgG (Ziege), Alexa™ 488-gekoppelt; Antigen: Maus IgG; 1:1000 in TBS-BG, (IF)
Anti-huIgG-AP	1:5000, Alkalische-Phosphatase-gekoppelt (ELISA)
Goat-huIgG-LC-AP	Antikörper gegen IgG light chain (Blot)
Goat-huIgG-HC-HRP	Antikörper gegen IgG heavy chain (Blot)
Bethyl-anti-hu-IgG HRP	Antikörper gegen IgG heavy chain
Anti-human HRP A80 104p	Antikörper zur Darstellung der schweren Kette des IgG

Verbrauchsmaterialien, Reagenzien sowie Enzyme

Alle genannten Chemikalien wurden von Invitrogen, AppliChem, Hartenstein, Biomol, New England Biolabs, Roche, PeqLab, Merck, Roth, Fermentas, Greiner, Stratagene und Sigma eingekauft. Zellkulturmaterial fanden von PAA, Pan oder BD Pharmingen Verwendung und alle anderen Plastikmaterialien wurden von Brand, Biorad, Eppendorf GmbH, Biozym, Nunc, Whatman, Sarstedt und VWR bestellt. Flüssigstickstoff wurde von der Firma Linde bezogen. Die Angaben entsprechen der üblichen Nutzung im jeweiligen Untersuchungslabor.

Größen- und Molekulargewichtsmarker

Die DNA-Molekül-Größen in Agarosegelen wurde mit 1 kb und 100 kb DNA ladder von Gibco BRL bestimmt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus von Fermentas benutzt.

Kommerzielle Systeme

Tabelle 5: Kommerzielle Systeme

PRODUKT	VERWENDUNG	HERSTELLER
Plasmid Mini, Maxi Kit	Isolierung von Plasmid	Qiagen, Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas)
<i>QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis kit</i>	Mutagenese (DNA)	Agilent Technologies (ehemals Stratagen)
Rapid DNA Ligation Kit	Ligation	Roche
Gelextraktionskit	DNA Gelextraktion	Five Prime

Geräte

Tabelle 6: Geräte

GERÄTE	HERSTELLER
Branson Sonifier 450 Sonifikator	Branson
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus Instruments
Centrikon T-1160; Rotor SW40 T1 Ultrazentrifuge	Kontron Instruments
Centrikon T124, Rotor A614 (0,5 l) Zentrifuge	Kontron Instruments
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments
Cryogerät	Zefa Laborservice
Entwicklungs-und Fixierautomat (Blot)	Kodak
Eppendorf 5417R Zentrifuge	Heraeus Instruments
Filmkassette	Rego
Fluoreszenzmikroskop Leica DM RX	Leica
Gel Print 2000i Geldokumentationssystem	MWG Biotech
Gelapparatur (Agarosegele)	H. Hölzel
Inkubationsgerät,- schüttler (Bakterien)	New Brunswick
Invers Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica
Julabo UC Wasserbad	Julabo
MicroPulser™ Elektroporation	BioRad
Mikrowelle Labor	Moulinex
MS1-Minishaker Vortex-Tischgerät	IKA
Multigel und Multigel Long SDS-Gelaparatur	Biometra
Nanodrop 1000	Thermo
Peltier Thermal Cycler PTC-200 PCR-Gerät	MJ Research
pH 530 pH-Meter	WTW
Power Pack 300 als Strom/Spannungsquelle	BioRad
Rotixa/P (15 und 50 ml) Zentrifuge	Hettich
Scanner, scanjet 7400c	Hewlett-Packard
Thermomixer	Eppendorf
Trans-Blot® Electrophoretic Transfere Cell (Blot)	BioRad

Software und Datenbanken

Sequenzvergleiche und –bearbeitung: CLC Workbench, Bioedit 4.8.5

Texte und Tabellen: Microsoft Word 2010, 2013 und Open Office Writer 4.1.7

Literaturrecherche: vorrangig MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) und PubMed-Datenbank, Internet allgemein

Bandenintensitätsquantifizierung in den Agarosegelen: Gene Tools des G-Box Systems (SynGene)

DNA-Vergleich: NCBI Blast

Gel Print 2000i Geldokumentationssystem zur Gelinterpretation

Scribbr und dessen APA-Generator 7.Auflage (Literaturverzeichnis), Plagiatsprüfung

Methoden

Bakterien und DNA

Transformation

Transformation und Vermehrung in chemisch kompetente E.coli

Für die Transformation und spätere Vermehrung der hergestellten Plasmid-Klone wurden kompetente E. coli eingesetzt. Zur Einschleusung von Plasmid-DNA in die Bakterien wurde zu 100 µl Bakteriensuspension 10 µl Plasmid-DNA gegeben, vermischt und anschließend 30 min auf Eis gelagert. Nach einem kurzen Hitzeschock (45s Wasserbad) bei 42°C wurde das Gemisch erneut für 2min auf Eis inkubiert. Dabei scheinen Permeabilitätsstörungen für die Aufnahme der DNA zu sorgen. Nach Zugabe von LB₀-Medium folgte eine 45 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank (schüttelnd). Die Ausplattierung erfolgte anschließend auf Kanamycin-haltigen-LB-Agar-Platten zur Selektion. Nach Lagerung über Nacht bei 37°C konnten Einzelkolonien vom Agar gepickt und nach Inokulation in 5ml Kanamycin-haltigen LB-Mediums bei 200-300rpm geschüttelt bei 37°C über Nacht amplifiziert werden. Die Kulturen wurden am nächsten Tag für Minipräparation verwendet. Es erfolgten Kontrollen der transformierten Plasmide.

LB-Medium:

Bacto Trypton 10 g/l

Bacto Yeast Extract 5 g/l (pH 7,4 mit NaOH eingestellt)

NaCl 5 g/l (autoklaviert)

Elektroporation

1µg der Plasmid-DNA, oder der gesamte Ligationsansatz, wurde zuvor ausgefällt und somit entsalzt. Um die ausgefällte DNA anschließend zu dephosphorylieren wurde diese mit 1/10 Vol. 3M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol vermischt und bei RT 12 min abzentrifugiert (13000 rpm). Anschließend wurde das entstandene Pellet nach einer Waschung mit 75% Ethanol an der Luft getrocknet und dann in einer Mischung aus H₂O, 10x antarktischen Phosphatasepuffer und antarktischer Phosphatase wieder aufgenommen und bei 37°C für 1,5h inkubiert. Die Schritte wurden wiederholt und das Pellet mehrfach mit Ethanol gewaschen. Um das Ergebnis längere Zeit aufzubewahren wurde es nun in sterilem 10mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen. Ein auf Eis aufgetauter 50 µl Ansatz elektrokompetenter Bakterien wurde mit 6 µl DNA-Gemisch (enthält Plasmid und linearisierter Transfervektor) vermischt und wurde zusammen in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) gegeben. Durch den angelegten Strom (Spannung 1,25 kV; Parallelwiderstand 200 Ω; Kapazität 25 µF) in einer Elektroporationsapparatur namens MicroPulserTM wurde die Elektroporation durchgeführt. Danach wurden die Bakterien sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C für 45min im Schüttler inkubiert. Es erfolgte anschließend das Ausplattieren auf antibiotikaversetzten LB-Nährböden. Die entstandenen Einzelkolonien mit den enthaltenen

Rekombinanten konnten am folgenden Tag gepickt und, wie bereits beschrieben, kultiviert, aufgearbeitet und überprüft werden.

DNA-Isolierung

In der Arbeit wurde zur Aufarbeitung kleiner DNA-Mengen ein nach Beck et al. modifiziertes Protokoll durchgeführt (Beck et al., 1993, S. 375).

Dabei wurde ein Teil der ÜK (10 ml) 1min mit 18000 g bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellsediment wurde anschließend in der selbst hergestellten Lösung A (300µl) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Lösung B wurde der Ansatz solange vorsichtiges geschwenkt, bis die Flüssigkeit ein homogenes Bild ergab. Dieser Ansatz wurde anschließend bei RT 5min belassen (Lyse). Die gleiche Menge der letzten Lösung C (300µl) wurde dem Gemisch zugeführt und erneut 5min bei RT inkubiert. Nach anschließender 10min. Abzentrifugation mit 18000 g bei RT wurde der Überstand in Isopropanol (630 µl) übernommen. Die DNA wurde mittels Zentrifugation (10min bei RT, 18000g) ausgefällt. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet musste nun vorsichtig mit Ethanol (75%, 1ml) gewaschen werden. Das Ethanol wurde entfernt und die DNA sollte entweder an der Luft oder mittels Vac getrocknet werden. Die Aufbewahrung erfolgte erneut in 10 mM Tris/HCl (50 µl).

Lösung A: Lagerung bei 4°C

Tris/HCL, pH 8,0	50mM
RNAse A	100µg/ml
EDTA	10mM

Lösung B:

NaOH	200mM
SDS	1% (w/v)

Lösung C: Lagerung bei 4°C

NH ₄ OAc	7,5M
---------------------	------

Kommerzielle Kits wurden für die Gewinnung größerer Mengen DNA oder auch für Sequenzierungen eingesetzt. Für Minipreps wurden dabei etwa 5-10ml und bei Maxipreps 500-1000ml der ÜK verarbeitet. Die aufgearbeitete DNA wurde anschließend in 50-200µl 10mM Tris/HCl zur Lagerung und Weiterverwendung überführt.

Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der DNA-Präparationen nach Ligation und zur Klonierung der Konstrukte wurden zumeist 1-10µg der DNA mittels entsprechender Restriktionsenzyme (3-10 Unit) in dem vorgesehenem Reaktionspuffers für etwa 2h bei 37°C entsprechend den Herstellerangaben verdaut. Units geben dabei die Menge Enzym an, die 1µg des Substrats

in 1h umsetzen kann. Die Enzyme erkennen dabei meist spezifische palindrome Sequenzen einer dsDNA und schneiden diese mittels Hydrolyse. Dabei können stumpfe (blunt) oder klebrige (sticky) Enden entstehen, wobei die sticky ends eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, zu ligieren. Sollten zwei Enzyme verwendet werden, dessen Anforderungen nicht übereinstimmen, wurden die Ansätze einfach nacheinander durchgeführt und die DNA dazwischen nach dem bekannten Schema mit Natriumacetat und Isopropanolol gefällt und mit Ethanol gewaschen sowie erneut in Tris/HCl oder einem Restriktionspuffer bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Ligation

Um entstandene DNA Fragmente nach einem Restriktionsverdau in die passend vorbereiteten Vektoren einzufügen, werden sie unter zu Hilfenahme einer T4-DNA-Ligase (Enzym) miteinander im Verhältnis 3:1 entweder an den blunt oder den sticky ends verknüpft. Dabei werden die 5'- Enden des einen mit den 3'- OH-Enden des anderen mit einer Phosphorsäurediesterbindung kovalent verbunden. In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles Kit von Roche verwendet und nach Herstellerangaben benutzt, wobei das Volumen meist 20µl betrug.

PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) dient der Vermehrung und Reproduktion von kleinen Mengen DNA in vitro. Entwickelt wurde diese Methode durch den Biochemiker Kary Mullis 1983. Die PCR besteht in dieser Arbeit aus etwa 20-35 Zyklen, wobei jeder Zyklus in drei Schritte unterteilt werden kann. Zunächst werden in der Denaturierungsphase die Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C voneinander getrennt, in dem die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. Im ersten Zyklus findet dabei eine längere Erhitzung statt, die Initialisierung, um sicher zu gehen, dass alle Doppelstränge auch wirklich getrennt wurden. Im nächsten Reaktionsschritt findet die Primerhybridisierung statt (Annealing). Dabei wird die Temperatur für kurze Zeit derart erniedrigt, dass sich die Primer an die richtigen Stellen der Ausgangs-DNA anlagern können. Durch die Zugabe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z.B.: Taq, Pfu) und der Bausteine zum Bau der DNA (freie Nukleotide) kann die Herstellung der zu vervielfältigenden DNA beginnen. (Elongation, Polymerisation) („Polymerase-Kettenreaktion (Stand 19.12.2019)“, 2001). Für PCRs wurden zumeist 2-50 pg Plasmid-DNA oder, je nach Konzentration, 1- 2 µl des cDNA-Probe mit 5 µl Reaktionspuffer (10x), 2 µl dNTP-Mix (2 mM) und jeweils 5µl der Primer vermischt, mit ddH₂O aufgefüllt und mit 0,2 µl der gewünschten Polymerase vervollständigt. Anschließend erfolgte das laborinterne Standard-Programm:

Standard Ansatz für die PCR:

H ₂ O _{bid.} ,	steril	31,8µl
DNA-Probe	<0,25µg/µl	1µl
10x PCR- Puffer		5µl

dNTP-Mix	2mM	2µl
(= dATP, dGTP, dTTP und dCTP)		
Oligonukleotid 1	10µM	5µl
Oligonukleotid 2	10µM	5µl
PFU-Ultra-2-DNA-Polymerase	5U/µl	0,2µl

PCR-Standard Protokoll:

90s	95°C	Initialisierung	
30s	95°C	Denaturierung	
30s	T _M -5°C ¹	Hybridisierung	20-35 Zyklen
60s/kb ²	72°C	Polymerisation	
420s	72°C	Polymerisation	
-	4°C	Lagerung	

¹Schmelztemp. (T_M) der Oligonukleotide -5°C wurde als Hybridisierungstemp. verwendet

²DNA-Syntheserate der PFU-Ultra-2-DNA-Polymerase bei 68-72°C

Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Sichtbarmachung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente wurde die Gel-Elektrophorese verwendet. Das Prinzip ähnelt einem Sieb, bei dem größere Moleküle eher zurückgehalten werden als die Kleineren. Die negativ geladenen DNA-Teilchen ziehen unter Anlegung eines elektrischen Feldes Richtung Pluspol und können durch die Zugabe eines farbigen Probenpuffers sichtbar gemacht werden. Durch einen Vergleichsmarker als Standard (1kb oder 100bp ladder) können die Fragmentgrößen recht genau bestimmt werden („Agarose-Gelelektrophorese (Stand 22.01.2020)“, 2003). Das Agarosegel wurde mit 1xTBE Puffer und 0,6-1%iger Agaroselösung in der Mikrowelle aufgekocht und Ethidiumbromid hinzugegeben, wodurch die Banden später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Es wurde 1/6Vol. 6xAuftragspuffer der DNA Probe zugeführt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrische Spannung lag dabei etwa um 5-10V/cm Gellänge.

Bei Gelen ausschließlich zu Analyse Zwecken wurden diese bei 312nm Wellenlänge (UV-Durchlichtschirm) mit Hilfe des im Labor vorhandenen Geldokumentationssystems Gel Print 2000i ausgewertet. Um die einzelnen Fragmente weiterzuverarbeiten musste bei präparativen Gelen langwelligeres Licht (365nm) verwendet werden und ggf Guanosin bei Bacmidbearbeitung (1mM) zugesetzt werden, um die DNA nicht zu schädigen. Die gewünschten Banden wurden mittels Skalpell aus dem Agar-Gel geschnitten und danach weiterverwendet.

5xTBE:

Tris	42,5 mM
EDTA	2,35mM
Borsäure	445 mM

6x DNA-Auftragspuffer:

Glyzerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
5xTBE	20% (v/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)

Gelextraktion aus Agarosegelen

Wie bereits beschrieben, wurde unter Schonung der DNA unter langwelligem Licht (365nm) die gewünschten Banden mittels Skalpells aus dem Gel herausgetrennt und unter Verwendung eines kommerziellen Gelextraktions-Kits entsprechend den Herstellerangaben DNA extrahiert.

Lagerung von *E.coli*-Klonen

Zur längeren Lagerung (>1 Monat) mussten die Klone von den Agarplatten kultiviert, davon 2ml zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands im Kryoröhrchen mit sterilem Glyzerin vermicht werden. Nach langsamer Abkühlung erfolgt die Lagerung bei -80°C.

Auf den Agarplatten sind die Klone unter Verschluss mit Parafilm und bei 4°C bis zu einen Monat verwendbar.

DNA-Konzentrationsmessung (Nanodrop)

Bei den hergestellten DNA-Lösungen konnten mittels Photometer (250-290nm) anhand der optischen Dichte am Absorptionsmaximum (OD₂₆₀) die Konzentration der enthaltenen DNA durch das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt werden. Eine reine Konzentration ergibt sich aus dem Absorptions-Quotienten aus 260nm und 280nm und liegt optimaler Weise bei 1,8. Bei Verunreinigung mit Proteinen zeigt sich eine vermehrte Absorption bei 280nm.

Sequenzierung

Die Firma Geneart, Biopark Regensburg führte Teile der Sequenzierung durch. Bei einem Volumen von 8µl enthielten die Ansätze etwa 200-500ng DNA und 6pmol eines spezifischen Oligonukleotids.

Die Sequenzierungen des Arbeitskreises der Biochemie wurden nach entsprechender Vorbereitung und Hinzugabe der entsprechenden farblich markierten ddNTPs und Reagenzien durch den Arbeitskreis Richter am UKE (Hamburg) Es wird das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Version 1.1 (AppliedBiosystems) und der 3100 Genetic Analyzer dazu verwendet. Die Ansätze hatten hierbei ein Gesamtvolumen von 10µl und enthielten ebenfalls 200-500 ng DNA, 2µl big-dye-reaction-buffer (2,5x) und 2µl big dye PCR-Reaktionsmix, indem dNTPs, ddNTPs und Magnesium bereits enthalten waren. Zuletzt erfolgten die Hinzugabe des entsprechenden Oligonukleotids (15pmol) und das Auffüllen mit ddH₂O.

Zellkultur und Generierung von Adenoviren

Da es sich in der Arbeit um die Verwendung von humanpathogenen Adenoviren handelt und es theoretisch möglich ist, dass sich replikationsfähige Adenoviren bilden konnten, wurde die Herstellung des Virus unter S2-Bedingungen durchgeführt.

Außerdem wurde auf eine strenge Einhaltung der sterilen Arbeitsumgebung geachtet. Die vorrangig verwendete Zelllinie HEK 293 leiten sich von einem menschlichen embryonalen Nierenzelltumor ab. Das Besondere an ihr ist, die enthaltene E1 Region und, dass sie 11% des Ad5 Genoms stabil transfiziert. Die Vorgaben sind daher ideal, um eine Generierung und Vermehrung der Adenoviren (E1 und E3 defizient) mit dieser Zelllinie durchzuführen.

Die bereits genannten humanen kolorektalen Tumorzelllinien wurden zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und AK-Produktion im späteren Verlauf verwendet.

Die Vermehrung der Zellen fand nach vorheriger Kultivierung in 154mm Petrischalen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 96% im Brutschrank statt.

Splitten von Zellen

Bei einer fast vollständigen Konfluenz von 90-95% (Petrischale) wurden die adhärent wachsenden HEK 293 nach vorherigem Verwerfen des alten Mediums mit PBS (5ml) gewaschen. Anschließend wurde nach Absaugung des PBS Trypsin-EDTA (5ml) vorsichtig zum Lösen der Zellen von der Petrischale auf die Zellen getropft. Nach 5minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen weiterhin sanft von der Platte abgespült und dann in einem entsprechend großen Gefäß (50ml Falcon) aufgefangen. Um das Trypsin-EDTA wieder sicher zu entfernen, wurde das Falcon-Tube bei 4°C und 2500rpm für 10min. zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Da die Zellen meist im Verhältnis 1:5 gesplittet wurden, wurden entsprechend viele Petrischalen mit je 20ml Vollmedium ((DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin)

vorbereitet. Das resuspendierte Pellet (5ml Komplettmedium) konnte anschließend auf die Petrischalen aufgeteilt werden.

Lagerung und Kryokonservierung von Säugerzellen

Sollten HEK-293 Zellen oder andere Säugerzellen längere Zeit gelagert werden, wurde entsprechend des Splittens verfahren und das Pellet diesmal nur mit 1ml FKS/DMSO 10% wieder aufgenommen und in dafür vorgesehene CryoTubes™ langsam mit „Mr Frosty“ bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Sollten die Zellen weiterverwendet werden, wurden sie, ebenfalls ähnlich dem Splittingvorgang, nach dem schnellen Auftauen in Komplettmedium erneut ausgesät. Um die zelltoxischen Komponenten des verwendeten Dimethylsulfoxid zu eliminieren, wurde am nächsten Tag nach nächtlicher Inkubation ein Mediumwechsel vorgenommen.

Vitalitätsprüfung durch Trypanblau und Zellzählung

Lebende Zellen konnten unter zu Hilfenahme des Trypanblau-Ausschlusstests einfach von abgestorbenen unterschieden werden, da sich lediglich tote Zellen dunkelblau färben und nicht mehr in der Lage sind, den Farbstoff wieder auszuschleusen. So ist auch eine Aussage über die gesamte Zellzahl möglich.

Dafür wurden die Zellen zunächst trypsiniert und nach Resuspension mit Trypanblau (1:5) 5min. inkubiert, um sie dann mit Hilfe einer sog. Neubauer-Zählkammer (4 Quadrate, jeweils 16 Unterteilungen) unter einem inversen Lichtmikroskop auszuzählen. Die Formel zur Berechnung lautet: Zellzahl/ml Zellsuspension = gezählte Zellen x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴. Um eine genauere Bestimmung der Zellzahl durchzuführen, wurden immer die lebenden Zellen in zwei Quadraten ausgezählt und berechnet.

Trypanblaulösung:

Trypanblau	0,15% (w/v)
NaCl	0,85% (w/v)

Transfektion

Polyethylenimin (PEI-) Methode

Die Methode ist eine kostengünstige und recht effiziente Alternative DNA in tierische bzw auch andere eukaryote Zellen einzubringen („Transfektion (Stand 23.01.2020)“, 2004). Dabei wird genutzt, dass das mehrfach positiv geladene PEI (Polyethylenimin) Komplexe mit der mehrfach negativ geladenen DNA eingeht, die dann mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, wobei einige der Komplexe auch in den Zellkern gelangen, um dort freigesetzt, gelesen und im besten Fall synthetisiert zu werden.

Die hier verwendeten Säugerzellen (z.B.: HEK 293) wurden zunächst nach den oben genannten Verfahren entweder in 6-well-Schalen oder in größeren Petrischalen (100mm)

kultiviert. Nach 24h wurde die DNA im Verhältnis 1:10 mit PEI gemischt und in purem OptiMEM (0,5ml) aufgenommen. Das Gemisch wurde unter mehrfachem Mischen mittels vortexen und 20minütiger Ruhephase im Raum als fertiges Transfektionsgemisch zu den zuvor vorbereiteten Zellen gegeben. Diese erhielten zeitnah vor der Transfektion einen Mediumwechsel auf DMEM/ 5% FKS ohne antibiotische Zusätze. Das Medium wurde anschließend 6-8h nach erfolgter Transfektion erneut auf ein Vollmedium gewechselt, welches u.U. mit Doxycyclin angereichert wurde. Nach einer Wartezeit von 24-72h nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet werden. Das Polyethylenimin war sterilfiltriert und mit einem neutralen pH von 7,2 bei -80°C kryokonserviert bei -80°C bis zu 6 Monate verwendbar.

Lipofektion

Um E1 deletierte Ad5 herzustellen, wurde mittels Pac I- Restriktionsverdau das lineare Virusgenom aus dem Bacmid geschnitten und durch Transfektion mit HEK 293, welche die E1 Region zum Virus beisteuern, zusammengesetzt.

Die Liposomenmethode beruht auf der Bildung kleiner Vesikel, die die DNA umhüllen, die letztlich ebenfalls per Endozytose ins Innere der Zelle gelangen. Hierbei wurden die Zellen erneut, wie schon zuvor dargelegt, in 6-well-Schalen so kultiviert, dass sie eine 90%ige Zelldichte nach 24h zeigten. Die Transfektion mit Lipofectamin 2000 erfolgte etwa 20min nach vorherigem Mediumwechsel auf DMEM/FKS (2ml) streng nach den Herstellerangaben.

Reinfektion und Vermehrung des Virusstocks

Um den nun hergestellten Virus zu vermehren und neue Infektionen durchzuführen, wurde die Kultivierung der im letzten Abschnitt hergestellten Transfektionen für insgesamt 5 Tage fortgeführt.

Um zellassoziierte Adenoviren zu gewinnen, wurden die transfizierten und inkubierten 293-Zellen mittels Zellschaber vorsichtig vom Schalenboden gelöst und bei 750 g 5min zentrifugiert, um anschließend das entstandene Pellet mit PBS (5ml) zu säubern und danach in DMEM (5ml) zu resuspendieren. Durch den dreimaligen freeze/thaw Zyklus im Wasserbad bei 37°C und flüssigem Stickstoff wurden die Zellen aufgeschlossen und die Viren freigesetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 10min bei 3500rpm konnten mit dem dadurch gereinigten Virusüberstand neue Zellinfektionen in kleineren Zellkulturschalen (100mm) stattfinden. Dies wurde bis zum Auftreten des „zytopathischen Effekts“, also dem Verhalten bei fast vollständiger Infektion der Zellen etwa 2 bis 5 Mal durchgeführt. Dabei sieht man zügig das Auftreten von fast vollständig „schwimmenden“ abgerundeten und gelösten Zellen in der Kulturschale. Diesen hochinfizierten Überstand konnte man nun zur Infektion größerer Petrischalen (150mm) verwenden und nach oben beschriebener Weise vermehren. Zur Lagerung eines Stocks wurde der Virus-Überstand mit 87% Glycerin (c =10%, steril) versetzt in kleinere Mengen aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

Titerbestimmung mittels Fluoreszenztest

Um die Virustiterbestimmung durchzuführen, wurden die HEK-Zellen als erstes in einer 6-well-Schale ausgesät ($3-4 \times 10^5$ Zellen) und 24h danach nach Absaugen des Mediums und PBS-Waschung mit 1ml des verdünnten Virus-Überstands (Stocklösung in DMEM_{pur} 10^3-10^6) infiziert. Unter 15minütigen Schwenkens wurden die Infektionen bei 37°C für 2h im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurde ein Mediumwechsel auf Vollmedium (3ml/well) und die Inkubation bei 37°C durchgeführt. Zur Fixierung erfolgte nach 24h das Absaugen des Vollmediums, eine Waschung mit PBS und die Zugabe von 1ml/well eiskaltem Methanol für insgesamt 15min im Gefrierschrank bei -20°C. Die Schale durfte nun bei RT nach Absaugung des Methanols lufttrocknen.

Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen. Dabei wurde zunächst mit TBS-BG (2ml/well) 1h blockiert, dann mit einer B6-8 AK-Verdünnung (1ml/well) im Verhältnis 1:10 TBS-BG für 2h bei Raumtemperatur inkubiert, dann erfolgte eine dreimalige und jeweils 5minütige Waschung mit TBS-BG (2ml/well), um nun den 2. AK AlexaTM488 Anti-Maus (1ml/well) ebenfalls als Verdünnung im Verhältnis 1:1000 TBS-BG im Dunkeln bzw. lichtgeschützt 2h bei RT zu belassen. Danach wurde wiederum nach vorheriger Abnahme des Sekundärantikörpers die wiederholte dreimalige Waschung mit TBS-BG durchgeführt und im letzten Schritt 1ml TBS-BG in jedes well zugegeben.

Das Verfahren beruht auf fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die sich gegen das adenovirale E2A Protein richten und so vorhandene Viren bzw infizierte Zellen sichtbar machen, so dass nun mittels Immunfluoreszenzmikroskop die Virenzahl ganz einfach ermittelt werden konnte. So konnte mit Hilfe der gezählten infizierten Partikel/Gesichtsfeld auf die Anzahl infizierter Zellen/ml zurückgerechnet werden. Die Zellzahl und die Verdünnungsstufe mussten jedoch bekannt sein. Die Verwendung der AK und deren Inkubationszeit konnte jeweils auch bei einer Lagerung von 4°C über Nacht erfolgen.

TBS-BG:

BSA	5 mg/ml
Glyzin	5 mg/ml
HCl	3 mM
MgCl ₂	1,5 mM
NaCl	137 mM
Natriumazid	0,05 %
Tris/HCl pH 7,6	20 mM
Tween 20	0,05 %

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Diese von Laemmli entwickelte diskontinuierliche Gelelektrophorese ist dazu geeignet, Proteine zwischen 5-250 kDa zu trennen („SDS-PAGE (Stand 24.01.2020)“, 2004). Durch die Behandlung mit dem anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) handelt es sich dabei um ein denaturierendes Verfahren. Dabei lagert sich das ubiquitär enthaltene SDS an die Proteine an, deren Sekundär- und Tertiärstruktur wird aufgehoben und es vereinheitlicht die Ladung des Proteins ins Negative (Holschbach, 2013, Stand 24.01.2020). Die Auftrennung der Proteine erfolgt daher nur durch deren Masse. Dabei werden, ähnlich einem Sieb, große Proteine, im Vergleich zu Kleineren, früher gestoppt. Die Gelherstellung erfolgt in mehreren Schritten, da zunächst das Trenngel (höherprozentig 8-15% Polyacrylamid) und erst anschließend das Sammelgel (5% Polyacrylamid) vorbereitet werden kann. Die Proteine wandern hierbei zunächst in ein Sammelgel (neutraler pH-Wert), in dem sie konzentriert werden und gehen dann in das Trenngel (basischer pH-Wert) über, wobei erst hier die Auftrennung erfolgt. Durch den Stapelungseffekt zwischen den Gelen werden die Banden hinterher schärfer dargestellt („SDS-PAGE (Stand 24.01.2020)“, 2004). Zur Probenvorbereitung erfolgte zunächst ein Aufkochen für 3-5min, wobei die Ansätze zuvor 1:1 mit einem 2xSDS-Probenpuffer vermischt wurden. Die Gele wurden, wie vom Hersteller angegeben, in die spezielle Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TGS (Laufpuffer) überschichtet. Zum Vergleich der Größen wurde neben den eigentlichen Proben ein Protein-Standard (3µl) aufgetragen und im elektrischen Feld (20-30mA) aufgetrennt, bis das Gelende erreicht war. Die Auswertung der Proteinauftrennung erfolgte danach mittels Western Blot.

	Trenngele pH 8,8				Sammelgel pH 6,8
SDS-Gel	8%	10%	12%	15%	5%
<i>Trennbereich</i>	<i>>75kDa</i>	<i>75-35kDa</i>	<i>35-15kDa</i>	<i><15kDa</i>	
<u>pro Gel enthalten:</u>					
Bis-/Acrylamid (v/v)	27%	34%	41%	51%	17%
SDS (w/v)	je 0,1% bei allen				
Tris/HCl	250mM pH 8,8				120mM pH 6,8
APS ¹ 10% (v/v)	je 1% bei allen				
TEMED ¹ (v/v)	0,06%	0,04%	0,04%	0,04%	0,1%

¹Start der Polymerisation durch APS (Ammoniumperoxydisulfat) und TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin)

2xSDS-Probenpuffer:

Glyzerin	20% (v/v)
SDS	4% (w/v)
DTT	200mM
Tris/HCl pH 6,8	100mM
Bromphenolblau	0,2% (w/v)

TGS:

Glyzin	200mM
Tris	25mM
SDS	0,1% (w/v)

Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen zum Beispiel in einem Zelllysate (Holschbach, 2013, Stand 24.01.2020). Dafür mussten zunächst die 293- Zellen nach Transfektion pelletiert und anschließend in einem Lysepuffer (150µl) bestehend aus RIPA, RIPA Light oder NP40 resuspendiert werden. Dieser Ansatz wurde dann mittels Vortex gut vermischt und kurz auf Stufe 8 (80%) sonifiziert (30s). Nach 4°C Zentrifugation der Probe wurde der entstandene Überstand in ein neues Röhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration aus einer 1:10 Verdünnung mit PBS nach der Bradford-Methode. Nun konnte ein entsprechendes Gel vorbereitet werden, um die zuvor bei 95°C (3min) denaturierte Probe aufzutragen. In einem ersten Vorgehen werden die Proteine entsprechend ihres Gewichts elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine feste Trägermembran (z.B. Nitrozellulose) übertragen (Holschbach, 2013, Stand 24.01.2020). Dies geschieht in Towbin-Puffer unter Verwendung einer speziellen Elektrophoresekammer, der Trans-Blot® Elektrophoretic Transfer Cell bei 400mA je nach Anforderung des Proteins 30-150min. Die Proteinbanden laufen aufgrund der Spannung, die senkrecht zur Laufrichtung des Gels angelegt ist, aus dem Gel heraus und werden von der Membran mit gleichem Muster aufgenommen und dort gebunden. Zum Sichtbarmachen der Banden nach dem Blotting wurde Ponceau S benutzt, um die Banden reversibel anzufärben. Nach einer Waschung mit doppelt destilliertem Wasser, konnte der Farbstoff wieder entfernt werden (Holschbach, 2013, Stand 24.01.2020). Um eventuell freie Bindungen zu blockieren, wurde die Membran bei Raumtemperatur, vor der Verwendung eines geeigneten AK, etwa 1h mit PBS/Magermilchpulver 5% inkubiert. Möglich war hierbei auch eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Nun erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers bei normaler Raumtemperatur, in dem die Nitrozellulosemembran 1h in einer Lösung (verschiedene Konzentrationen des AK mit PBS-Tween sowohl mit/ohne Milchpulver) belassen wurde. Es schloss sich eine

dreimalige Waschung mit PBS-Tween für jeweils 5min. an, die im weiteren Verlauf noch öfter wiederholt wurde. Es erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der HRP-gekoppelt und 1:10000 verdünnt war, für eine weitere Stunde auf dem Schüttler. Ein erneuter Waschzyklus folgte.

HRP vermittelt erfolgte die Farbreaktion zum Nachweis eines spezifischen Proteins durch die Zugabe von einem chemilumineszenten Substrat namens SuperSignal®West Pico Chemilumineszent Substrate von Pierce. Durch die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazid Luminol durch die antikörpergekoppelte Peroxidase wird bei 428nm eine maximale Lichtemission erreicht. Um eine weitere erhöhte Intensität um das 1000fache sowie eine längere Dauer der Lichtemission zu erreichen, wurde zusätzlich Phenol hinzugegeben, so dass ein Maximum 5-20min nach Beginn der Reaktion zu erwarten ist. Dafür wurden die beiden Detektionspuffer zu gleichen Mengen 1:1 vermischt und für 5min auf der Membran belassen, bevor dieser in Folie geschlagen und mittels Röntgenfilm eine Signaldetektion (10s bis 20min Exposition) stattfand (Autoradiographie). Die Entwicklung des Films erfolgte mittels eines speziellen Geräts zur Entwicklung sowie Fixierung von Kodak.

PBS Tween:

Tween 20	0,1% (v/v)
- in PBS	200mM

Towbin-Puffer:

Glyzin	200mM
Tris/HCl pH 8,3	25mM
Methanol	20% (v/v)
SDS	0,05% (w/v)

Ponceau S:

Trichloressigsäure	3% (w/v)
Sulfosalicylsäure	3% (w/v)
Ponceau S	0,2% (w/v)

Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Methode beruht auf einer photometrischen Messung zur rein quantitativen Messung von Proteinen („Bradford-Test (Stand 23.01.2020)“, 2005). Um die Konzentration von Proteinen zu bestimmen, wurden kleine Mengen eines Zelllysats auf 800µl mit PBS aufgefüllt und in Küvetten aus Polystyrol übernommen. Um die Absorption bei 595nm nach 15minütiger Inkubation (RT) zu messen, musste zuvor 200µl einer Färbesubstanz hinzugefügt werden, wobei die Messung durch Proteinbindung verstärkt wird, was

wiederum proportional zur Konzentration der Proteine ist. Es erfolgte die jeweilige Messung gegen Null, wozu ein Ansatz ohne Protein gemessen wurde. Der Vergleich mit Rinderserumalbumin in verschiedenen Konzentrationen (1-10µg BSA) in einer Eichkurve gibt dann Aufschluss über die Proteinkonzentrationen der Probe selbst.

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

Zur Überprüfung der Expression oder der Funktionalität von den hergestellten Antikörper-Konstrukten wurde der ELISA verwendet. Dies ist ein Verfahren, in dem Antikörper- oder auch Antigenkonzentrationen gemessen werden. Dazu waren im Groben zwei Schritte notwendig: im ersten Schritt erkennt der erste AK das Antigen und im zweiten Schritt wird der erste AK von einem markierten zweiten Antikörper erkannt, wobei der Vorteil dabei liegt, dass es durch die Bindung mehrerer sekundärer AK zu einer Signalverstärkung kommt (Kramer, 2013, Stand 24.01.2020). Zum Binden des Antigens an eine Mikrotiterplatte wurden diese bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils dreimal sowohl mit gekühltem TPBS als auch danach mit ebenfalls gekühltem PBS gewaschen. Das im nächsten Schritt folgende Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte für 1h mit DMEM/FKS 10% bei Raumtemperatur. Nach nochmaliger Waschung, wie zuvor beschrieben, wurden dann entweder Zellüberstände (100µl) oder auch Antikörperlösungen in verdünnter Form hinzugegeben und je nachdem, ob es sich um eher konzentrierte Lösungen oder Zellüberstände handelte, wurde die Platte auf dem Schüttler bei Raumtemperatur 1-5h belassen. Nach nochmaligem Waschzyklus wurde nun für 1h (RT) der in DMEM/FKS 10% gelöste AP-konjugierte-AK (sekundärer AK) mit einem Gesamtvolumen von je 100µl/well hinzugefügt. Letztlich erfolgte, nach nochmaligem Waschen nach bekanntem Schema, die Detektion mittels Detektionspuffer (75µl), der mit AP und 5mg/ml PNPP versetzt ist, bis zur sichtbaren Gelbfärbung der Proben. Anschließend erfolgte die Vermessung bei 405nm.

Ergebnisse

Klonierung des Transfervektors 542.3r.225huIgG₁2A/Fu

Zur Herstellung des Transfervektors wurde initial der in der Arbeitsgruppe vorhandene Vektor 542pAd.3r.luc als Ausgangsvektor in puc19-Zellen transformiert und vermehrt sowie anschließend mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit entsprechend Anleitung des Herstellers isoliert. Als Insert wurde je ein Teil der freundlicherweise vom Fachbereich II Biochemie der Universität Hamburg AG Dr. Spillner bereitgestellten Vektoren pcDNA3.1.225huIgG₁2A/Fu (Vektor A) sowie dem gleichen Konstrukt als His/Stop Variante (Vektor B) und pcDNA3.1.225huIgG₁.IRES verwendet.

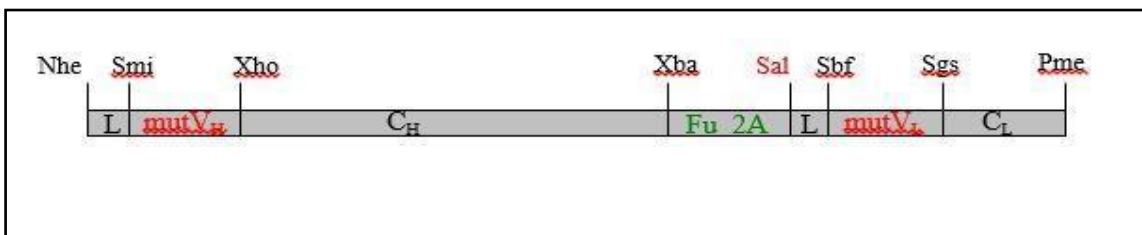


Abbildung 9: Vektor A mit mutierter variabler leichter und schwerer Kette; IgG1 ohne His/Stop mit Fu/2A entnommen

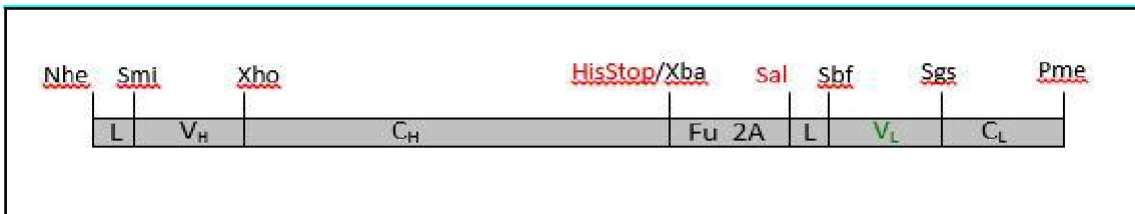


Abbildung 10: Vektor B mit His/Stop variable leichte Kette ohne Mutation (vL) entnommen

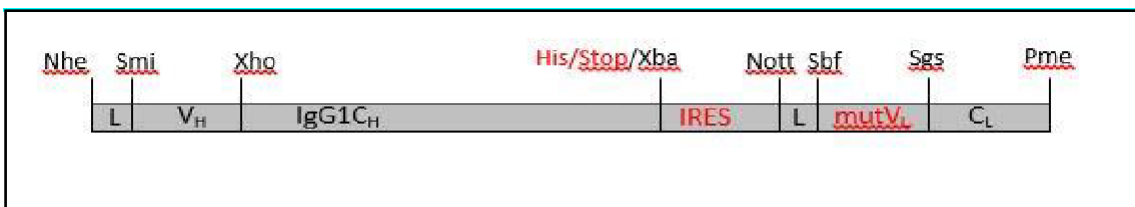


Abbildung 11: Ursprünglicher Klonierungsvektor mit IRES und mutierter variabler leichter Kette

Dabei wurde in einem ersten Schritt die Luciferase aus dem 542pAd.3r.luc mittels entsprechender Restriktionsendonukleasen (Nhe I/ Xho I) ausgeschnitten und die zunächst sichtbare Linearisierung des Vektors zur Überprüfung auf ein Gel aufgetragen (Bild nicht gezeigt)

Es erfolgte die Dephosphorylierung mit Fast AP und Gelextraktion nach Angaben des Herstellers.

Die insertgebenden Vektoren wurden so umklont, dass zunächst die variable leichte Kette ohne Mutation (vL) aus Vektor B und IgG1 ohne His/Stop mit Fu/2A aus Vektor A entnommen und in den pcDNA3.1.225huIgG₁.IRES umklont wurden. Es entstand daraus der endgültige insertgebende Vektor pcDNA3.1 225huIgG1.2A/Fu ohne mutierte vL bzw. vH mit Furinschnittstelle und 2A-Peptid. Nach gleicher Weise wurde nun der insertgebende Vektor verdaut, um das Insert mit Nhe I/Sal I in den 542 einzusetzen. Es folgte die Ligation von Vektor 542pAd.3r und dem Insert 225huIgG₁His2A/Fu im Verhältnis 1:5 entsprechend des aus dem Agarosegel geschätztem DNA-Gehalts und anschließende Transformation des Ligaseansatzes in XL1Blue, die über Nacht auf Ampicillinresistenz-Agarplatten bei 37°C ausgestrichen wurden. Es entstand der Vektor 542.3r.225huIgG1.2A/Fu, der für die weitere Arbeit im HPI als 582 bezeichnet wurde.

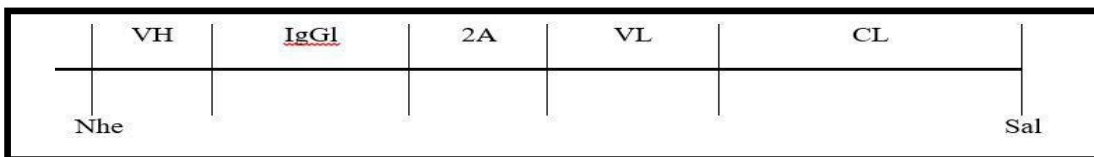


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Inserts

Es erfolgte die Überprüfung verschiedener Klone (3-5 und 1-3 jeweils 5 Kolonien gepickt) mittels PCR der Zellsuspension und Darstellung auf Agarosegel sowie die DNA-Isolierung nach Herstellerangaben (Fermentas) der Übernachtskulturen.

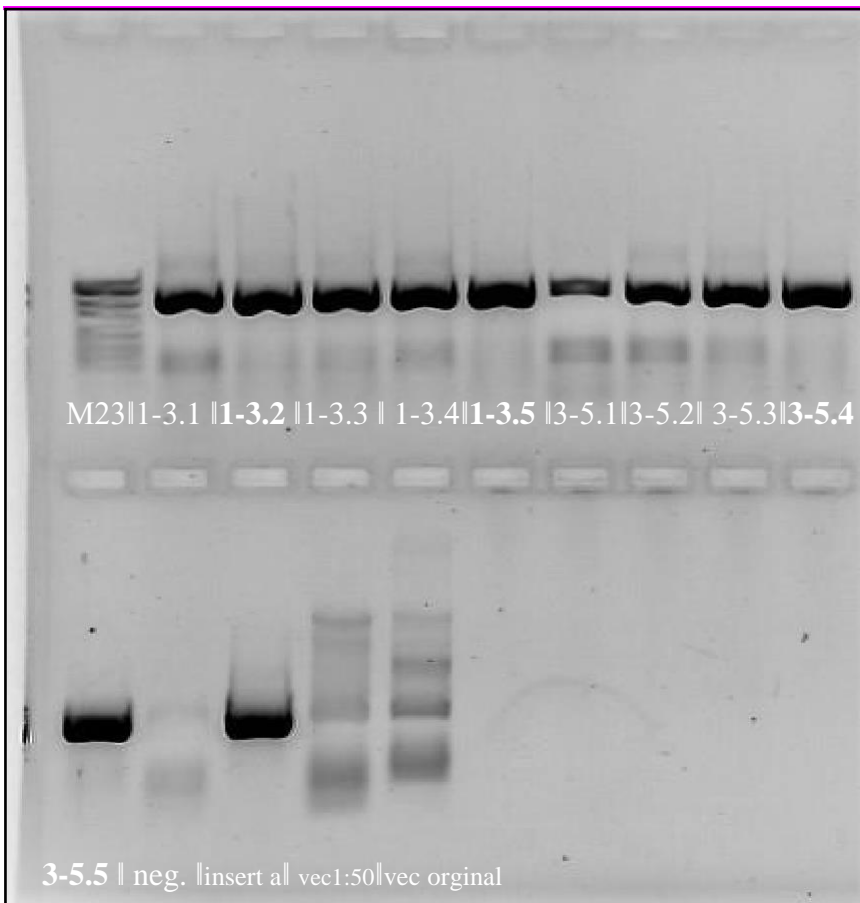


Abbildung 13: Kolonie PCR 542/3-5 und 1-3

Anschließend erfolgte die Sequenzierung von den optisch aus dem Gelansatz vielversprechendsten Konstrukten 542/3-5.4 und 542/1-3.2.

Parallel wurde zur Überprüfung der Funktion der 225huIgG1- Kasette die Transfektion in 293-Zellen durchgeführt. Die Überstände wurden mittels ELISA überprüft und zeigten die Expression des Konstrukts deutlich im Vergleich zum Ausgangsvektor pcDNA3.1 . Es ist jedoch eine vergleichsweise bessere Expression des 542/3-5.4 zu erkennen. Dieser Klon wurde daher für die weitere Arbeit verwendet.

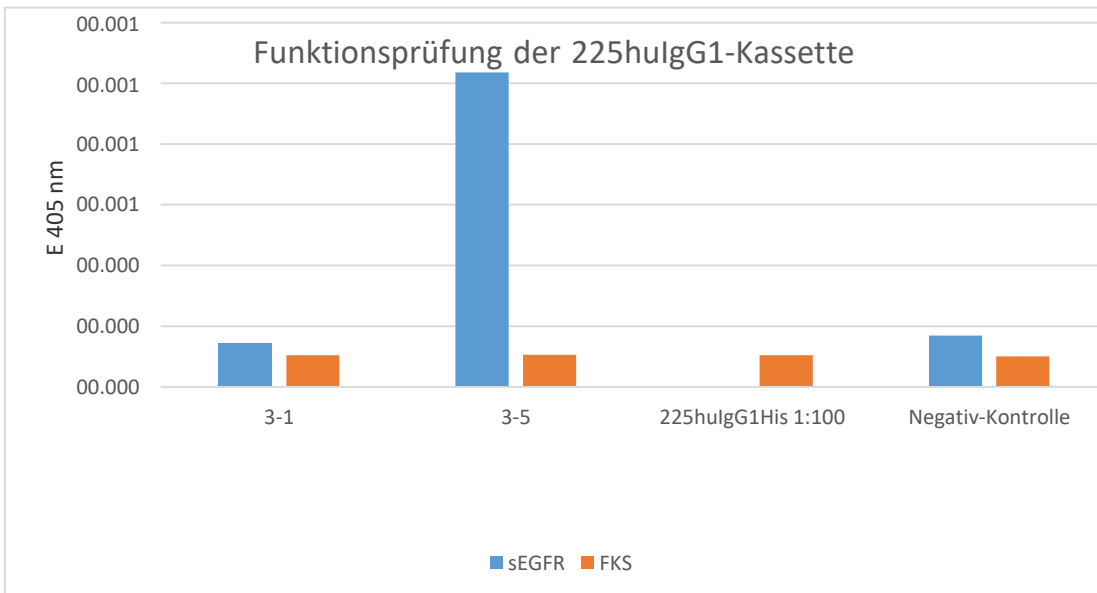


Abbildung 14: Funktionsnachweis mittels ELISA von Klon 3-5

Der hier hergestellte Antikörper sollte als bicistronisches Konstrukt aufgebaut sein, wobei die leichte und schwere Kette durch ein 2A-Peptid verbunden sind (Fang et al., 2005, S. 584). Das 2A-Peptid stammt aus dem Maul- und Klauenseuche-Virus und versetzt das Ribosom in die Lage, zwei Gene zu translatieren. Der Prozess wird als „ribosomal skip“ bezeichnet. Außerdem bestand, aufgrund der nun zusätzlichen Aminosäuren durch das 2A-Peptid am Fc-Teil, eine Furin-Schnittstelle (Fang et al., 2005, S. 584). Dieses Konstrukt sollte zur Herstellung eines E1/E3-defizienter adenoviralen Vektors durch homologe Rekombination nach Bett et al. mittels pBHG10 in 293-Zellen führen.

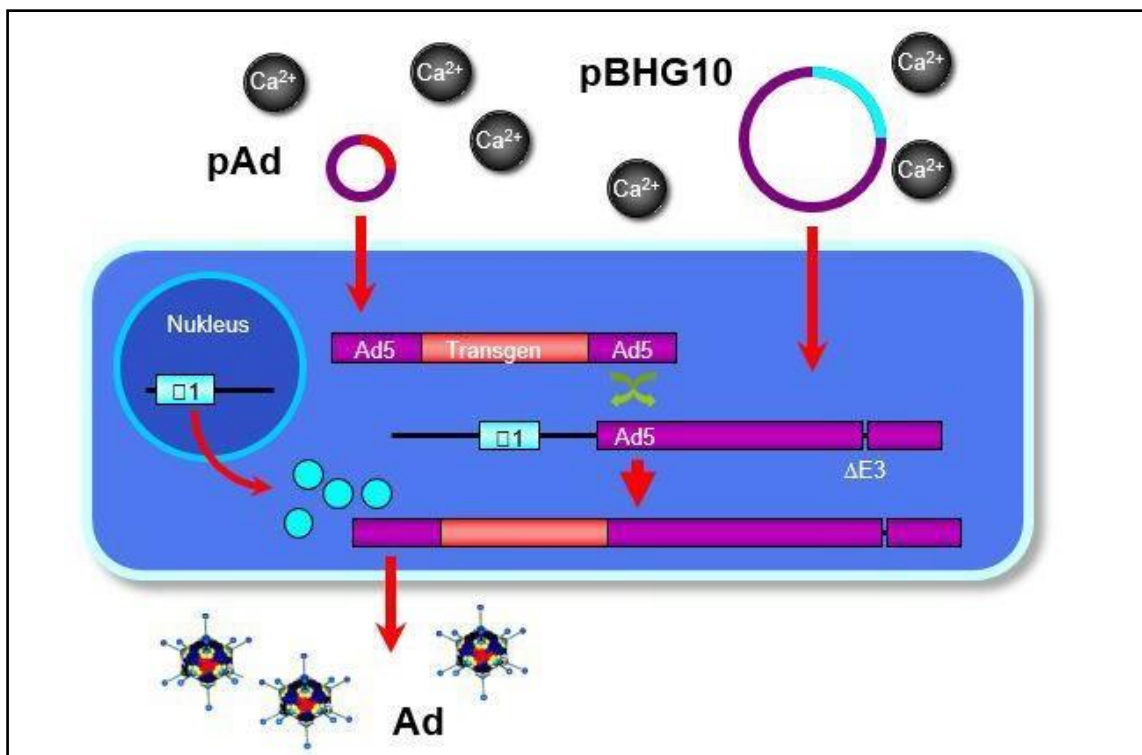


Abbildung 15: Cotransfektion in pBHG10 schematisch, Quelle: Retreat 2009 A.Block/S.Seeger

Nach Fertigstellung des Transfervektors zeigte sich jedoch ein durchaus vielversprechender, aber für die Arbeitsgruppe neuer Ansatz mittels AdEasy-Systems zur Herstellung adenoviraler Vektoren nach Luo et al. von 2007 einfacher in der Handhabung und überzeugte alle Beteiligten.

Auch wird bereits bei Bett et al beschrieben: je größer das Insert desto schwieriger erscheint die homologe Rekombination. Bei der allein fast 6kb großen Kasette des Cetuximab, wie in dieser Arbeit, schien der Risiko/Nutzen-Faktor zu hoch. Dies und die scheinbar kompliziertere, durch viele Teilschritte gekennzeichnete Herstellung des adenoviralen Vektors, führten zum Abbruch der Bemühungen in diese Richtung und zur Umklonierung des Transfervektors in das AdEasy-System.

Umklonierung des Transfervektors in das AdEasy-System

Die Umklonierung des Transfervektors und alle weiteren Experimente und Untersuchungen erfolgten unter entsprechenden S2-Bedingungen im Heinrich-Pette-Instituts auf dem Gelände des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dobner in der Abteilung ‚Virale Transformation‘.

Die Herstellung des Konstrukts erfolgte nun nach dem Protokoll zur Herstellung von Adenoviren mittels homologer Rekombination im AdEasy-System nach Lou et al. von 2007. Diese Technik erfolgt in drei Schritten: i) das gewünschte Gen muss in einen Shuttlevektor subkloniert werden (z.B.: pShuttle) ii) der Shuttlevektor muss zusammen mit dem Backbone-Vektor (z.B.: AdEasy-1 = Deletion von E1 und E3) in kompetente Bakterienzellen BJ 5183 eingebracht werden iii) nach erfolgtem PacI Verdau erfolgt die Transfektion von 293-Zellen zur Virusproduktion, die 14-20 Stunden später geerntet werden können.

In einem ersten Schritt wurde der vorherige 542 Vektor mit Cetuximab (225)-Insert mittels PCR amplifiziert, aufs Gel aufgetragen und die Konzentration optisch bestimmt (ca. 25ng/µl DNA). Die etwa 5200bp große Bande des Cetuximab-Inserts wurde ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des Five prime Gelextraktionskit entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt.

Zeitgleich wurden 5µg von pShuttle als Plasmidvektor zunächst mit der Restriktionsendonuklease EcoR V verdaut, anschließend gefällt und erneut mit KpnI verdaut. Der Verdau wurde ebenfalls zur Kontrolle aufs Gel aufgetragen und die Konzentration optisch abgeschätzt.

Anschließend wurden 40ng des vorherigen Verdau des pShuttles und 72ng des Cetuximab-Inserts mit dem Roche Rapid DNA Ligation Kit eine Stunde bei 22°C, eine weitere Stunde bei 13°C und anschließend 15 Minuten (min) bei 37°C in ligiert und anschließend in chemisch kompetente DH5α (100µl) transformiert. Dabei wurden die speziellen Röhrchen auf Eis gelagert und anschließend bei 42°C für Sekunden im Wasserbad zügig erwärmt. Anschließend erfolgte für weitere 2 min die Lagerung auf Eis.

Die Suspension wurde danach unter Hinzugabe eines Mediums (LB₀) bei 37°C geschüttelt und LB-Kanamycin-Platten damit beimpft. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt und in LB_{Kana}-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert.

Darauf folgten die Aufarbeitung der DNA mittels Minipräparation sowie die Überprüfung der Ligation durch PstI-Verdau. Dabei zeigte sich ein Klon (pShuttleCetuximabmitPmeI) als vielversprechend und wurde daher für die weitere Arbeit verwendet und in Kultur gebracht. Der DNA Gehalt wurde photometrisch bestimmt und lag bei 203ng/μl. In der Sequenzierung des Klons konnten die schwere und auch die leichte Kette nachgewiesen werden (s.Anhang).

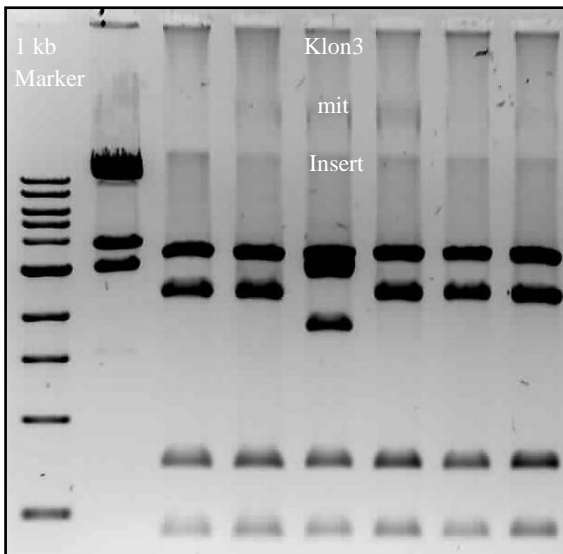


Abbildung 16: Pst I Verdau von CetuximabpShuttle, Klon 3 enthält Insert ==> weiterverarbeitet

In folgenden Sequenzierungen und Kontrollverdauansätzen nach durchgeführter Quick-Change-PCR wurden kleinere Punktmutationen im Ausgangsvektor 542 entdeckt, die für den weiteren Verlauf jedoch kein Problem darstellten. Die QC-PCR wurde zum Einfügen einer Punktmutation (T -> C) in der PmeI Schnittstelle am Ende der leichten Kette durchgeführt, um diese zu beseitigen und anschließend mittels Restriktionsverdau zu kontrollieren. Allerdings wurden wiederholt keine Linearisierungen der Verdauansätze beobachtet und das erwartete Bandenmuster konnte nicht gesehen werden. Es erhärtete sich der Verdacht nach mehrfacher Wiederholung, dass entweder die Schnittstellen nicht mehr entsprechend der Vektorkarte vorhanden waren, da die vorherige Klonierung eine Pme-Schnittstelle eingefügt hatte, diese also fehlerhaft war oder durch die QC-PCR die leichte Kette des Klon 3 (CetuximabpShuttle) nicht mehr vorhanden war.

BstZ17I konnte nach erneuter Recherche als single cutter zur Linearisierung identifiziert werden. Damit konnte der Transfervektor gut dargestellt werden und wurde daher für die weitere Arbeit eingesetzt.

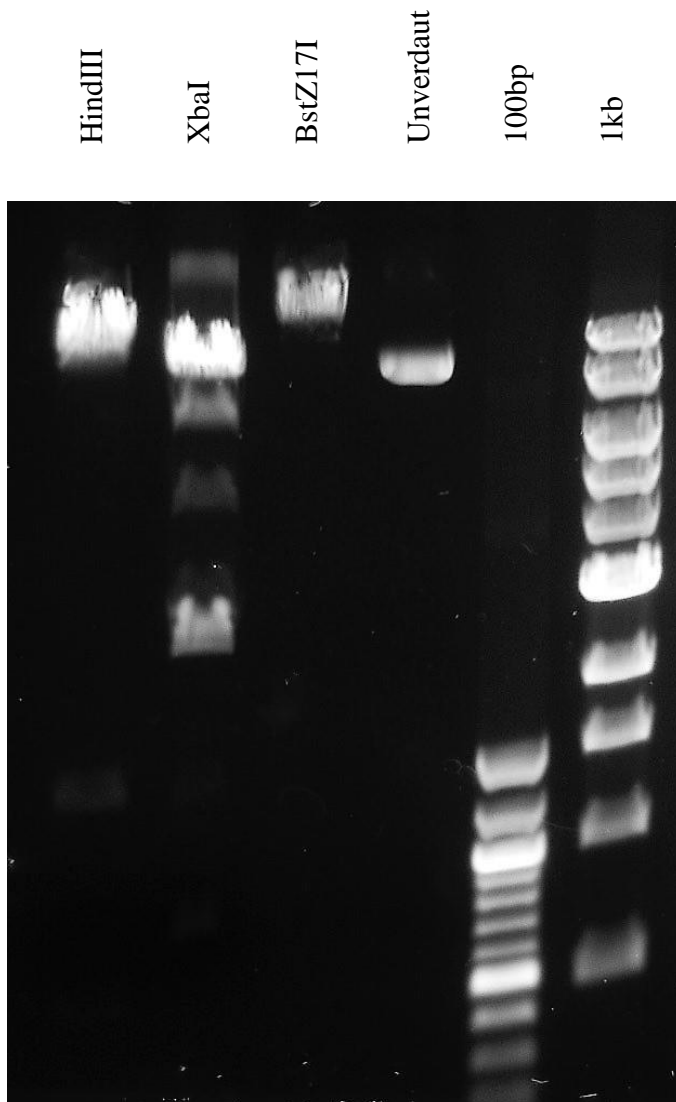


Abbildung 17: Restriktionsverdauung Klon 3: BstZ17I linearisiert, XbaI und HindIII zeigen alle erwarteten Banden

Herstellung des AdEasy-Konstrukts

Nach dem Protokoll von Lou und Vogelstein erfolgte entsprechend, dass der Verdauansatz des BstZ17I anschließend zur Elektrotransformation in die superkompetenten BJ5183 E. coli, bei dem ein Antibiosenwechsel entsprechend von Ampicillin- auf eine Kanamycinresistenz erfolgte, eingesetzt wurde.

Es erfolgte die homologe Rekombination des Vektors (Transgen) und des AdEasy-1-Bacmid, (adenoviralen Anteile außer E1 und E3-Region) in die BJ5183. Dabei wurden

etwa 500ng des Vektors und 750ng des Bacmids eingesetzt, um sie in 50µl kompetente Bakterien zu transformieren.

Die Transformation wurde anschließend in Kultur gebracht und die DNA zunächst mittels Minipräparation aufgereinigt.

Um den Rekombinationserfolg zu überprüfen, erfolgte der Restriktionsverdau mit PacI. Dabei wurden je nach Rekombination (über den ori oder über ITR) Fragmente um 3kb und /oder 5kb erwartet. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte anschließend in Agarosegel. Dabei wurden alle 12 Proben aufgetragen und mit dem DNA-Standard 1kb verglichen. Es zeigten sich vier Proben mit dem erwarteten Bandenmuster (Probe 1, 4, 5 und 11).

Die Proben eins und vier zeigen dabei ein 5kb-Fragment, fünf und 11 hingegen ein 3kb-Fragment. Alle anderen Proben wurden verworfen, da Doppelbanden erkennbar waren. Von den Proben 1, 4, 5 und 11 wurden zur Sicherung Glycerolstocks angelegt und bei -80°C eingefroren (pAdCetuximabPacI 1, 4, 5, 11).

Zur DNA-Gewinnung und in Vorbereitung auf die Transfektion in die Helferzelllinie wurde die Probe eins in Kultur gebracht und anschließend mittels Maxipräparation entsprechend Anleitung des Herstellers Qiagen aufgereinigt.

Der DNA-Gehalt der entstandenen Konstrukte (pAdCetuximabPacI) wurde photometrisch gemessen und ergab für Klon 1 846ng/µl, Klon 4 zeigte einen DNA-Gehalt von 982ng/µl und Klon 5 724ng/µl DNA.

Virusproduktion

Zur Vorbereitung auf die Transfektion des rekombinanten adenoviralen Vektors wurden 293-Zellen entsprechend aufgetaut und mit 5% NCS 1% P/S DMEM- Medium in große Well-Schalen (154cm²) ausgesetzt, wobei 1,4x10⁶ Zellen pro Well ausgesät wurden. Die HEK-Zellen sind durch ihre ursprüngliche Transformation mit einem Adenovirus in der Lage, bestimmte adenovirale Gene zu exprimieren. Am nächsten Tag wurden die Zellen bereits mit DMEM in 6-well-Schalen aufgeteilt. Bei einer Konfluenz der Zellen von 60-70% konnte die Transfektion erfolgen.

Parallel erfolgte die Vorbereitung des Konstrukts zur Transfektion in die 293-Zellen mittels erneutem PacI-Verdau zur Linearisierung und Abspaltung der Kanamycin-Resistenz und dem „ori“. Es wurden zur Transfektion je zwei 1,5ml Eppendorf-Tubes pro Ansatz vorgelegt und jeweils mit 480µl DMEM₀ bestückt. Zum einen Tube wurde 20µl Lipofectamin, zum anderen 20µl (= 8µg DNA-Gehalt) des pAdCetuximabPacI-Ansatzes gegeben. Anschließend wurden beide Tubes komplett miteinander vermischt und bei RT belassen.

Lipofectamin besteht aus neutralen sowie auch kationischen Lipiden und dient durch die Komplexierung der DNA mit kationischen Verbindungen als Begünstigung für die Anheftung an negativ geladene Zelloberflächen sowie für die Endozytose ins Zytoplasma. Gleichzeitig bietet es Schutz vor einem extrazellulären Abbau. Über die Interaktion der

Lipide kommt es zur Destabilisierung der endosomalen Membran im Zellinneren, so dass die DNA-Freisetzung aus dem Endosom vor dem lysosomalem Abbau stattfindet. Insgesamt dient es also dazu, die Zellen so effizient wie möglich zu transfizieren, um eine hohe Ausbeute zu erzielen.

Die HEK-Zellen wurden von ihrem Medium befreit und mit DMEM₀ vorsichtig gewaschen. Es erfolgt anschließend die Hinzugabe des kompletten Ansatzes aus dem bereits gemischten und inkubiertem Eppendorf-Tube. Es wurden weitere 600µl DMEM₀ hinzugegeben und die transfizierten Zellen stündlich vorsichtig geschwenkt und dazwischen bei 37°C inkubiert. Der nächste Mediumwechsel erfolgte 6 Stunden später auf ein tetrazyklinfreies Vollmedium (FKS). Danach erfolgten noch weitere Wechsel des tetrazyklinfreien Mediums. Der Nachweis der Virusproduktion erfolgte mit einem B6-Immunfluoreszenz-Test, bei dem die E2-Region des Virusgenoms angefärbt und damit sichtbar gemacht wird.

Es zeigten sich unter IF-Mikroskop fluoreszierende grün-leuchtende Zellen, die eindeutig als Viren identifiziert werden konnten. In der ersten Anzuchttrunde zeigten sich bereits 100 Viren/well. Als die Zellen 2/3 der Well-Schalen übersäten bzw einen zytopathischen Effekt zeigten, wurden sie geerntet und erneut einer freeze/thaw-Phase unterzogen, zentrifugiert und der ÜS auf die vorbereiteten HEK 293 (etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen auf 100mm Petrischale bez. 5×10^6 Zellen auf 150mm Schale) aufgeteilt und somit weiter vermehrt.

Virustitration

Um zu erfahren, in welcher Menge bzw. Effizienz Viren produziert wurden, erfolgte die Virustitration mit Klon 4 (pAdCetuximabPacI) nach erfolgter Transfektion in 293.

Die Virustitration erfolgte auf 6-Well-Schalen, die polylysinbehandelt waren. Es wurden pro Well 3×10^5 293-Zellen etwa 14-16 Stunden vor der Infektion ausgesät. Der Virus wurde bei Verwendung eines älteren Virusstocks bei RT aufgetaut und kurz gevortext, um die Zellen aufzuschließen. Bei neuen Virusüberständen musste ein dreimaliges Freeze/Thaw- Verfahren durchlaufen und entsprechend anschließend zentrifugiert werden, um den Überstand zur Infektion zu nutzen. Nach Mediumwechsel auf dem DMEM 10% FKS 1% P/S wurden die Zellen mindestens 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zum Nachweis der Viren wurde ein B6-Immunfluoreszenz-Test durchgeführt. Anschließend erfolgte die Identifizierung von Viren. Es zeigten sich je nach Verdünnung (bis 0,001µl) fluoreszierende Viren. Daraus schlossen wir auf eine effiziente Virusproduktion: mit dem Klon 4 noch besser als mit Klon 5 bei gleicher Verdünnungsreihe. Es zeigte sich bei Klon 4 ein Titer von etwa $1,9 \times 10^6$ FFU/µl (Total auf 10ml $1,9 \times 10^{10}$ FFU) und bei Klon 5 etwa von $1,4 \times 10^6$ FFU/µl (Total in 4ml $5,4 \times 10^9$ FFU)

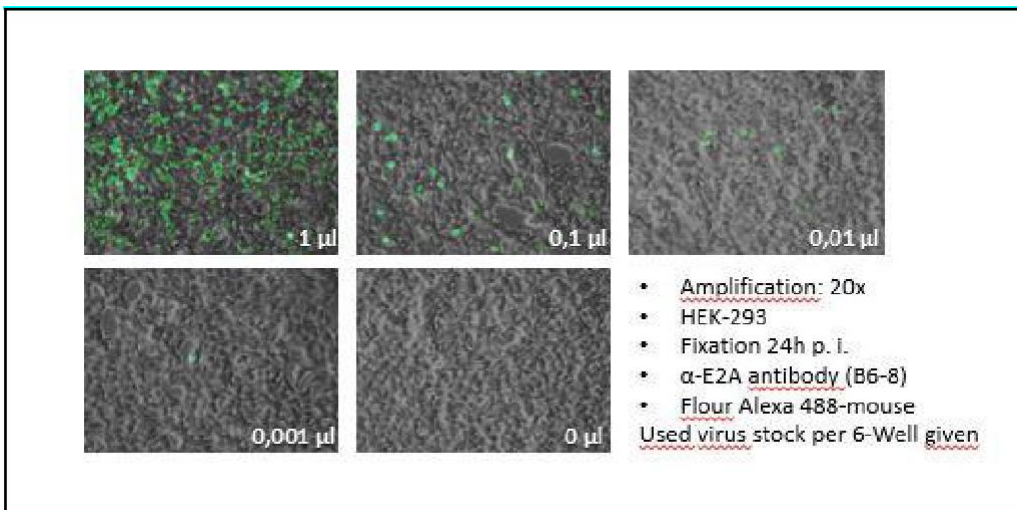


Abbildung 18: Virustitration Klon4 ca. $1,9 \times 10^6$ FFU/ μ l Total (ca. 10 ml): $1,9 \times 10^{10}$ FFU

Funktionsanalysen

Der Vektor pShuttleCetuximab im Vergleich zu ähnlichen Konstrukten, deren Funktionalität bereits nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft und zwar hinsichtlich seiner Funktionalität in Hinblick auf die AK-Expression und Nachweis der schweren und leichten Kette.

Zur Vorbereitung auf den ELISA und auch die Westernblot-Analysen wurden etwa 70% konfluente HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten

i) pcDNA3.1.225huIgG1HisStop2A/Fu **ii)** pcDNA3.1.225huIgG1.IRES **iii)** 582
iv) pShuttleCetuximab **v)** Ad5Cetuximab2A **vi)** pShuttleCetuximabIRES
vii) pBud225IgGHis transfiziert. Außerdem wurden als Positivkontrolle Erbitux und als Negativkontrolle die 293-Zellen selbst verwendet.

Je Konstrukt wurden üblicherweise 5 μ g DNA zur Transfektion mit 20 μ l PEI eingesetzt. Nach 4 Stunden erfolgte der Mediumwechsel von Optimem auf tetrazyklinfreies DMEM 10% FKS/ 1% P-S.

Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen, die in einem elektrischen Feld auf einem Polyacrylamid-Gel in SDS-Page (Trägermembran) entsprechend ihrer Größe zerlegt werden und anschließend mit einem senkrecht dazu gerichteten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Mittels spezifischer Antikörper können diese nun sichtbar gemacht werden.

Es wurden sowohl Zelllysate als auch –überstände für die Versuche verwendet.

Dabei fiel auf, dass die schwere Kette des Konstrukts pShuttleCetuximab (Klon 3) über dem der Vergleichskonstrukte pBud225IgGHis und Erbitux sowie dem pcDNA3.1 mit 2A-Peptid und Furinschnittstelle läuft. Das pcDNA3.1 Konstrukt mit 2A/Fu konnte ebenfalls keinen Nachweis der richtigen Laufhöhe der schweren Kette im IWB erbringen, so dass

eventuell nahe liegt, dass es auf die 2A/Fu-Site zurückzuführen ist, die ebenfalls im konstruierten Klon 3 (pShuttleCetuximab) vorhanden ist.

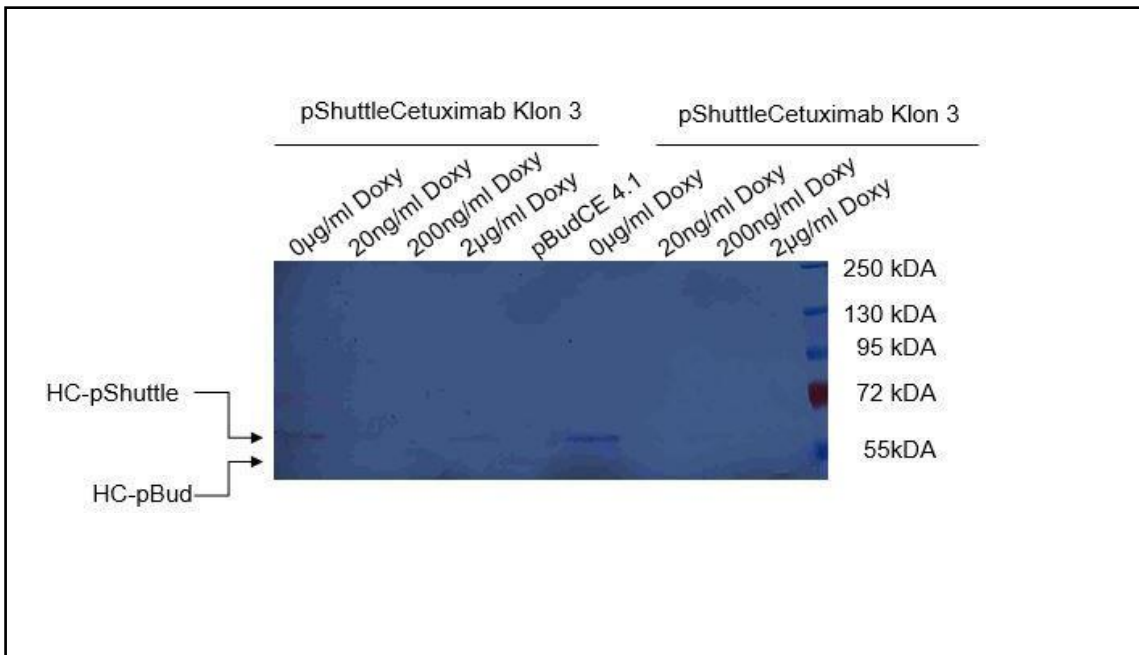


Abbildung 19: IWB Klon3 Dox-reguliert

Durch den eingesetzten monoklonalen TetR-AK konnte der Tetrazyklin-Transaktivator des Konstrukts jedoch gezeigt werden. Es konnte ebenfalls eine Regulierbarkeit des Systems im Klon 3 durch Doxyzyklin im Westernblot nachgewiesen werden, wobei diese 1. weniger stark regulierbar, als erwartet und sich 2. Hinweise auf eine eventuelle Überlastbarkeit des Regulationssystems in unseren Versuchen zeigten, da die Regulierbarkeit bei 2µl wieder abnahm bzw. die Antikörperproduktion teilweise wieder dezent stieg. Dieses Ergebnis konnte vor allem auch im ELISA wiederholt gesehen werden.

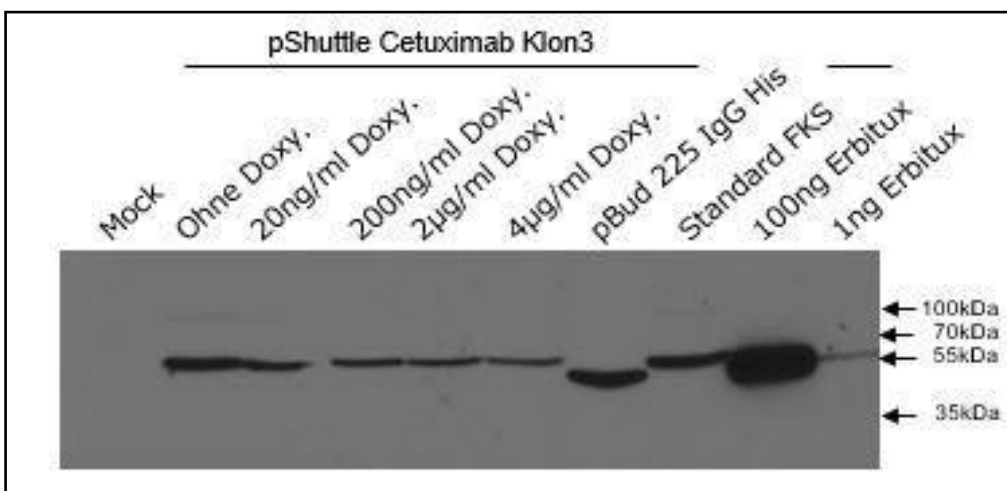


Abbildung 20: IWB Klon3, 100µg Lysat, Anti human HRP A80 104p AK

Außerdem konnte in diesem Versuch durch den Einsatz von Standard-FKS bei einem Ansatz eine allenfalls geringe Downregulation des Systems gezeigt werden. Es ist daher zu

erkennen, dass die Regulationskapazität, nicht unseren Erwartungen aus vorbeschriebenen Ergebnissen entspricht (Vgl. stellvertretend Block et al 2003). In einem weiteren IWB bei dem sowohl ein pShuttleCetuximab-IRES-Konstrukt zur Überprüfung der Laufhöhe der schweren Kette (HC) als auch der fertige Virus Ad5Cetuximab2A gegen einen kommerziell erworbenen Erbitux getestet wurden, zeigt sich eine etwa bei 60kDa liegende Laufhöhe der schweren Kette des 2A-Konstrukts. Im Vergleich zum IRES-Konstrukt und zum Erbitux, bei denen die Laufhöhe der schweren Kette bei 55kDa sichtbar wird, gehen wir daher von einer Veränderung im Rahmen der 2A-Peptid-Verknüpfung aus, die sich wiederholt darstellen ließ. Wahrscheinlich wird hierbei nicht vollständig prozessiert, so dass die „zusätzlichen Aminosäuren“ zu einer dezent erhöht sichtbaren Laufhöhe der schweren Kette aller Cetuximab-2A-Konstrukte führt. In diesem Versuch wurden 293-Zellen mit jeweils 6µg der Konstrukte pShuttleCetuximab-IRES und Erbitux (PEI) transfiziert sowie mit einer MOI 20 mit Ad5Cetuximab2A infiziert und nach 72 Stunden geerntet. Es wurden hierbei nur RIPA-Lysat-Proben verwendet (100µg Lysat). Eine Ladekontrolle wurde mit β-Aktin durchgeführt (AC 15). Die leichten Ketten der verschiedenen Konstrukte zeigten sich hingegen auf gleicher Höhe.

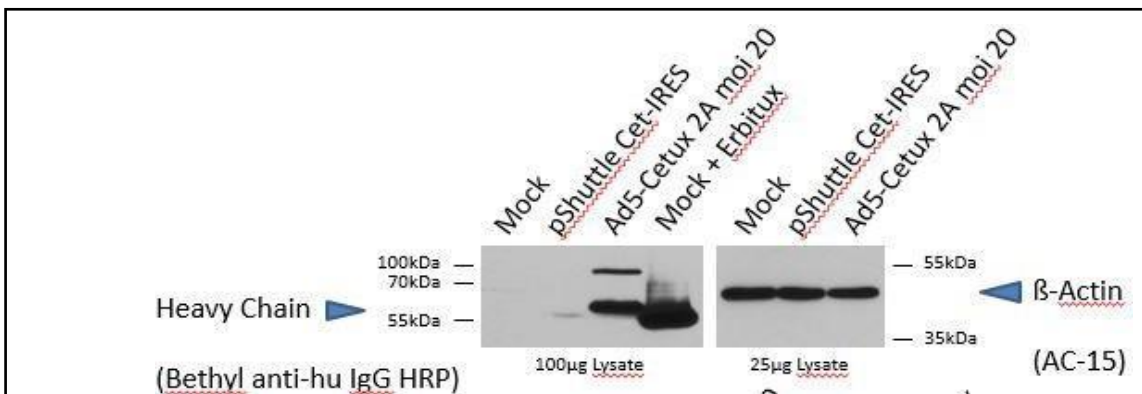


Abbildung 21: IWB Ad5 Cetuximab 2A im Vergleich

ELISA zum Nachweis der Expression

Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, wobei der zu bestimmende Antikörper über ein spezifisches Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden wird und anschließend durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert werden kann, indem ein Farbumschlag photometrisch gemessen werden kann. Dieser Test kann daher quantitative Aussagen über Proteine, in unserem Fall über den produzierten Antikörper Cetuximab, liefern. Das spezifische Antigen in den Mikrotiterplatten ist ein sEGFR, als coating Antigen. Es werden nun die entsprechenden Zellüberstände hinzugegeben, in denen der Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab exprimiert werden soll. Anschließend erfolgte die Zugabe des zumeist mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Antikörpers gegen humanes IgG. Um diesen zu detektieren wurde AP-Detektionspuffer und pNPP hinzugegeben. Um den erwarteten Farbumschlag zu messen, erfolgte die photometrische Messung bei 405nm.

Im ELISA konnte insgesamt lediglich eine eingeschränkte Expression des AK gezeigt werden, welche sich allerdings mit dem Ergebnis im IWB deckt. Es scheint eine

Überlastbarkeit des Systems zu geben, da die Expression des Antikörpers unter Hinzugabe von 2µl Doxyzyklin erneut ansteigt. Im ELISA erkennt man eine gute Expression ohne Hinzugabe von Doxyzyklin sowohl im Ausgangsvektor 582 mit Cetuximab-Kassette als auch im pShuttleCetuximab Klon 3, anschließend eine deutlich supprimierte Expression bei Zugabe von 0,2µl Doxyzyklin entsprechend unseren Erwartungen und erneuter deutlicher Anstieg der Antikörperexpression bei Hinzugabe von 2µl Doxyzyklin. Auffällig und interessant ist dabei, dass sowohl das pShuttle-Konstrukt, als auch der Ausgangsvektor 582 das gleiche Muster zeigen, was diskussionswürdig in Hinblick auf eine eventuelle Überlastbarkeit des Konstrukts erscheint bzw. auch andere Ursachen haben könnte, die eventuell doch im Zusammenhang mit vereinzelt Mutationen in der Sequenz stehen.

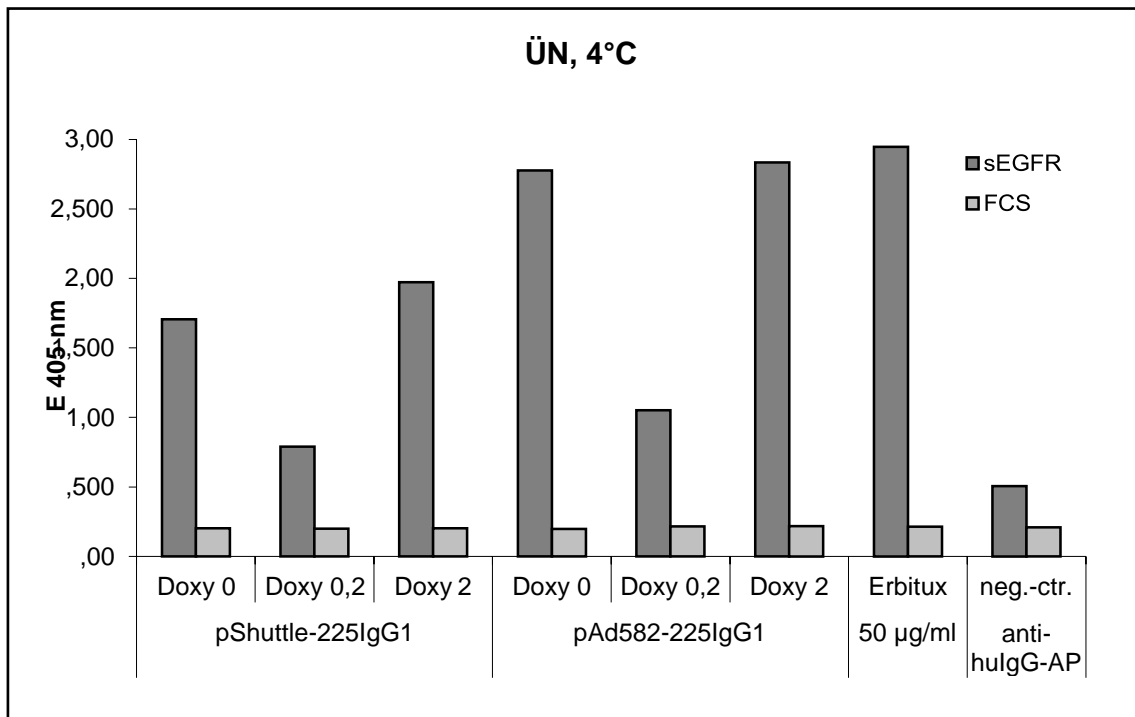


Abbildung 22: ELISA Klon3 und 582 Dox-reguliert

Der Vergleich mit dem Konstrukt pBud225hulgG₁His in vorherigen Kontrollen und dem Ausgangsvektor 582 konnte jedoch zeigen, dass die Expression des Cetuximab durchaus gegeben ist und die Konstrukte auch im Rahmen eines Proof of Principle funktionieren.

Dies konnte auch in der o.g. Überprüfung der 225-Kassette im Klon 542/3-5 im ELISA bereits zuvor bestätigt werden.

Ergebnisse der Virusinfektion von Tumorzelllinien

In den durchgeführten Experimenten wurde die Infektion von verschiedenen Tumorzelllinien mit AdGFP als Kontrollkonstrukt zur Überprüfung der Infizierbarkeit im Vergleich zu HEK 293 durchgeführt und über 24h deren Wachstum beobachtet. Dabei ergab sich nur eine geringe Infizierbarkeit, vor allem der Zelllinien HT29 (0,05%), A431 (0,43%), Colo 320 (0,50%) und Lovo-Zellen (0,36%) im Vergleich zu den HEK-Zellen, die sich fast zu 100% infizieren ließen. Die HCT116-Zellen hingegen zeigten eine Infektionsrate von 10% im Vergleich. Dabei wurden die Zelllinien mit den empfohlenen

Medien vorbereitet und bei einer Konfluenz von mindestens 70-80% mit AdGFP in derselben MOI 300 infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Sichtfelder ausgezählt.

Tabelle 7: Infizierbarkeit von Zelllinien

Estimated infectability relative to HEK 293	
HT29	0,05%
HCT116	10,00%
A431	0,43%
Colo320	0,50%
Lovo	0,36%

Um eine gewisse Vergleichbarkeit zu bewahren, wurden anschließend die Zelllinie A431 und Lovo-Zellen mit einer MOI von 300 sowohl mit AdGFP, als auch mit dem fertigen Konstrukt AdCet2A und mit Nichts (Mock) transfiziert.

Es konnte bei den Lovo-Zellen bei einer MOI 300 bei der Infektion mit AdGFP und AdCet2A eine bis zum 5 Tag nach dem Aussäen bestehende Wachstumshemmung beobachtet werden, die sich bei den nicht infizierten Lovo-Zellen nicht zeigte. Ein zytopathischer Effekt kann daher nicht völlig ausgeschlossen werden, obwohl sich anschließend zumindest beim Doppelansatz des AdCet2A ein deutliches Wachstum abzeichnete und nach 8 Tagen Beobachtungszeitraum noch keine Hemmung zeigte.

Bei beiden nicht mit einem Virus infizierten Ansätzen konnte ein kontinuierliches Wachstum ab dem ersten Tag beobachtet werden, welches nach 6 Tagen einbrach. Dies wurde der natürlichen Wachstumshemmung durch Überwucherung bei einer Zellzahlverdopplungszeit von 34 Stunden zugerechnet (ATCC, American Type Culture Collection, 2012).

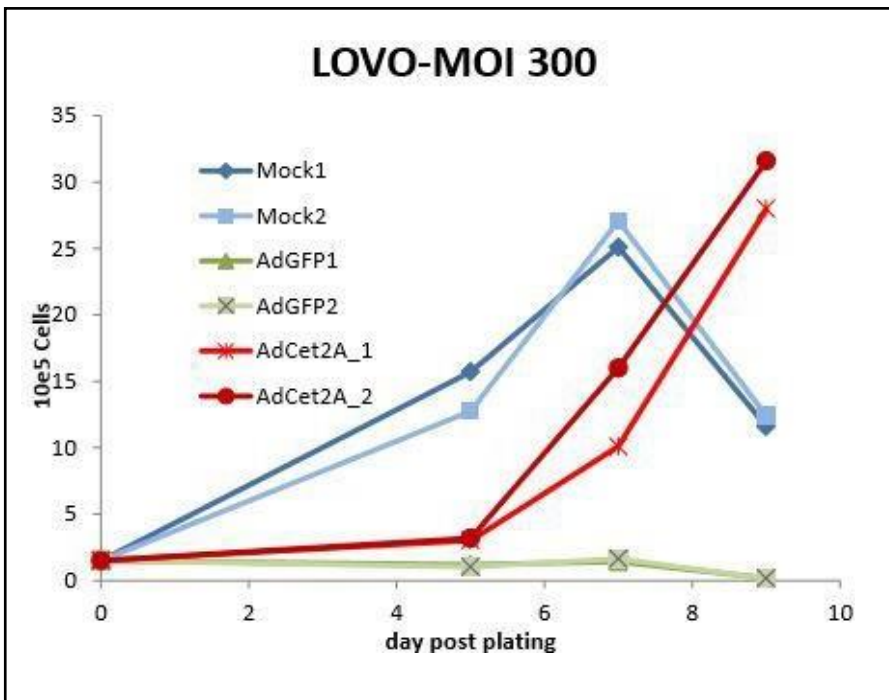


Abbildung 23: Wachstumsassay Lovo

Bei den A431-Zellen wurden die gleichen Konstrukte verwendet und bewertet. Hier zeigte sich ab dem ersten Tag ein relativ konstantes Wachstum in allen Ansätzen, wobei sich dieses ab Tag 5 p.i. nochmals intensiviert. Eine geringe Wachstumshemmung ab Tag 7 kann lediglich im 2. Ansatz des in dieser Arbeit konstruierten Konstrukts AdCetuximab2A_2 gesehen werden.

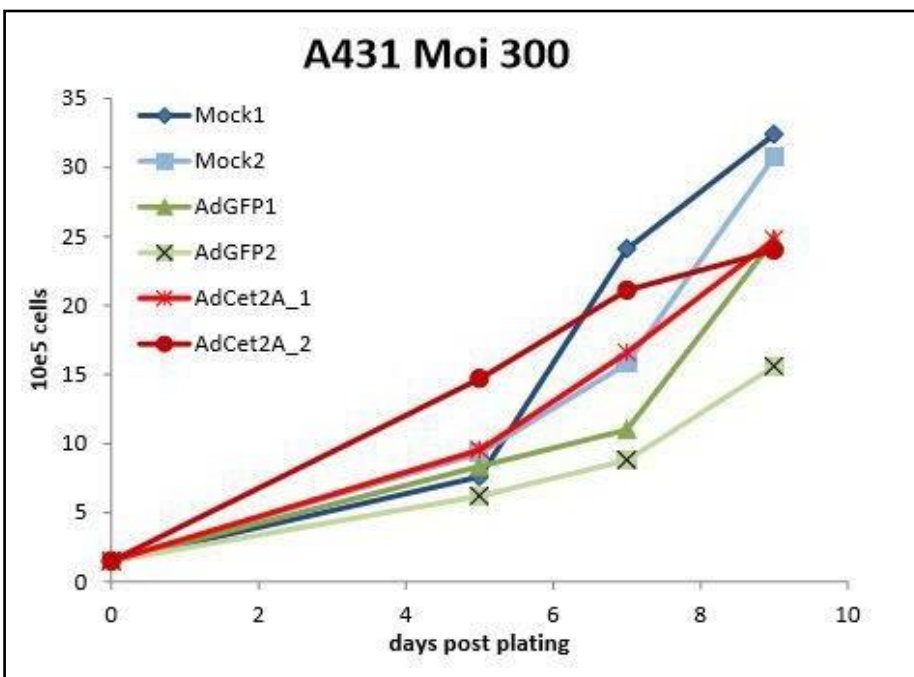


Abbildung 24: Wachstumassay A431

In vorhergehenden Experimenten mit unterschiedlichen Nährmedien (ohne Tetracyclin von verschiedenen Firmen) konnte kein Unterschied kenntlich gemacht werden. Auch bei der Verwendung des Standard FKS konnte bei in vitro Experimenten kein sicherer Anhalt für eine Hemmung der Expression bzw. Wachstumshemmung der transfizierten Zellen gesehen werden. Es wurde daher hierbei ein Standard-FKS-Medium verwendet, welches möglicherweise doch im Rahmen der Zelllinienexperimente auf das TetOff-System einwirkt. Die Expression von Cetuximab wurde daher im vorliegenden Experiment nicht bestimmt.

Sequenzierungsergebnisse

Sequenzierungen wurden in verschiedenen Abschnitten der Arbeit zur Überprüfung der Konstrukte und auch zur Fehleranalyse genutzt. Die verwendete Didesoxymethode nach Sanger beruht auf der Arbeit von Enzymen und wurde 1980 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Ein kurzer Abschnitt einer bekannten Sequenz (Primer) ist die Vorlage und verlängert dabei durch eine DNA-Polymerase den fehlenden komplementären DNA-Strang. Dabei können Abweichungen erkannt und auch hinsichtlich ihrer Relevanz mit verschiedenen Programmen, die Originalsequenzen beinhalten verglichen werden. In unserem Fall wurde dafür zumeist die NCBI Reference Sequence Datenbank und das BLAST Programm verwendet.

Die Sequenzierung des initial klonierten Vektors 542.3r.225huIgG1.2A/Fu stammt vom Klon 542/3-5.4 sowie 542/1-3.2. Es zeigten sich dabei geringe Anteile mit Doppelsequenzen, die jedoch anscheinend keine Relevanz auf die Funktion hatten, so dass diese im Rahmen dieser Arbeit keine Beachtung fanden. Die Dateien können im Anhang eingesehen werden. Da sich die Konstrukte jedoch im ELISA funktional zeigten, wurden etwaige Veränderungen belassen.

Nach der Umklonierung ins AdEasy-System erfolgte die nächste Sequenzierung des Klon 3 (pShuttleCetuximab). Dabei konnten die schwere und leichte Kette identifiziert werden. Allerdings zeigten sich Intron-Sequenzen sowie zusätzliche Anteile des Ad2-Genoms. Dieses Phänomen wird allerdings von MacGregor & Caskey 1989 (S. 2365) beschrieben und soll bei der Herstellung adenoviraler Vektoren keine Rolle spielen.

Am Ende der leichten Kette, die keine größeren Mutationen aufweist, zeigt sich jedoch eine plötzlich beginnende und auch genauso plötzlich endende Doppelsequenz im Bereich des packaging signal, im Bereich der A-repeats, was eventuell verantwortlich für die geringe Infektionsrate sein könnte (Gräble & Hearing, 1992, S. 724). Im Vergleich der Sequenzen des 582 und des pShuttleCetuximab-Konstrukt (Klon 3) mit der Originalsequenz des Cetuximab (verfügbare Daten zu Erbitux) ist die variable Region der schweren Kette ohne erkennbare Mutationen gezeigt, allerdings schien der Übergang zu konstanten Region der schweren Kette eine Veränderung der Aminosäureabfolge zu enthalten, die jedoch ebenfalls nicht relevant erscheint.

Eine zusätzliche Variabilität im Übergang vom FAB-Fragment zum restlichen Antikörper, bestehend aus einer Deletion von drei Aminosäuren, konnte nach eingehender Literaturrecherche/BLAST als Normvariante identifiziert werden.

In der leichten Kette fanden wir im variablen Bereich fünf kleinere Abweichungen der Sequenz im Vergleich zum Original-Cetuximab sowie zusätzlich zwei weitere am äußersten C-Terminus, bei dem zwei zusätzliche AS eingefügt wurden.

In Zusammenschau wurden eher kleine Abweichungen gefunden, die jedoch nicht in relevanten Bereichen des Konstrukts liegen, so dass hierbei aus zeitlichen Gründen keine weiteren Klonierungsarbeiten vorgenommen wurden. Für etwaige in vivo Experimente an Säugetieren oder Menschen sollten diese jedoch zuvor reevaluiert und entfernt werden. Eine vollständige Sicherheit, dass diese Veränderungen in den Sequenzen zu keinerlei Beeinträchtigung der Funktion führten, kann nicht abschließend geklärt werden und bleibt diskussionswürdig.

Diskussion

Adenovirale Vektoren für die Therapie des kolorektalen Karzinoms

Trotz intensiver Forschung und bereits gelungener Verbesserung der Therapieoptionen, insbesondere der metastasierten kolorektalen Karzinome, ergibt sich besonders auf dem Gebiet der Gentherapie noch Potential für Verbesserung.

Adenoviren der ersten Generation zeigen durch die Eliminierung der E1-Region deutliche Defizite in der Replikation. Des Weiteren befindet sich in dieser Region auch die onkogene Transformationsfunktion des Virus (McConnell & Imperiale, 2004), so dass ihre Verwendung eine sichere und logische Konsequenz war. Allerdings erwies sich ihr Nutzen in der Technik der homologen Rekombination in Säugerzellen als zu ineffektiv, so dass neue Techniken entwickeln wurden, die die initialen Schritte der Klonierungsarbeiten rekombinanter DNA in Bakterien stattfinden ließ, um sie anschließend in geeignete Zelllinien zu transfizieren und zur Herstellung eines rekombinanten viralen Vektors zu verwenden. Allerdings kann durch die Entfernung der E1-Region allein lediglich ein Transgen von etwa 5kb eingesetzt werden, was die Transgenauswahl deutlich limitiert (McConnell & Imperiale, 2004). Die daraus entstandenen weiteren Generationen adenoviraler Vektoren, inklusive der Weiterentwicklung der Erstgeneration, erlaubte den Einbau immer größerer „Wunschgene“ bis hin zu einer „leeren“ viralen Hülle mit einer Kapazität von bis zu 36 kb, den Helper-dependent oder gutless Vektoren.

Die in der Gentherapie meistens verwendeten viralen Vektoren haben viele Vorteile, die bereits besprochen wurden, zeigen jedoch auch Nachteile, vor allem die Immunantwort des Wirts, was zumeist die erste Generation Viren betrifft, aber bis heute immer noch eine der größten Herausforderungen darstellt. Die Immunantwort ist in der Tumorthherapie und auch bei Impfungen zwar erwünscht, limitiert die Anwendung allerdings zeitlich und verhindert bei einer hohen Immunität der Bevölkerung zum Teil auch die effektive und/oder wiederholte Anwendung. Allerdings ergeben sich in unserem Fall daraus auch Vorteile: Eine dauerhafte Expression des Transgens ist bei der hier beschriebenen Anwendung überhaupt nicht erwünscht und wäre auch eher ein Therapiehindernis, da eine dauerhafte Expression von Cetuximab weder sinnvoll noch förderlich wäre, da im beschriebenen TetOff-System dann auch dauerhaft Antibiotika gegeben werden müssten, um die Expression zu unterbinden. Die fehlende Integration ins Genom des Wirts und der Abbau durch das Immunsystem stellen sich daher eher als Vorteil dar. Die Immunantwort zeigt sich auch bei Sideeffekten auf andere benachbarte Zellen als wirkungsvoll und zeigt bei parakrinen Effekten, insbesondere in der Leber, eine Wirkung auf benachbarte Hepatozyten ohne erneute Infektion, was im Rahmen von metastasierten Kolonkarzinomen durchaus Relevanz hat.

Die neuen Erkenntnisse erscheinen aktuell vielversprechend, falls eine dauerhafte Expression des Transgens erwünscht sein sollte, wie es zum Beispiel bei immunologischen Erkrankungen der Fall ist. Die Immunantwort und insbesondere die Antikörperproduktion gegen den Virus soll durch die Verbindung mehrerer Serotypen oder durch das Einhüllen des Vektors in immunsuppressive Medikamente oder das sog. PEGylieren verhindert werden, so dass dadurch die Zerstörung des viralen Vektors und des Transgens, welche jedoch zum Teil auch durch den bisher noch nicht gut verstandenen Einfluss antiviraler Zytokine aufzutreten scheint, unterbunden werden soll (McConnell & Imperiale, 2004). Dahingehend erscheint eine Menge noch ungenutztes Potenzial zu bestehen. Insbesondere auf dem Gebiet der gutless Viren oder, wie McConnell & Imperiale (2004) bereits andeuten, im Bereich der E2-mutierten viralen Vektoren. Gutless Vektoren haben den Vorteil, dass sie ein bis zu 37kb großes Transgen aufnehmen können und dabei nur wenig eigenes immunogenes Material liefern (Józkowicz & Dulak, 2005). Allerdings benötigen sie einen Helfervirus, was die Produktion noch schwierig erscheinen lässt und die Herstellung in entsprechenden Mengen noch nicht ausreichend ermöglicht sowie eine Verunreinigung des gutless Vektors problematisiert. Dies macht zusätzliche Arbeitsschritte, zum Beispiel Ultrazentrifugation in CsCl nötig. Mittlerweile werden zur Synthese auch Methoden der homologen Rekombination in E.coli ähnlich der ersten Virusgeneration erprobt und durchaus bereits standardisiert verwendet (Józkowicz & Dulak, 2005). Es bleibt abzuwarten, ob eine „einfache“ Herstellung der gutless Vektoren deren Verwendung und Weiterentwicklung, insbesondere im Hinblick auf die Sicherheit, so voranbringt, dass ein klinischer Einsatz ermöglicht wird, wie es aktuell den Anschein macht.

Der hier hergestellte und auch verwendete adenovirale Vektor weist eine Deletion der E1/E3-Region auf, so dass der Einbau der etwa 6kb großen Cetuximabkassette möglich war und er damit zur ersten Generation Viren gehört. Durch die Verwendung eines bicistronischen 2-Promotoren Konstrukts mit TetOff-System ist die Regulierbarkeit eines solchen rekombinanten Adenovirus bereits gezeigt worden und wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten gestützt (Block et al., 2002). Auch die intratumorale und daher lokale Applikation ähnlicher Vektoren mit Zytokin-Transgen konnte bereits eine systemische antitumorale Wirkung zeigen, ohne jedoch die mit der systemischen Anwendung verbundenen Nebenwirkungen (stellvertretend Bramson et al., 1996)

Dennoch zeigen alle viralen Vektoren weiterhin Probleme in der Verträglichkeit und sie provozieren alle noch immer eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Immunantwort, die allerdings zum Teil auch gewünscht ist.

In anlehnenden Versuchen in folgenden Arbeiten sollte die Überprüfung der parakrinen Effekte auf Hepatozyten und auch die Weiterentwicklung der Vektorsysteme berücksichtigt und spezieller in Augenschein genommen werden. Diesbezüglich könnten auch andere Vektorsysteme ausprobiert werden. Andere Vektorsysteme erleben aktuell ein Revival in Bezug auf ihre Applikation. So werden in aktuellen Studien auch Mikronadelsysteme von Chen et al. favorisiert, da sie minimalinvasiv und eventuell sogar Potential für die Laiennutzung haben. Dabei können sie sowohl niedermolekulare als auch hochmolekulare Substanzen und Medikamente in den Blutkreislauf bringen, indem das

Stratum Corneum überwunden wird. Außerdem erscheinen die Produktionskosten solcher Verfahren überschaubar (Chen et al., 2016, S. 2). Auch andere nicht-virale Vektoren werden intensiv beforscht, dennoch konnte der „ideale Vektor“ noch nicht gefunden werden, sei es wegen der hervorgerufenen Immunantwort, der Zelltoxizität oder der zu geringen Transfektionseffizienz. Mikronadeln oder Elektroporation zeigen ebenfalls Defizite im Schutz der applizierten DNA/Substanz, so dass diese zuvor chemisch verändert werden müsste, um die Stabilität und biologische Verfügbarkeit zu verbessern (Chen et al., 2016). Zusammenfassend kann man über Vektorsysteme aktuell sagen: dass sie durchaus Potential aufweisen, auch komplexe Substanzen zu transportieren, es dennoch weiterhin Probleme in verschiedenen Bereichen gibt, die allerdings für eine dauerhafte und sichere Anwendung im klinischen Setting relevant sind und daher Gegenstand weiterer Forschung sein werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde nach Versuchen mit der Methode nach Graham et al auch ein anderes System zur Herstellung des Virus im Verlauf ausgewählt (Graham et al., 1977). Da sich die homologe Rekombination in pBHG10 als der limitierende Schritt des ursprünglichen Systems und daher auch teils unvorhergesehen zeigte, wurde im Verlauf auf das AdEasy-System gewechselt. Dieses System kommt grob mit 3 Schritten aus, bei dem das gewünschte Gen in einen Shuttle-Vektor kloniert, dieses über PmeI linearisiert, danach zusammen mit AdEasy-1 in superkompetenten E.coli BJ 5183 kotransformiert wird. Dies wird anschließend letztlich in HEK 293 Zellen transfiziert, um einen vollständigen rekombinanten Virus zu generieren. Das Protokoll von Lou et al. erlaubt daher eine einfachere und nachvollziehbarere Variante der Virusproduktion (Luo et al., 2007).

Infizierbarkeit der Zelllinien

In den durchgeführten Experimenten wurde unter anderem die Infektion von verschiedenen Tumorzelllinien durchgeführt und über 24h deren Wachstum beobachtet. Dabei ergab sich nur eine geringe Infizierbarkeit, vor allem der Zelllinien HT29 (0,05%), A431 (0,43%), Colo 320 (0,50%) und Lovo-Zellen (0,36%) im Vergleich zu den HEK-Zellen. Die HCT116-Zellen hingegen zeigten eine Infektionsrate von 10% im Vergleich. Allerdings konnte bei den Lovo-Zellen bei einer MOI 300 bei der Infektion mit AdGFP und AdCet2_A eine bis zum 5. Tag nach dem Aussäen bestehende Wachstumshemmung beobachtet werden, die sich bei den nicht infizierten Lovo-Zellen nicht zeigte.

Bereits in vorangegangenen Arbeiten dieser Studiengruppe konnte eine beeindruckende Regulation von infizierten HT29-Zellen nachgewiesen werden (Block et al., 2002). Dennoch zeigen sich in den vorliegenden Ergebnissen nur geringe Infizierbarkeiten der Zelllinien. Es ist jedoch bekannt, dass auch Unterschiede in Bezug auf die verschiedenen Zelllinien existieren. Daher ist die Infizierbarkeit in Abhängigkeit des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors und Regulationsmöglichkeit in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich (Howe et al., 1995; Hidaka et al., 1999)

So postulierten Brüning und Runnebaum, dass eine hohe Dichte des CA-Rezeptors die Infektion durch eine homophile Assoziation des Rezeptors durchaus erschweren kann

(Brüning & Runnebaum, 2004). Angesichts der auch mehrfach in der Literatur beschriebenen Unterschiede der Infektionsraten erscheint dies vorstellbar. Brüning und Runnebaum fanden in ihren Experimenten ebenfalls heraus, dass der Tumornekrosefaktor α (TNF α) an der transgenen adenovirale Expression des CAR maßgeblich beteiligt zu sein scheint und sowohl, je nach Zelllinie, eine Erhöhung, aber auch eine Senkung der Expression erreichen kann und dass die zusätzliche Beigabe von Zytokinen die Expression von CAR ebenfalls erhöht und so zu einer verbesserten therapeutischen Effizienz beitragen könnte (Brüning & Runnebaum, 2004). Auch in anderen Dissertationen zu diesem Thema zeigten sich sehr variable Infektionsraten, so dass bereits dort eine Zelllinienabhängigkeit thematisiert wurde (stellvertretend Puls, 2004). Da sich in der Expressionskassette mehrfach eher irrelevant geglaubte Mutationen verstecken, kann eine „Behinderung“ des Lebenszyklus des rekombinanten Virus dadurch bedingt und entsprechend auch die Adsorption gestört sein. Das Verpackungssignal des Ad5 soll 5 A-repeats enthalten, die jedoch bereits im offiziellen pShuttle Vektor reduziert sind. Im verwendeten Konstrukt kann die Sequenz nur bis zum A-repeat III nachgewiesen werden. Danach zeigt sich ein zu kurzes Fragment, welches unsauber und daher schwer zuzuordnen ist. Es besteht die Möglichkeit, dass hierin im schlechtesten Fall Bereiche der fehlenden Repeats enthalten waren. Dennoch kann in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend evaluiert werden, warum die Infektionsrate derart unterschiedlich ist.

Regulationskapazität des AdCetuximab im Rahmen des Tetrazyklin-regulierbaren Systems

In der vorliegenden Arbeit wurde das weit verbreitete und in den letzten Jahren weiterentwickelte Tetrazyklin-regulierbare System als Tet-Off-System in dem rekombinanten Adenovirus verwendet. Adenoviren sind die weitverbreitetsten Vektoren in der Gentherapie, da sie sowohl leicht in großen Mengen herzustellen sind und eine entsprechend geeignete Transgenkapazität inklusive vieler möglicher Regulationssysteme bietet und ruhende Zellen infizieren können, wobei sie sich nicht ins Genom integrieren, was lediglich eine transiente Genexpression ermöglicht, die in den neuen Vektorsystemen aber auch viele Monate bis Jahre betragen kann.

Verschiedene Systeme sind bereits in den letzten Jahren entwickelt worden, doch dass am meisten verwendetet System bleibt weiterhin die Tetrazyklin-abhängige Regulation. Dieses System ist vielseitig einsetzbar und bietet zwei Varianten: Das Tet-On- sowie das Tet-Off-System. Im Off-System wird ein Tetrazyklin-Transaktivator Protein (tTA) benutzt. Unter Einsatz von Tetrazyklin oder seiner Derivate, wird die Transkription abgeschaltet. Als Derivat von Tetrazyklin wird insbesondere Doxyzyklin bevorzugt, aufgrund seiner guten pharmakokinetischen und pharmakodynamische Eigenschaften, verwendet. Dazu zählen vor allem seine gute orale Absorption, die hervorzuhebende Gewebegängigkeit, die hepatische Ausscheidung, die lange Halbwertszeit von etwa 14-22 Stunden sowie einen relativ langen regulierenden Effekt (Agha-Mohammadi et al., 1997). Zusätzlich wurde in anderen Arbeiten bereits eine sehr gute und starke Suppression unter geringen Konzentrationen Doxyzyklin nachgewiesen und gezeigt (Block et al., 2002)

Im Tet-On System hingegen wird durch den mutierten tTA, der in diesem System als reverser Tet Transaktivator (rtTA) bezeichnet wird, die Transkription überhaupt erst durch das eingesetzte Antibiotikum angeschaltet (H. Chen et al., 2015). Regulation der Genexpression ist vor allen Dingen in Bezug auf die neuen Vektorsysteme (z.B.: gutless adenovirale Vektoren), die mit einer langen Transgenexpression beeindruckend, wichtig.

Für gentherapeutische Zwecke und Applikationsformen wird das Tet-On-System mittlerweile bevorzugt verwendet, da die gewünschte Regulation schneller erreicht wird und eine fortwährende bzw. längere medikamentöse Behandlung nach Beendigung der Genexpression nicht mehr nötig ist (H. Chen et al., 2015). Der Beginn dieser Dissertation und vor allem die Idee dazu lagen jedoch noch im Weiterentwicklungszeitraum des Tet-On Systems, so dass eine Verwendung zu diesem Zeitpunkt für diese Dissertation noch nicht erwogen wurde und das Tet-Off-System Anwendung fand. Zu diesem Zeitpunkt sah man die problematischen Eigenschaften des Tet-On-Systems noch nicht vollständig behoben, zu denen relevante Sicherheitsaspekte gehörten. Die wichtigsten Nachteile der ersten Generation rtTAs waren die verbleibende Affinität zum Tet-Operon, so dass trotz Abwesenheit des Doxzyklins eine Genexpression („leakiness“) stattfand, die Instabilität in verschiedenen Säugerzellen sowie relativ hohe Konzentrationen zur Induktion der Transgenexpression von 1-2µg/ml Doxzyklin mussten verwendet werden. Im Gegensatz dazu konnten mit der Tet-Off-Variante bereits in Vorarbeiten der Studiengruppe aus früheren Jahren eine sehr starke Supprimierbarkeit unter Doxzyklin bis zu 6000fach in vitro nachgewiesen werden (Block et al., 2002) sowie höhere Regulationskapazitäten in humanen Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (Puls, 2004). Ein weiterer Vorteil des gesamten Systems besteht in der Verwendung des Derivats Doxzyklin, da dieses Antibiotikum im Rahmen der Chemotherapie des Kolonkarzinoms bei starken Nebenwirkungen verabreicht wird, die jedoch in Form eines Hautausschlags häufig mit einer guten Prognose assoziiert sind. Somit schlägt man hier die berühmten zwei Fliegen mit einer Klappe. Des Weiteren ist die schnellere Reaktion (Abschalten der Genexpression) des Tet-Off-Systems nach Gabe von Doxzyklin bei doch beträchtlicher HWZ in dem verwendeten Setting unter Verwendung von E1-deletierten Viren ein nennenswerter Vorteil.

Sehr vielversprechende Weiterentwicklungen in den letzten Jahren sind dabei im Tet-On-System die Kombinationen aus einem transkriptionalen Silencer/KRAB-Fusionsprotein und der weiterentwickelten Form des reversen Transaktivators, dem rtTA2^S-M2. Der Silencer unterbindet die problematische basale Restexpression ohne Antibiotikum und bleibt inaktiv bei Einsatz von Doxzyklin. Der Grund dafür ist seine hohe Bindungsaffinität in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (Lena et al., 2005). Damit erscheint unter heutiger Sicht eine enge Regulation von potenziell toxischen Transgenen durchaus vorstellbar und ist über die Zeit durchführbarer Standard geworden. Nicht zuletzt, da sich durch die Weiterentwicklungen eine 100x sensiblere Reaktion auf Doxzyklin nachweisen ließ.

Durch die Weiterentwicklung der Vektorsysteme selbst, ist auch eine multicistronische Genexpression zur vereinfachten Kontrolle der Wunschgenexpression z.B.: durch GFP oder Luciferase mittlerweile möglich (Welman et al., 2007). Dennoch zeigt die

Regulationskapazität beider Systeme sigmoidale Verläufe in Vorarbeiten (Puls, 2004), was eine konzentrationsabhängige Regulation vermuten lässt. Dies zeigt sich auch in den aktuellen Experimenten, bei dem sich eine Art Ceiling-Effekt bei 2µg/ml Doxyzyklin darstellt. Ein Anstieg der Transgenexpression unter Zugabe 2µg/ml Doxycyclin konnte in den vorliegenden Versuchen wiederholt nachgewiesen werden. Das Ergebnis deckt sich mit den bereits beobachteten Ergebnissen anderer Arbeiten. Da die Konzentrationen jedoch nicht im toxischen Bereich des Medikaments liegen und auch aktuell keine Sicherheitsbedenken angesichts der Zelllinienexperimente bestehen, scheint eine erweiterte Problematisierung an dieser Stelle nicht sinnvoll. Dennoch sollten diesbezüglich die genauen Grenzen der Regulationskapazität in weiteren Studien erfasst und ggf. in vivo zeitnah überprüft werden. Dies sollte vor Beginn einer klinischen Studie reproduzierbar und exakt ausgemessen worden sein, um Nebenwirkungen zu vermeiden, die auf das Antibiotikum zurückzuführen sind und im Ganzen, die zukünftige Patientensicherheit zu erhöhen.

Es wurden bereits mehrfach verschiedene Gründe für die unterschiedliche Regulationskapazitäten eines adenoviralen Vektors beschrieben. Nicht zuletzt werden Promotorveränderungen beschrieben (Verlust der Gewebespezifität, Orientierung des Promotors) ((Ring et al., 1997, S. 1046; auch Addison et al., 1997, S. 1656-1658). Als ursächliche Faktoren für die unterschiedliche Regulationskapazität werden das Inverted Terminal Repeat (ITR) sowie der E1A Enhancer des adenoviralen Genoms beschrieben. Dabei können beide Regionen aus rekombinanten Vektoren nicht deletiert werden. In Beiden werden nämlich wichtige Regionen zur Replikation (ITR) in 293-Zellen und zur Verpackung wichtiger Sequenzen (E1A Enhancer), den sogenannten „packaging signal“ untergebracht. Zusätzlich wurde bei Buvoli et al. (2002, S. 228-229) gezeigt, dass im Bereich des Enhancers auch ein Transkriptionsstart (etwa ab 231bp Ad5-Genoms) eingesetzt werden könnte, der bei einem rechtswärtig in die E1-Region eingebauten Promotor einen passiven „readthrough“ mit besserer Transgenexpression ermöglichen würde. In der vorliegenden Arbeit wurden durch Sequenzierung, bereits Unterschiede in der Sequenz des rekombinanten adenoviralen Konstrukts nachgewiesen. Unklar bleibt jedoch, trotz mehrfacher Sequenzierungen, die teils auch nicht identifizierbare Abschnitte enthielten, ob diese Veränderungen ursächlich für die eher minimale Regulationskapazität und ggf. auch für die unterdurchschnittliche Infektionsrate darstellen. Es ist zu vermuten, dass sich vor allem die Mutationen im Verpackungssignal hierbei bemerkbar machen.

In der neueren Literatur zeigen sich ebenfalls Hinweise darauf, dass die Expressionsrate und die Regulationskapazität in unterschiedlichen Zelllinien verschieden ist und dies zuweilen nicht nur mit der Zelllinie selbst, sondern auch mit der Zellkulturarbeit und an den verwendeten Medien liegen kann. Es wird beschrieben, dass nach Transferieren der Zellen in tetracyklinfreies Medium eine Transgenexpression vorerst nicht beobachtet werden konnte. Dieses Phänomen bestand dabei bis zu drei Tage. Es wurde spekuliert, dass es auch Spuren des Antibiotikums unterhalb der Nachweisgrenze im tet-freiem Medium gibt, weil die Verwendung im tiermedizinischen Bereich weit verbreitet ist und dies ausreicht, um eine Suppression des Systems zu erreichen. Es wird die unspezifische extrazelluläre Bindung des Doxyzyklin an die Matrix für die Variabilität verantwortlich gemacht (Rennel & Gerwins, 2002).

Einschätzung der Ergebnisse der Funktionsanalyse und der Sequenzierung

In den durchgeführten Versuchen zeigen sich zumeist kongruente Ergebnisse in Bezug auf ELISA- und Westernblotverfahren.

Das ELISA-Verfahren zur Antikörperdetektion konnte sowohl die Antikörperproduktion, als auch die Regulationsfähigkeit des Konstrukts nachweisen. Dennoch ergeben sich aus den Tests diskussionswürdige Ergebnisse, die sich nur zum Teil in anderen Arbeiten widerspiegeln. Zum Vergleich wurden ähnlich aufgebaute Konstrukte (zur Verfügung gestellt vom Institut für Biochemie der Universität Hamburg, AG Spillner, u.a. von Dr. Inge Braren und Dr. Melanie Plum). Ebenso wie der fertige Originalvektor 582, aus dem die Cetuximab-Kassette bei der Umklonierung ins AdEasy-System stammte, zeigt pShuttleCetuximab eine Expression des Antikörpers als auch die Regulierbarkeit des Konstrukts, welche jedoch einen vergleichbaren „Sättigungseffekt“ zu haben scheint.

Beide Konstrukte zeigen eine wieder deutlich ansteigende Expression des Transgens unter $2\mu\text{g/ml}$ Doxozyklin. Da die gesamte Cetuximab-Kassette samt Tet-System aus dem 582 herauskloniert wurde, ist anzunehmen, dass bereits während der Klonierung des vorherigen Vektors Fehler passiert sein müssen, die unbemerkt blieben. Allerdings scheint auch ein tatsächlicher Ceiling-/Sättigungseffekt des Systems nicht abwegig, da dies bereits in

anderen Arbeiten vorbeschrieben wurde (Puls, 2004). Weitere Untersuchungen sollten hier durchaus angestrebt werden.

In der Westernblotanalyse scheint es auffällig, dass die Konstrukte ohne 2A-Peptid und Furinschnittstelle auf der gewünschten Höhe von 55kDa im IWB laufen, allerdings im ELISA ähnlich mäßige bzw. variable Expressionen zeigen. Fraglich ist dabei, ob die offenbar nicht genutzte Furinschnittstelle bzw. das 2A-Peptid nur für die höhere Bande im Westernblot oder auch für die Expressionsdefizite bzw. für die eingeschränkte Regulation verantwortlich sein könnte. Eine höhere Bande im IWB ist erklärlich durch die zusätzlichen Aminosäuren, so dass bei vergleichbar mäßiger Expression davon ausgegangen werden muss, dass diese Verbindung keinen relevanten Anteil an den vermeintlichen Regulationsdefiziten hat. Allerdings bleiben letztlich noch die eher als irrelevant eingestuften Mutationen im Konstrukt.

Dabei zeigt der Ausgangsvektor wie bereits beschrieben geringe Doppelbanden, die jedoch keine Relevanz haben sollten sowie etwa 60 fehlende Nukleotide vor dem Promotor und eine kleine Punktmutation, die aber ebenfalls als nicht relevant eingestuft wurde. Fraglich ist, ob diese Veränderungen im Ausgangsvektor für die beschriebenen Probleme in der Regulation und der Expression verantwortlich sein können. Denkbar sind, bei anfänglichen Linearisierungsproblemen im Rahmen der Restriktionskontrollverdaue, dass sich durch die fehlenden Nukleotide oder auch durch Doppelsequenzen manche Schnittstellen nicht mehr erkannt werden bzw. nicht mehr vorhanden sind. Ob dies allerdings Einfluss auf die Regulationskapazität haben könnte, ist eher unwahrscheinlich, zumal eine Expression und auch die Regulation ja trotzdem nachweisbar sind.

Auch die im pShuttleCetuximab beschriebenen Veränderungen in der Sequenz zeigen, soweit beurteilbar, keine Relevanz. Man erkennt im weiterverwendeten Klon 3 (pShuttleCetuximab) lediglich eine kurze Doppelsequenz sowie als Variabilität beschriebene Deletion von drei Aminosäuren im Übergang zwischen FAB-Fragment und dem restlichen Antikörper. Allerdings wurde die Doppelsequenz im Bereich des packaging signal identifiziert, so dass hier eventuell ein Grund für die unterdurchschnittliche Infizierbarkeit der Zelllinien zu suchen ist.

Nach intensiver Recherche und Besprechungen wurden kleine Mutationen im Rahmen von Polymorphismen gesehen, da häufig in den betroffenen Regionen keine Klonierungsarbeiten unsererseits erfolgten. Da eventuelle Probleme bei der Klonierung ebenfalls nicht ausgeschlossen werden können, sollten sowohl weitere Sequenzierungen als ggf. auch die Umklonierung des dann humanisierten Antikörpers in das kommerzielle AdEasy-System erfolgen, um viele Klonierungsschritte zu vermeiden.

Eignung des therapeutischen Gens - Cetuximab

Als therapeutisches Gen in der Gentherapie wurden in den letzten Jahren verschiedenste Substanzen in vivo als auch in vitro ausprobiert. Neben onkologischen Erkrankungen, sind vor allem auch Stoffwechselerkrankungen (zum Beispiel Diabetes mellitus), Autoimmundefekte (zum Beispiel rheumatoide Arthritis) und auch kardiovaskuläre Erkrankungen (zum Beispiel Herzinsuffizienz) immer mehr von der aktuellen Forschung fokussiert worden, da sie ein enormes Potential in der Verwendung und entsprechenden Nutzen für die Menschheit haben.

In der vorliegenden Dissertation zeigt sich ein weiteres Beispiel für die Verwendung bekannter und klinisch relevanter Therapieoptionen onkologischer Medikamente im Rahmen einer anderen Anwendung, die eventuell neue Wege aufzeigen soll, die eine Verringerung der meist beträchtlichen Nebenwirkungen onkologischer Therapien bei verbesserter Wirksamkeit als Ziel hat. Dazu wird seit vielen Jahren vorwiegend Gentransfer mittels viraler Vektoren eingesetzt. Durch aktuell noch bestehende „Sicherheitsprobleme“ in der Anwendung beim Menschen, werden auch andere Vektorsysteme erneut in Betracht gezogen. Dabei liegt ein weiterer Fokus auch auf bakteriellen (anaeroben) Vektoren wie Salmonellen oder Clostridien, die zum Teil auch in der Lage sind, nekrotisches/hypoxisches Gewebe zu infiltrieren bei zumeist sehr einfacher Anwendung ohne relevante Pathologien, aber auch auf synthetisch hergestellten Varianten aus Liposomen und Polymeren, die allerdings bisher noch nicht den gewünschten Durchbruch in der Effizienz, insbesondere in der Genexpression und beim Gentransport zeigten. Durch die vielen verschiedenen Modalitäten an Krebserkrankungen, Vor- und Nachteile der einzelnen Vektorsysteme und Medikamente wird klar, dass es wahrscheinlich (vorerst) kein „Allround“-Vektor geben wird, der alle Vorteile vereint und die Nachteile ausgemerzt hat.

Dennoch zeigen viele Ansätze, dass es nicht nur auf dem Gebiet der Vektoren, sondern auch im Bereich der Regulation dieser Vektoren und der medikamentösen Therapie weitere Fortschritte gibt und geben wird. Eine Variante der neueren Therapien, die in den

letzten Jahren bereits zum Standard im Bereich des metastasierten kolorektalen Karzinoms geworden ist, ist die Antikörper-Therapie mit Cetuximab.

Dieser EGFR-Antikörper wurde bereits in vielen klinischen Studien und verschiedensten Kombinationen getestet und erforscht. Dabei ist die Wirksamkeit von mehreren Faktoren, die immer detaillierter erforscht werden, abhängig. Durch Hinzunahme von anti-EGFR AK (Cetuximab) zu einer Chemotherapie zeigt sich eine relevante Steigerung der Effektivität besonders auf ORR, PFS und OS bezogen. Cetuximab sollte jedoch erst nach erfolgter Analyse des all-RAS-Wildtyps-Status im Tumor gegeben werden. Auch zeigen sich Besonderheiten bei der Lokalisation des KRK. Es konnte eine vorrangige Effektivität bei linksseitigen kolorektalen Tumoren (ab linker Flexur) beobachtet werden. Dies konnte in mehreren retrospektiven großen Analysen mit Fokus auf wtRAS-Malignome in der Erstlinientherapie bestätigt werden. Insbesondere war erkennbar, dass Patienten unter Hinzunahme von Cetuximab zur Standardkombinationstherapie bei linksseitigem Primärtumor enorm profitieren in Hinblick auf das Gesamtüberleben vergleichend zur Kombination alleine oder auch gegenüber der Standardtherapiekombination unter Hinzunahme von Bevacizumab. Bemerkenswert ist dabei tatsächlich die Relevanz der Lokalisation: Patienten mit einem eher rechts gelegenen KRK scheinen diesen Vorteil nicht zu haben (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019).

Die Analyse des Mutationsstatus des RAS sollte zuvor jedoch entweder am Primärtumorgewebe oder an Metastasen erfolgen. Unter Umständen kann man aber aus im Blut zirkulierender Tumor-DNA den Mutationsstatus des RAS auch ohne Gewebegewinnung ermitteln, falls dies nicht möglich ist (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019).

Entsprechend erscheint es sinnvoll allen Patienten eine möglichst effektive Erstlinientherapie anzubieten und ggf. auch neue Kombinationen „auszuprobieren“. Allerdings haben sich die Therapiemöglichkeiten durch die monoklonalen Antikörper derart verändert, dass die Handhabung, alle möglichen Medikamente der Therapie nach einander einfach auszuprobieren, nur durch ältere Beiträge (FOCUS, CAIRO) aus der „Vor-Antikörper-Ära“ unterstützt wurde. Hier lagen die Überlebenszeiten aber auch noch deutlich unter 20 Monaten, was sich am Ehesten auf beschränkte bzw. limitierte Therapieoptionen zurückführen lässt. Entsprechend spielen die genannten Forschungsergebnisse für die aktuelle Therapie nur noch eine untergeordnete Rolle (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019).

In der großen randomisierten Phase III Studie (CRYSTAL) konnte eine Verlängerung des medianen Überlebens um 8,2 Monate (20,2 auf 28,4 Monate, HR 0,69, p=0,0024) nach Hinzunahme von Cetuximab zu einem FOLFIRI-Schema bei wt-RAS-Patienten gesehen werden. Diese Ergebnisse konnten auch in der PRIME-Studie festgestellt werden. Auch zeigen die OPUS und die FIRE-3 Studie ähnliche Tendenzen, allerdings nicht signifikant

(Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019, S.209).

Die Kehrseite der Medaille sind die typischen Nebenwirkungen der anti-EGFR Therapie. Egal ob Erst-, Zweit- oder Drittlinientherapie, ist das akneähnliche Exanthem, welches z.B. in einer Gesamthäufigkeit von 81,2% in der EPIC-Studie in deutlicher Grad 3-4 Ausprägung und einer Inzidenz von 8,2 % auftrat, ein oft belastender Faktor. Es wird auch unter Chemotherapie eine Eskalation der Toxizität z. B. in Form einer Diarrhoe (28,4 % vs 15,7 %) beobachtet (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) et al., 2019, S. 218-219). Wäre eine intratumorale Gabe in der hier gezeigten Form mittels Vektors praktikabel, könnte dies einen Meilenstein in der Reduktion der Nebenwirkung und Steigerung der Wirkung bedeuten.

Aber es gibt trotz überwiegend positiver Studienergebnisse auch kritische Stimmen und auch Studien, die den signifikanten Überlebensvorteil der Patienten nicht darstellen konnten. Es stellt sich daher die Frage, warum es in einigen Studien positive und in anderen eher negative bis überhaupt keine Effekte gibt. Es wird sogar beschrieben, dass Cetuximab komplett inaktiv in verschiedenen Zelllinien-Models war, darunter auch HT29, HCT 116 und LOVO. Dabei sei weder eine detektierbare Inhibition des Tumorwachstums noch ein langsamerer Verlauf erkennbar gewesen. Alle diese Zellen exprimieren den EGFR auf ihrer Oberfläche deutlich vermehrt, so dass eine Korrelation zwischen der EGFR-Überexpression bei Malignität und dem Ansprechen auf eine Antikörpertherapie mit Cetuximab in Frage gestellt wird (Wild et al., 2006). Dies würde sich zum Teil mit den hier vorgestellten Ergebnissen bzgl. der eher mäßigen Expression des Antikörpers decken, wobei ein konkreter Ausschluss anderer Ursachen in dieser Arbeit nicht geliefert werden kann. Allerdings scheinen diese Ergebnisse bereits in anderen Studien auffällig gewesen zu sein, was eine intensivierete Grundlagenforschung in einer anderen Dissertation oder Studie nach sich ziehen sollte. Auch klinisch scheint dieses Phänomen eine Rolle zu spielen und die Ansprechraten, trotz nachgewiesenem KRAS Status und EGFR-Überexpression des Tumors, zu beeinflussen und bei Monotherapie mit Cetuximab daher vergleichsweise geringe Ansprechraten bei 11% beobachtet zu werden (Wild et al., 2006). Die Vermutung, dass andere den EGFR betreffende Komponenten für die Ansprechrate verantwortlich sind, werden beschrieben und zum Beispiel im Rahmen der Aktivierung der EGFR-Kaskade und der Dynamik dessen vermutet (Wild et al., 2006). Auffällig sind dann jedoch in der Literatur beschriebene Fälle, bei denen ein Ansprechen von Cetuximab ohne den immunhistochemischen Nachweis von EGFR gezeigt werden konnte (Chung et al., 2005). Die 2015 veröffentlichte Meta-Analyse von Li et al., bei der insgesamt acht randomisiert kontrollierte Studien mit insgesamt 6780 Patienten untersucht wurde, zeigt deutlich, dass die Kombination Cetuximab/Irinotecanhaltige-Chemotherapie eine deutliche, um nicht zu sagen signifikante Verbesserung der progressionsfreien Überlebenzeit sowie auch des Überlebens insgesamt bei unauffälligem KRAS-Status bringt (X.-X. Li et al., 2015). Dies konnte nach der Analyse von der OPUS und CRYSTAL-Studie durch Bokemeyer et al. ebenfalls bestätigt werden (X.-X. Li et al., 2015; Bokemeyer et al., 2012). In einer anderen Meta-Analyse ergeben sich jedoch Hinweise, dass die Kombination aus Cetuximab und Oxaliplatin-haltigen Chemotherapien keinen Nutzen bringt (Zhou et al., 2012). Dennoch

zeigen die meisten Studien einen Zusammenhang zwischen dem KRAS-Status und der Ansprechrate des Medikaments, so dass KRAS als prädiktiver Wert auch in der S3-Leitlinie gilt. Dennoch gibt es auch Studien, die ein Ansprechen des anti-EGFR-Antikörpers trotz gewisser Mutationen des KRAS nachweisen konnten, wobei es innerhalb der Mutationen Unterschiede zu geben scheint. Es ist daher anzunehmen, dass sich auf diesem Gebiet noch Potenzial zur Erforschung der Zusammenhänge sowie zur vermehrten Anwendung monoklonaler Antikörper in der Krebs-Therapie des mKRR bietet (stellvertretend J. Chen et al., 2012; M. C. Chen et al., 2013) Man kann daher sagen, dass ein Cetuximab-produzierender Virus lokal appliziert einige Vorteile mit sich bringt. Der äußerst unangenehme und limitierende Hautausschlag der Patienten, der durch die Anwendung des Cetuximab verursacht wird, könnte reduziert oder sogar ganz vermieden werden. Weitere systemische Nebenwirkungen der Medikamentenapplikation könnte ebenfalls auf ein Minimum reduziert werden. Cetuximab als EGFR-Antikörper stellt daher zumindest eine Option dar, die eine selbstlimitierende und eher nebenwirkungsärmere Variante durch die vorgesehene lokale Anwendung im Rahmen einer Koloskopie aufzeigt. Aufgrund der Größe des Transgens kann die vektorvermittelte Anwendung bevorzugt werden. Dies stellt nicht nur eine nebenwirkungsarme Form der Anwendung dar, sondern auch eine einmalige und für den Patienten weniger belastende Form der Anwendung, die durch den adenoviralen Vektor und die Immunantwort des Wirts sogar selbstlimitierend ist, jedoch auch durch das tetrazyklinregulierbare System gesteuert werden kann. Patienten in diesen Stadien sollten neben der erfolgreichen Therapieoption auch besonders schonende und die Lebensqualität steigernde Therapien erhalten, statt eine starr zyklusgebundenen und mit vielen Krankenhausaufenthalten verbundenen Variante durchzuhalten.

Es sollte jedoch auch die Klonierung anderer oder kombinierter Wirkstoffe in weiteren Studien überlegt werden. Eventuell kommt diese Therapieoption auch als schonende Variante der neoadjuvanten Therapie oder bereits in früheren Stadien zum Downstaging vor Operationen in Frage, hier seien stellvertretend PD-1 Inhibitoren genannt. All diese Möglichkeiten sollten in die weitere Forschung einfließen, um die Überlebenszeit der Patienten weiter zu steigern und die Lebensqualität während der Therapie so hoch wie möglich zu belassen.

Ausblick

Wenn man die aktuellen Veröffentlichungen in diesem Themenbereich ansieht, gewinnt man den Eindruck einer „Aufbruchstimmung“, die mutig neue Wege finden möchte. Insbesondere im Bereich der Vektoren werden neue Wege beschritten, in dem auch Bakterien wie Salmonellen oder Clostridien in Betracht gezogen werden. Ältere Verfahren werden wiederentdeckt und mutig kombiniert bzw. weiterentwickelt.

Dennoch scheint der Durchbruch, einen „perfekten“ Vektor zu finden noch nicht greifbar. Bis dahin sollte weiter an den „Basics“ geforscht werden, da diese, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, noch lange nicht langweilig werden, sondern essentiell bleiben. Dabei geht es in erster Linie um Sicherheit für den Patienten bei der Erfindung neuer (alter) Wege.

Dabei sollte die Identifizierung der therapieoffenen Mutationen im KRAS weiter vorangetrieben werden, um möglichst vielen Patienten eine Therapie zu ermöglichen.

Anschließend an diese Arbeit wäre die Weiterentwicklung und Überprüfung der Cetuximab-Kassette und die intensivere Erforschung des Sättigungseffekts des Tet-Systems sinnvoll.

Um die Fortführung des vielversprechenden Ansatzes auch in vivo Studien zu gewährleisten, sollte die Umklonierung der jetzigen Kassette hin zu einen humanisierten Antikörper unter Verwendung des kommerziellen AdEasy-Systems erfolgen, um so wenige Zwischenschritte wie möglich zu durchlaufen, um Fehler zu vermeiden und die Sache mehr praktikabel zu gestalten.

Zukunftsträchtig könnte auch die Verwendung eines zweiten Therapeutikums (Chemotherapeutika oder Substanzen zur Besserung des Wohlbefindens/Symptombehandlung) in Kombination mit Cetuximab in nur einem adenoviralen Vektor der 3. Generation sein. Oder sogar eine Mehrfachkombination wäre denkbar. Die Steuerbarkeit des Tet-Systems wurde seit dem Beginn dieser Dissertation enorm weiterentwickelt, so dass es durchaus bei ausreichender Regulationskapazität geeignet erscheint.

Dennoch wird auch hierzu noch Zeit nötig sein, um die vielversprechende und wenig in die Lebensqualität eingreifende Methode anzuwenden, da auch gutless-Vektoren nicht nur Vorteile zeigen. Ihre lange Expression des Wunschgens, welches bis zu 36kb groß sein darf, bei im Vergleich reduzierter Toxizität/Immunantwort macht sie zu einem besonders interessanten Target der Forschung.

Dennoch zeigen sich auch hier zum Teil lebensbedrohliche Immunreaktionen, die bisher noch nicht vollständig verstanden sind, die eine Anwendung limitieren (Józkowicz & Dulak, 2005). Es bleibt abzuwarten, in wie weit diese Vektoren oder auch die Verwendung anderer Vektorsysteme dem Idealbild nahekommen, um im klinischen Alltag eine Rolle zu spielen.

Zusammenfassung

Deutsche Version

Um Therapieoptionen für das kolorektale Karzinom weiterzuentwickeln und neue Therapieansätze zu untersuchen, ist das Verständnis der Interaktion aller beteiligten Komponenten von größter Wichtigkeit. In den letzten zwei Dekaden konnte das Überleben der Patienten deutlich gesteigert werden und auch die Lebensqualität hat sich verbessert. Dennoch erscheint der Wunsch nach weniger belastenden Therapieoptionen und weitere Verbesserung der Lebensqualität unter Steigerung des progressionsfreien Überlebens weiterhin vorhanden und umso deutlicher, desto mehr erreicht werden konnte.

Während dieser praktischen Arbeit wurde ein rekombinanter adenoviraler Vektor hergestellt, der doozyklingesteuert das Transgen in bestimmten Tumorzellen, insbesondere Kolonkarzinomzelllinien, exprimiert. Als Transgen wurde der zugelassene Antikörper zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms Cetuximab verwendet, der durch Integration einer autoregulativen Expressionskassette in die E1 Region replikationsdefizienter Adenoviren einen neuen gentherapeutischen Ansatz zur Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor vom IgG1-Typ darstellen könnte.

Es zeigte sich die Expression des Transgens auch im Vergleich mit anderen Konstrukten und Erbitux in ELISA-Versuchen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich die Tet-Regulation unter Hinzufügen von Doozyklin zwar darstellt, allerdings der Verdacht nahe liegt, dass das System „überlastbar“ ist und sich ein Ceiling-Effekt abzeichnet.

Ähnliche Ergebnisse konnten im Westernblotverfahren eruiert werden. Dabei zeigte sich wiederholt jedoch eine andere Laufhöhe der schweren Kette des Konstrukts im SDS-Page, was im Vergleich mit anderen Konstrukten ohne 2A-Peptid/Furinschnittstelle nicht vorkam. Da sich die Laufhöhe gleichmäßig erhöht bei allen Versuchen darstellen ließ und ausschließlich das Konstrukt mit dem 2A-Peptid/Furinschnittstelle betroffen war, wurde die Veränderung im Western Blot auf die zusätzlichen Aminosäuren durch die nicht prozessierte Schnittstelle zurückgeführt.

Es zeigen sich jedoch auch Sequenzveränderungen im adenoviralen Vektor, die insgesamt jedoch keinen Einfluss auf die Funktion des Konstrukts haben sollten. Zum Teil kamen diese Veränderungen als Normvarianten oder Polymorphismen im Vergleich mit BLAST-Datenbanken vor. Dennoch kann in dieser Arbeit ein Einfluss der Mutationen auf die Funktionalität, Regulationseffizienz oder Infizierbarkeit von Tumorzellen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Allerdings konnten bereits in der Literatur ähnliche Fälle beobachtet werden. Die Infizierbarkeit in Abhängigkeit des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors und Regulationsmöglichkeit in den verschiedenen Zelllinien wurden bereits beschrieben (Hidaka et al., 1999; Howe et al., 1995). So beschrieben Brüning und Runnebaum ebenfalls, dass eine hohe Dichte des CA-Rezeptors die Infektion durch eine homophile

Assoziation des Rezeptors durchaus erschweren kann. Er bezieht sich darin zwar zumeist auf Ovarialkarzinom-Zellen, dennoch scheint eine Parallele durchaus vorstellbar (Brüning & Runnebaum, 2004).

Auch äußere Umstände, wie zum Beispiel die verbreitete Antibiotikagabe in der Tierzucht und die daraus resultierende Belastung der Medien in der Zellkulturarbeit kommen als mögliche Störfaktoren der Regulation im Tet-System in Frage. Diese These klingt zunächst abwegig, sollte jedoch bedacht werden.

Neue Vektorsysteme, verbesserte Regulationssysteme und auch Kombinationen verschiedenster Systeme untereinander sowie die Fortführung der Grundlagenforschung in allen Bereichen, insbesondere auch der Pharmakologie werden weiterhin Bestandteil der künftigen Forschung sein und irgendwann wird der Durchbruch auf diesem Gebiet einen minimalinvasiven und nebenwirkungsarmen sowie effizienten und gleichzeitig individuellen Therapieweg aufzeigen, der nicht nur beim kolorektalen Karzinom, sondern auch bei sämtlichen anderen Erkrankungen eingesetzt werden kann.

Summary

For the development of treatment options for colorectal carcinoma and to investigate new therapeutic approaches, the understanding of the interaction between all components is very important.

The survival of patients was significantly increased and also the quality of life has improved in the last two decades.

Nevertheless, the desire for less burdensome treatment options and further improving the quality of life appears under increasing progression free survival still exists and grows up with the raising therapy success.

In this practical work, a recombinant adenoviral vector was constructed, which expressed under doxycycline control the transgene in certain tumor cells, especially colon carcinoma cell lines.

Cetuximab, an approved antibody for the metastasized colorectal carcinoma, was used as a transgene. This antibody integrates an auto regulative expression cassettes into the E1 region of replication deficient Adenoviruses and could be a new gen therapeutic option for antibody therapy against EGF receptors.

The expression of the transgene also showed up in the comparing with other constructs and Erbitux in ELISA- Experiments. However, it could be observed, that the Tet-regulation showed up by addition of Doxycyclin but it seems possible that the system is able to become overloaded. Also the appearance of the Ceiling – Effect is possible

Similar results showed up in the Western blot method. In this situation, a different size of the HC of the construct in SDS-Page showed up compared with other constructs without a 2A-Peptid/Furininterface, with no size different.

Because of the similar representation concerning the size in every performed experiment, the differences in the Western blot are traced back to the additional amino acids by the not-processed Interface.

However, there are changes of the sequence at the adenoviral vector without any impact on the function of the construct. Partially, those deviations came up as normal variant or polymorphism compared to BLAST- databases.

Nevertheless, this work can't completely exclude an influence of mutations for functionality, regulation efficiency or infectivity of tumor cells.

Similar results can be found in literature. The infectivity in relation of the CA-Receptor and the possibilities of regulation in different cell lines were already described. (Hidaka et al. 1999, Howe et al. 1995,).

Runnebaum described influence of a high CA-Receptor concentration by complicate the infection by a homophile association of the receptor. This example refers to ovarial carcinoma cells but commonalities seem to be possible.

Also external circumstances like common use of antibiotics in the animal breeding and the resulting pressure of the media in the cell culture work are possible disturbing factors in the regulation of the Tet-System.

New vector systems, improved regulation systems and the combination of different systems among each other and at least the improvement of fundamental research, especially pharmacology, will keep being an important part of future research.

Someday, a breakthrough in this field will result in a minimal invasive, more efficient and individual therapy with minimal side effects, which can also get used in other diseases than colorectal carcinoma.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Teilvolumen pro Gesamtvolumen (volume per volume)
(w/v)	Gewicht pro Gesamtvolumen (weight per volume)
°C	Grad Celsius
5-FU/FA	Kombination aus 5-Fluorouracil und Folinsäure
Abb.	Abbildung
Ad2, Ad5	Adenovirus Typ 2 und 5
ADA	Adenosindesaminasemangelkrankheit
ADP	Adenovirus Death Protein
AK	Antikörper
AKT	= Proteinkinase B, Serin/Threoninkinasen-Familie, PI3K/Akt-Signalweg
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle, Adenomatosis Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bid.	bidestilliert
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium

CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9 ist ein Glykoprotein (Zellmembran) und Tumormarker
ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAR	Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor
CD8/CD4	bezogen auf cytotoxische T-Zellen, cluster of differentiation, fungiert als Co-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen, Tumormarker, Eiweiß aus Darmschleimhautzellen
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalie Virus
d.h.	das heißt
DCC	deleted in colon carcinoma
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (early region 1, 2, 3, 4)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF (R)	epidermalen Wachstumsfaktor (Rezeptor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular-signal Regulated Kinase, gehört zu den MAP-Kinasen
et al.	et altera
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	antigenbindendes Fragment
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FFU	Fluorescents forming units
FKS	fötales Kälberserum
FOLFIRI	Chemotherapieschema bestehend aus <u>F</u> olinsäure, 5- <u>F</u> luorouracil, <u>I</u> rinotecan
FOLFOX	Chemotherapieschema bestehend aus <u>F</u> olinsäure, 5- <u>F</u> luorouracil, <u>O</u> xaliplatin
FOLFOXIRI	Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, Irinotecan (Chemotherapieschema)
g	Gramm
gFOBT	Guajakbasierte Stuhlbluttest auf occultes Blut, Screeningverfahren
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glukose
GTP	Guanosintriphosphat
HAd-5	humaner Adenovirus Serotyp 5
HAMA	humane-Anti-Maus-Antikörper-Reaktion
HCl	Salzsäure
HEK	humane embryonale Niere (human embryonic kidney)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HGDMEM	High Glucose Dulbecco´s Modified Eagle Medium

His	Histidin
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, Lynch-Syndrom
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
hu	human
i.S	im Sinne
IFN- γ	Interferon-gamma
iFOT	Quantitative immunologische Tests zum Nachweis von nicht sichtbarem Blut im Stuhl, ab 4/2016 Screeningverfahren
IGeL	individuelle Gesundheitsleistung
IgG	Immunglobulin der G-Klasse
IL	Interleukin
ITR	inverted terminal repeats
JAK	Abkürzung für Januskinase, gehören zu den Proteintyrosinkinasen
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KRK	kolorektales Karzinom
l	Liter
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 (late region 1, 2, 3, 4, 5)
LB	Luria-Bertani
luc	Luciferase kodierendes Gen
M2-PK	Pyruvatkinase M2, Enzym ausschließlich des fötalem und Tumorgewebe

MAP-K	mitogen-activated protein-Kinase
mcs	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MEK	Tyrosin/Threonin-spezifische Kinase, auch bekannt als MAP-Kinase-Kinase
MHC	major histocompatibility complex
min	Minimal
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
moi	Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (multiplicity of infection)
mu	map units, Kartierungseinheiten
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ β	nuclear factor- κ β (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
o.g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
ORR	Objective response rate: Ansprechraten
p. i.	Nach der Infektion (post infection)
p.o.	per os
p53	humaner Tumorsuppressor, Transkriptionsfaktor, "Wächter des Genoms"

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFS	progressionfree survival: progressionsfreies Überleben
pH	negativer dekadischer Log. der H ⁺ -Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase, katalysiert Phosphorylierungen der 3'-OH Position am Inositolring
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
RAF	rat fibrosarcoma, Proteinkinase der Ras-Raf-MAP-Kinase-Signaltransduktion
RAS	Rat sarcoma, Protoonkogen, codiert für ein monomeres G-Protein
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
S.	Seite
s	Sekunde
S2	Sicherheitsstufe 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STAT	signal transducers and activators of transcribtion, Transkriptionsfaktor
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEA	Triethylamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tet-OFF	Tetracyclin-supprimierbares System mit Verwendung des tTA
Tet-ON	Tetracyclin-induzierbares System mit Verwendung des rtTA
TetA	Tetracyclin-Resistenzprotein
tetO7	Operatorsequenzen
TetR	Tetracyclin-abhängiger Repressor
TGF	Transforming-Growth-Factor
TH-Zellen	T-Helferzellen
TK	Thymidinkinase
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
TNM-Klassifikation	Einteilung maligner Tumoren, T= Tumor, N= Nodus, M= Metastasen
TPBS	Tween-PBS
TPBS	Tween 20-PBS
TRE	Tetrazyklin-responsibles Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Aktivitätseinheit von Enzymen (unit)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UKE	Universtitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol.	Volumeneinheit

VP16	Herpes Simplex Virus stammenden Proteins
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μm	Mikrometer

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1: Verteilung der Lokalisation kolorektaler Karzinome.....	12
Abbildung 2: Anteil der externen Risikofaktoren an der Krankheitsentstehung für ausgewählte Karzinome.....	13
Abbildung 3: Früherkennung von Darmkrebs: Das gehört zum gesetzlichen Früherkennungsprogramm in Deutschland. © Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum.....	14
Abbildung 4: Schema der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein	16
Abbildung 5: Schematische Signalkaskaden EGFR.....	24
Abbildung 6: Aufbau des Adenovirus - schematisch.....	28
Abbildung 7: Tet-Off-System schematisch.....	32
Abbildung 8: Tet-On System schematisch.....	33
Abbildung 9: Vektor A mit mutierter variabler leichter und schwerer Kette; IgG1 ohne His/Stop mit Fu/2A entnommen.....	54
Abbildung 10: Vektor B mit His/Stop variable leichte Kette ohne Mutation (vL) entnommen.....	54
Abbildung 11: Ursprünglicher Klonierungsvektor mit IRES und mutierter variabler leichter Kette	54
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Inserts	55
Abbildung 13: Kolonie PCR 542/3-5 und 1-3.....	56
Abbildung 14: Funktionsnachweis mittels ELISA von Klon 3-5.....	57
Abbildung 15: Cotransfektion in pBHG10 schematisch, Quelle: Retreat 2009 A.Block/S.Seeger	57
Abbildung 16: Pst I Verdau von CetuximabpShuttle, Klon 3 enthält Insert ==> weiterverarbeitet.....	59
Abbildung 17: Restriktionsverdauung Klon 3: BstZ17I linearisiert, XbaI und HindIII zeigen alle erwarteten Banden.....	60

Abbildung 18: Virustitration Klon4 ca. $1,9 \times 10^6$ FFU/ μ l Total (ca. 10 ml): $1,9 \times 10^{10}$ FFU	63
Abbildung 19: IWB Klon3 Dox-reguliert	64
Abbildung 20: IWB Klon3, 100 μ g Lysat, Anti human HRP A80 104p AK.....	64
Abbildung 21: IWB Ad5 Cetuximab 2A im Vergleich.....	65
Abbildung 22: ELISA Klon3 und 582 Dox-reguliert.....	66
Abbildung 23: Wachstumsassay Lovo	68
Abbildung 24: Wachstumassay A431	68

Tabellen

Tabelle 1: Primer zur Sequenzierung und PCR.....	35
Tabelle 2: Vektoren und Vergleichskonstrukte	36
Tabelle 3: Rekombinante Plasmide	36
Tabelle 4: Antikörper	37
Tabelle 5: Kommerzielle Systeme.....	38
Tabelle 6: Geräte	39
Tabelle 7: Infizierbarkeit von Zelllinien.....	67

Literaturverzeichnis

- Addison, C. L., Hitt, M., Kunsken, D. & Graham, F. L. (1997). Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. *Journal of General Virology*, 78(7), 1653–1661.
- Adenoviridae. (2009, Mai 3). In Wikipedia- freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/wiki/Adenoviridae>
- Agarose-Gelelektrophorese (Stand 22.01.2020). (2003, Februar 18). In Wikipedia-Freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Agarose-Gelelektrophorese&oldid=177130606>
- Agha-Mohammadi, S., Alvarez-Vallina, L., Ashworth, L. J. & Hawkins, R. E. (1997). Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promotor following removal of tetracycline analogues. *Gene Therapy*, 4(9), 993–997.
- Allgemeine Onkologie - Wissen für Mediziner (Begriffe: Neoplasie, Krebs). (o. J.). www.amboss.com. Abgerufen 19. August 2019, von https://www.amboss.com/de/wissen/Allgemeine_Onkologie
- Alonso-Padilla, J., Papp, T., Kaján, G. L., Benkő, M., Havenga, M., Lemckert, A., Harrach, B. & Baker, A. H. (2016). Development of Novel Adenoviral Vectors to Overcome Challenges Observed With HAdV-5-based Constructs. *Molecular Therapy*, 24(1), 6–16. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.194>
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Anderson, W. F., Blaese, R. M. & Culver, K. (1990). Points to Consider Response with Clinical Protocol, July 6, 1990. *Human Gene Therapy*, 1(3), 331–362. <https://doi.org/10.1089/hum.1990.1.3-331>
- Andreason, G. L. & Evans, G. A. (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *BioTechniques*, 6(7), 650–660.
- ATCC, American Type Culture Collection. (2012, April 1). Thawing, Propagating, and Cryopreservation Protocoll, NCB-PBCF-CCL229 (Lovo), Colorectal Adenocarcinoma, (ATCCR CCL 229TM). <https://physics.cancer.gov>. https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/colorectal/NCI-PBCF-CCL229_LoVo_SOP-508.pdf

- Beck, K. F., Stathopoulos, I., Berninger, M. G. & Schweizer, M. (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *BioTechniques*, 14, 375.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8457340/>
- Benihoud, K., Yeh, P. & Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 440–447.
- Block, A., Puls, F., Müller, J., Milasinovic, D., Igelmann, D., Schäfer, P., Kupfermann, N., Schmoldt, A., Ameis, D. & Greten, H. (2002). Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system. *The Journal of Gene Medicine*, 5(3), 190–200.
<https://doi.org/10.1002/jgm.334>
- Bokemeyer, C., Cutsem, E. V., Rougier, P., Ciardiello, F., Heeger, S., Schlichting, M., Celik, I. & Köhne, C.-H. (2012). Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: Pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European Journal of Cancer*, 48(10), 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.057>
- Bradford-Test (Stand 23.01.2020). (2005, November 26). In Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/wiki/Bradford-Test>
- Bramson, J. L., Hitt, M., Addison, C. L., Muller, W. J., Gaudie, J. & Graham, F. L. (1996). Direct Intratumoral Injection of an Adenovirus Expressing Interleukin-12 Induces Regression and Long-Lasting Immunity That Is Associated with Highly Localized Expression of Interleukin-12. *Human Gene Therapy*, 7(16), 1995–2002.
<https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.16-1995>
- Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. & Brattain, D. E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research*, 41(5), 1751–1756. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7214343/>
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. (o. J.). Staging & Grading | Darmkrebs.de, Quelle: TNM Classification of Malignant Tumours, Eight Edition. www.darmkrebs.de. Abgerufen 20. August 2019, von <https://www.darmkrebs.de/frueherkennung-diagnose/stadieneinteilung/staging-grading>
- Brüning, A. & Runnebaum, I. B. (2004). The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration. *Experimental Cell Research*, 298(2), 624–631.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.05.001>
- Bullock, W. O., Fernandez-Alvira, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactoside selection. *Biotechniques*, . <https://www.scienceopen.com/document?vid=bc63b6ac-0ed0-4380-b7a1-e341c78ddfbf>

- Buvoli, M., Langer, S. J., Bialik, S. & Leinwand, L. A. (2002). Potential limitations of transcription terminators used as transgene insulators in adenoviral vectors. *Gene Therapy*, 9(3), 227–231. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301640>
- Cetuximab. (2019, November 9). In Wikipedia- die freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/wiki/Cetuximab>
- Chen, H., Wang, D., Xia, R., Mao, Q. & Xia, H. (2015). A novel adenoviral vector carrying an all-in-one Tet-On system with an autoregulatory loop for tight, inducible transgene expression. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0121-4>
- Chen, J., Ye, Y., Sun, H. & Shi, G. (2012). Association between KRAS codon 13 mutations and clinical response to anti-EGFR treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from a meta-analysis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(1), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2005-9>
- Chen, M. C., Chiang, F. F. & Wang, H. M. (2013). Cetuximab plus chemotherapy as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Effect of KRAS mutation on treatment efficacy in Taiwanese patients. *Neoplasma*, 60(05), 561–567. https://doi.org/10.4149/neo_2013_073
- Chen, W., Li, H., Shi, D., Liu, Z. & Yuan, W. (2016). Microneedles As a Delivery System for Gene Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 7(137), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00137>
- Christmann, D., Yiallourous, M. & Graeven (beratend), U. (2017, Februar 28). Therapie von Darmkrebs (Deutsche Krebsgesellschaft). www.krebsgesellschaft.de. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/darmkrebs/therapie.html>
- Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E., Shah, M., Schwartz, G. K., Tse, A., Hamilton, A., Pan, D., Schrag, D., Schwartz, L., Klimstra, D. S., Fridman, D., Kelsen, D. P. & Saltz, L. B. (2005). Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, 23(9), 1803–1810. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.08.037>
- Ciardello, F. & Ma, B. (2005). EGF-Rezeptorblockade mit monoklonalen Antikörpern und so genannten «small molecules». *Onkologie*, 28(4), 18–24. <https://doi.org/10.1159/000088824>
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. & Van Cutsem, E. (2004). Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(4), 337–345. <https://doi.org/10.1056/nejmoa033025>

- Dannowski, Diplombiologin, H. (Hrsg.). (2004, Juli). Gentransfer in korneale Endothelzellen: nicht-virale und virale Ansätze zur Modulation der Endothelzellfunktion und allogenen Immunreaktion (Dissertation). Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.
<https://edoc.hu-berlin.de/bitstream/handle/18452/15789/Dannowski.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- DocMedicus Verlag GmbH & Co. Gesundheitsportal der Deutschen Gesellschaft für Nährstoffmedizin und Prävention DGNP e.V. (o. J.). Krebsentstehung-Kanzerogenese. www.gesundheits-lexikon.com. Abgerufen 19. August 2019, von <http://www.gesundheits-lexikon.com/Krebs/Krebserkrankungen-uebersicht/Krebsentstehung-Kanzerogenese.html>
- Eck, S. L. & Wilson, J. M. (1996). Gene-based therapy. In Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics (9th Aufl., S. 77–101). McGraw-Hill Professional.
- Eckert, B. & Beck, C. F. (1989). Topology of the Transposon Tn10-encoded Tetracycline Resistance Protein within the Inner Membrane of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11663–11670.
<https://www.jbc.org/content/264/20/11663.full.pdf>
- Eckhardt, A. (2019, September 27). ERBITUX® in China in Kombination mit FOLFOX oder FOLFIRI als Erstlinientherapie für Patienten mit metastasiertem Kolorektalkarzinom vom RAS-Wildtyp zugelassen [Pressemeldung].
<https://www.merckgroup.com/de/news/erbitux-11-approval-in-china-mcrc-27-09-2019.html>
- EGF-Rezeptor. (2019, November 9). In Wikipedia- Die freie Enzyklopädie.
<https://de.wikipedia.org/wiki/EGF-Rezeptor>
- Fang, J., Qian, J.-J., Yi, S., Harding, T. C., Tu, G. H., VanRoey, M. & Jooss, K. (2005). Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nature Biotechnology*, 23(5), 584–590. <https://doi.org/10.1038/nbt1087>
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Fogh, J., Anderson, H. C., Allen, B., Petursson, G., Saunders, E. L. & Dalldorf, G. (1964). Cultivation and Characterization of Cells from a Malignant Lymphoma in an African Child. *Cancer Research*, 3 Part 1(24), 416–431.
https://cancerres.aacrjournals.org/content/24/3_Part_1/416.full-text.pdf
- Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N. & Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 708–710.
<https://doi.org/10.1093/nar/27.2.708>

- Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547–5551. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766–1769. <https://doi.org/10.1126/science.7792603>
- Gräble, M. & Hearing, P. (1992). cis and trans requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. *Journal of Virology*, 66(2), 723–731. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.723-731.1992>
- Graham, F. L., Russell, W. C., Smiley, J. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Harding, T. C., Geddes, B. J., Noel, J. D., Murphy, D. & Uney, J. B. (2002). Tetracycline-Regulated Transgene Expression in Hippocampal Neurons Following Transfection with Adenoviral Vectors. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2620–2623. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062620.x>
- Haug, U., Hundt, S. & Brenner, H. (2008). Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *British Journal of Cancer*, 99(1), 133–135. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604427>
- Heim, A. (2020). Adenovirusinfektionen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 168(6), 514–523. <https://doi.org/10.1007/s00112-020-00909-9>
- Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P. L., Bergelson, J. M., Hackett, N. R., Finberg, R. W., Wickham, T. J., Kovcsdi, I., Roelvink, P. & Crystal, R. G. (1999). CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 103(4), 579–587. <https://doi.org/10.1172/jci5309>
- Holschbach, M. (2013, Dezember 6). Western Blot: Gelelektrophorese für Proteine. www.antikoerper-online.de. <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1224/western-blot-gelelektrophorese-fuer-proteine/>
- Howe, J. R., Skryabin, B. V., Belcher, S. M., Zerillo, C. A. & Schmauss, C. (1995). The Responsiveness of a Tetracycline-sensitive Expression System Differs in Different

- Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 14168–14174.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.14168>
- Józkowicz, A. & Dulak, J. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 589–599.
https://doi.org/10.18388/abp.2005_3419
- Kolonkarzinom | Universitätsklinikum Ulm - Klassifikation und Stadieneinteilung. (o. J.). www.uniklinik-ulm.de. Abgerufen 18. April 2020, von <https://www.uniklinik-ulm.de/comprehensive-cancer-center-ulm-cccu/fuer-patienten-und-angehoerige/krebserkrankungen/kolonkarzinom.html>
- Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T. & Wickham, T. J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(5), 583–589.
[https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(97\)80033-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(97)80033-x)
- Kramer, D. K. (2013, Dezember 6). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). www.antikoerper-online.de. <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>
- Krebs-Info, Fachinformationen Krebs und Komplementäre Onkologie & Prall, S. D. M. (o. J.). Krebsentstehung. www.krebs-info.eu. Abgerufen 20. August 2019, von <https://krebs-info.eu/diagnose-krebs/krebsentstehung>
- Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum. (2016, April 27). Darmkrebs: Risikofaktoren und Vorbeugung. www.krebsinformationsdienst.de. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/risikofaktoren.php>
- Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrums. (2016, April 27). Dick- und Enddarmkrebs – eine Einführung: Anatomie, Entstehung, Häufigkeit. www.krebsinformationsdienst.de. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/was-ist-darmkrebs.php>
- Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum. (o. J.). Wie entsteht Krebs? Wenn aus gesunden Zellen Tumorzellen werden. www.krebsinformationsdienst.de. Abgerufen 19. August 2019, von <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsentstehung.php>
- Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrum. (2019). Darmkrebs-Früherkennung. www.krebsinformationsdienst.de. <https://www.krebsinformationsdienst.de/service/iblatt/iblatt-darmkrebs-frueherkennung>
- Lanier, L. L. (1998). NK CELL RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 359–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.359>

- Lee, Y.-B., Glover, C. P. J., Cosgrave, A. S., Bienemann, A. & Uney, J. B. (2004). Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Experimental Physiology*, 90(1), 33–37. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.028209>
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Deutschen Krebshilfe & Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). (2017). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom (Kurzversion 2.0). https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Kurzversion_2.0.pdf
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Deutschen Krebshilfe & Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). (2019). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom (Version 2.1). https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLl_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf
- Lena, A. M., Giannetti, P., Sporeno, E., Ciliberto, G. & Savino, R. (2005). Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector. *The Journal of Gene Medicine*, 7(8), 1086–1096. <https://doi.org/10.1002/jgm.758>
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J. W., Kussie, P. & Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7(4), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.003>
- Li, X.-X., Liang, L., Huang, L.-Y. & Cai, S.-J. (2015). Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(22), 7022–7035. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.7022>
- Löhr, K. (2003). Der Tumorsuppressor p53 und Adenoviren als Transkriptionsmodulatoren (Dissertation). Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Mikrobiologie und Hygiene der Philipps-Universität Marburg Leiter Herr Prof. Dr. H.-D. Klenk, Fachbereich Chemie. <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2003/0117/pdf/dkl.pdf>
- Luo, J., Deng, Z.-L., Luo, X., Tang, N., Song, W.-X., Chen, J., Sharff, K. A., Luu, H. H., Haydon, R. C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & He, T.-C. (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*, 2(5), 1236–1247. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.135>
- MacGregor, G. R. & Caskey, C. T. (1989). Construction of plasmids that express E.coli β -galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 17(6), 2365. <https://doi.org/10.1093/nar/17.6.2365>

- McConnell, M. J. & Imperiale, M. J. (2004). Biology of Adenovirus and Its Use as a Vector for Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 15(11), 1022–1033.
<https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1022>
- Merck Serono GmbH & Olaniran, P. (2013, Dezember 23). European Commission Approves Updates of Erbitux Metastatic Colorectal Cancer Labeling to Patients With RAS Wild-Type Tumors (23.12.2013), zuletzt geprüft 11. Juli 2016, aktuell nicht mehr verfügbar [Pressemeldung]. <http://www.presseportal.de/nr/6808>
- Mitani, K., Graham, F. L., Caskey, C. T. & Kochanek, S. (1995). Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(9), 3854–3858.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3854>
- Molin, M., Shoshan, M. C., Öhman-Forslund, K., Linder, S. & Akusjärvi, G. (1998). Two Novel Adenovirus Vector Systems Permitting Regulated Protein Expression in Gene Transfer Experiments. *Journal of Virology*, 72(10), 8358–8361.
<https://doi.org/10.1128/jvi.72.10.8358-8361.1998>
- Moser (Leiter Online-Redaktion), G., Dölger, C., Egermeier, K., Endris, J. & Hüttemann, D. (2017, April 7). Capecitabin|Xeloda®|86|2001. *Pharmazeutische Zeitung - Die Zeitschrift der deutschen Apotheker*. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/arzneistoffe/daten/2001/capecitabinxeloda174862001/>
- Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W. & Kimmig, P. (Hrsg.). (2009a). Teil III Spezielle Mikrobiologische Diagnostik 4 Virologie: 36 Humane Adenoviren, 36.1.1 Einteilung [E-Book]. In *Mikrobiologische Diagnostik (2. vollständig überarbeitete Aufl., S. 785)*. Thieme Verlagsgruppe. <https://doi.org/10.1055/b-0034-69329>
- Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W. & Kimmig, P. (2009b). Teil III Spezielle Mikrobiologische Diagnostik 4 Virologie: 36 Humane Adenoviren, 36.1.3 Klinisches Bild. In *Mikrobiologische Diagnostik (2. vollständig überarbeitete Aufl., S. 787–788)*. Thieme Verlagsgruppe. <https://doi.org/10.1055/b-0034-69329>
- Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A. & Graham, F. L. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13565–13570.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13565>
- Polymerase-Kettenreaktion (Stand 19.12.2019). (2001, Mai 12). In *Wikipedia-Die freie Enzyklopädie*. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymerase-Kettenreaktion&oldid=195062681>

- Pox, C. P., Altenhofen, L., Brenner, H., Theilmeier, A., Stillfried, D. V. & Schmiegel, W. (2012). Efficacy of a Nationwide Screening Colonoscopy Program for Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 142(7), 1460-1467.e2.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.022>
- Puls, F. (2004). Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression (Dissertation). Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Quinn, L. A., Moore, G. E., Morgan, R. T. & Woods, L. K. (1979). Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Research*, 39(12), 4914–4924.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/498117/>
- Relph, K. L., Harrington, K. J. & Pandha, H. (2005). Adenoviral Strategies for the Gene Therapy of Cancer. *Seminars in Oncology*, 32(6), 573–582.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2005.09.001>
- Rennel, E. & Gerwins, P. (2002). How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Analytical Biochemistry*, 309(1), 79–84.
[https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00250-6](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00250-6)
- Ring, C. J. A., Blouin, P., Martin, L.-A., Hurst, H. C. & Lemoine, N. R. (1997). Use of transcriptional regulatory elements of the MUC1 and ERBB2 genes to drive tumour-selective expression of a prodrug activating enzyme. *Gene Therapy*, 4(10), 1045–1052. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300510>
- Rosa, B., de Jesus, J. P., de Mello, E. L., Cesar, D. & Correia, M. M. (2015). Effectiveness and safety of monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer treatment: systematic review and meta-analysis. *ecancermedicalscience*, 9, 582.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.582>
- Rothwell, P. M., Wilson, M., Elwin, C.-E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C. P. & Meade, T. W. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*, 376(9754), 1741–1750. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61543-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61543-7)
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. & Ward, T. G. (1953). Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine*, 84(3), 570–573. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>
- Rubin, G. & Spradling, A. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218(4570), 348–353.
<https://doi.org/10.1126/science.6289436>

- Schäferhenrich, D. C. A. (2003). Epidemiologische und molekularbiologische Zusammenhänge der humanen Kolonkarzinogenese (Postgradualstudium Toxikologie und Umweltschutz der Universität Leipzig, Abschlussarbeit 2003). https://doi.dl.unileipzig.de/servlets/MCRFileNodeServlet/PGSToxi_derivate_00000413/166_Schaeferhenrich_Anja_pdf.pdf;jsessionid=53AC24A0F8EDEFCE6324C3A6410B2E5
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R. J., Wu, Y., Koopmans, S. C., Langston, C., Graham, F. L., Beudet, A. L. & Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics*, 18(2), 180–183. <https://doi.org/10.1038/ng0298-180>
- Schmiegel, W., Pox, C., Arnold, D., Porschen, R., Rödel, C. & Reinacher-Schick, A. (2009). Colorectal Carcinoma. *Deutsches Ärzteblatt Online*, 106(51–52), 843–848. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0843>
- Schroy, P. C., Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K. A., Murnane, M. J., Yang, S., O’brein, M. J., Carney, W. P. & Kupchik, H. Z. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer*, 76(2), 201–209. [https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19950715\)76:2%3C201::AID-CNCR2820760207%3E3.0.CO;2-T](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19950715)76:2%3C201::AID-CNCR2820760207%3E3.0.CO;2-T)
- Schwarz, E. (1999). *Adenoviren - Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/adenoviren/1012>
- SDS-PAGE (Stand 24.01.2020). (2004, Mai 4). In Wikipedia, die freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=SDS-PAGE&oldid=194954351>
- Sotelo, M. J., Garcia-Paredes, B., Aguado, C., Sastre, J. & Diaz-Rubio, E. (2014). Role of cetuximab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(15), 4208–4219. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4208>
- Starker, A., Buttman-Schweiger, N., Kraywinkel, K. & Kuhnert, R. (2017). Inanspruchnahme der Darmspiegelung in Deutschland. *Journal of Health Monitoring, Robert Koch Institut*, 2(4), 81–86. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-115>
- Stintzing, S., Heinemann, V., Jung, A., Moosmann, N., Hiddemann, W. & Kirchner, T. (2009). The Treatment of Colorectal Carcinoma With Monoclonal Antibodies - The Importance of KRAS Mutation Analysis and EGFR Status. *Deutsches Ärzteblatt Online*, 106(12), 202–206. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0202>
- Strathdee, C. A., McLeod, M. R. & Hall, J. R. (1999). Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene*, 229(1–2), 21–29. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00045-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00045-1)

- Tannapfel, A., Neid, M., Aust, D. & Baretton, G. (2010). The Origins of Colorectal Carcinoma. *Deutsches Aerzteblatt Online*, 107(43), 760–766.
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0760>
- TET Systems: Kontrollierte Genexpression bei Eukaryonten. (2010, Juli 12). Gesundheitsindustrie BW. <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/fachbeitrag/aktuell/tet-systems-kontrollierte-genexpression-bei-eukaryonten>
- T-Helferzelle, abgerufen 22.08.2019. (2009, Juli 28). In Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/wiki/T-Helferzelle>
- Tol, J. & Punt, C. J. A. (2010). Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: A review. *Clinical Therapeutics*, 32(3), 437–453.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2010.03.012>
- Tonus, C., Sellinger, M., Koss, K. & Neupert, G. (2012). Faecal pyruvate kinase isoenzyme type M2 for colorectal cancer screening: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(30), 4004–4011.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i30.4004>
- Transfektion (Stand 23.01.2020). (2004, Oktober 4). In Wikipedia-Freie Enzyklopädie. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Transfektion&oldid=193746183>
- Tumor. (o. J.). In Duden.de. Abgerufen 19. August 2019, von <https://www.duden.de/node/186615/revision/186651>
- Vincenzi, B., Zoccoli, A., Pantano, F., Venditti, O. & Galluzzo, S. (2010). CETUXIMAB: From Bench to Bedside. *Current Cancer Drug Targets*, 10(1), 80–95.
<https://doi.org/10.2174/156800910790980241>
- Wagener, C. & Müller, O. (2010). *Molekulare Onkologie: 2. Definition und Eigenschaften von Tumoren: Zusammenfassung (3. Aufl.) [E-Book]*. <https://doi.org/10.1055/b-0034-10513>
- Wang, L., Chen, X., Li, W. & Sheng, Z. (2012). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody improves survival outcomes in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 23(2), 155–160.
<https://doi.org/10.1097/cad.0b013e32834c3256>
- Wege, H. & Brümmendorf, T. H. (2010). Replikative Seneszenz Telomere und Telomerase in Zellalterung und Karzinogenese. *BioSpektrum*, 16(3/10), 271–273.
https://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=1030380
- Welman, A., Barraclough, J. & Dive, C. (2007). Tetracycline Regulated Systems in Functional Oncogenomics. *Translational Oncogenomics*, 2, 17–33.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634622/pdf/tog-2-2007-017.pdf>

- Wild, R., Fager, K., Flefleh, C., Kan, D., Inigo, I., Castaneda, S., Lou, R. F., Camuso, A., McGlinchey, K. & Rose, W. C. (2006). Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) is not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(1), 104–113. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-05-0259>
- Wilson, J. M. (1996). Adenoviruses as Gene-Delivery Vehicles. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1185–1187. <https://doi.org/10.1056/nejm199605023341809>
- Wulff, H. (2011, April). Induzierbare adenovirale Genexpression von murinem Interleukin 18 (Diplomarbeit Biologie). Carl von Ossietzky Universität Oldenburg; Universitätsklinikum Eppendorf; Universität Hamburg;
- Yang, Y., Xiang, Z., Ertl, H. C. & Wilson, J. M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7257–7261. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7257>
- Zauber, A. G., Winawer, S. J., O'Brien, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B. F., Shi, W., Bond, J. H., Schapiro, M., Panish, J. F., Stewart, E. T. & Waye, J. D. (2012). Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *New England Journal of Medicine*, 366(8), 687–696. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1100370>
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut. (2019). Darmkrebs. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html
- Zhou, S., Huang, Y., Wei, Y., Jiang, Z., Zhang, Y., Yang, Q. & Xie, D. (2012). No Survival Benefit from Adding Cetuximab or Panitumumab to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer in KRAS Wild Type Patients: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 7(11), e50925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.005>

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet haben und wahrscheinlich mehr als ich glaubten, dass ich dieses Projekt beende.

Herrn Dr. Andreas Block möchte ich für die auch nach so vielen Jahren immer noch interessante Aufgabenstellung und seine Hilfestellungen zum selbstständigen experimentellen Denken und Arbeiten und insbesondere für seine Geduld danken.

Für die Bereitschaft, mit viel Geduld und Überzeugung die Techniken der Laborarbeit zu vermitteln, bedanke ich mich tausendfach bei Dr. Ingke Braren, die den ersten Teil der Klonierungsarbeit im Fachbereich der Biochemie der Universität Hamburg zusammen mit Dr. Edzard Spillner und Dr. Melanie Plum unterstützt hat und die jeweils für jede Diskussion und immer für Problembesprechungen bereit waren und ein besonders großes Dankeschön an Frau Dr. Ingke Braren, die mir auch im Endspurt, trotz der langen Zeit dazwischen, immer mit ihrem Rat zur Seite stand.

Ebenfalls ein besonderes und riesiges Dankeschön auch an Dr. Timo Sieber, der mich während der zweiten Phase des Projekts ab 2011 im HPI immer unterstützt hat und während dieser Zeit ebenfalls viel Geduld und Humor bewiesen hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit niemals beendet worden!

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter der jeweiligen Labore, dass sie alle Fragen immer bereitwillig beantwortet haben und stets hilfsbereit und freundlich waren und auch dafür, dass sie Ideen einbrachten, die nicht selten den entscheidenden Gedanken hervorbrachten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden, die es nie aufgegeben haben, mich daran zu erinnern, die Arbeit doch fortzuführen. Insbesondere möchte ich auch meinem Mann danken, der immer an mich geglaubt hat!

Auch einen ganz lieben Dank an die Bibliothekarinnen der Krankenhausbibliothek der Ruppiner Kliniken, die ich netterweise während der Schreibphase nutzen durfte. Wäre dies nicht möglich gewesen, hätte es wahrscheinlich ebenfalls kein gutes Ende für diese Arbeit gegeben.

Alle die, die ich hier nicht erwähnt habe, bitte ich um Entschuldigung und bedanke mich dennoch herzlichst bei euch!

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Anhang

Sequenzen

542 pAD3r luc

CTGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGC
CTGCTATTGTCTTCCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCCACCCCCA
GAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCATTTTATTAGG
AAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAGGG
GCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGA
GCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAGAATAGGGCCCTCTAGGATCGATCCTCG
CGCCCCCTACCCACCGTACTCGTCAATTCCAAGGGCATCGGTAAACATCTGCTC
AAACTCGAAGTCGGCCATATCCAGAGCGCCGTAGGGGGCGGAGTCGTGGGGG
GTAAATCCCGGACCCGGGAATCCCCGTCCCCAACATGTCCAGATCGAAATC
GTCTAGCGCGTCGGCATGCGCCATCGCCACGTCTCGCCGTCTAAGTGGAGCT
CGTCCCCCAGGCTGACATCGGTGCGGGGGGCGGTGGACAGTCTGCGCGTGTGT
CCCGCGGGGAGAAAGGACAGGCGCGGAGCCGCCAGCCCCGCCTCTTCGGGGG
CGTCGTCGTCCGGGAGATCGAGCAGGCCCTCGATGGTAGACCCGTAATTGTTT
TTCGTACGCGCGCGGCTGTACGCGGACCCACTTTCACATTTAAGTTGTTTTTCT
AATCCGCATATGATCAATTCAAGGCCGAATAAGAAGGCTGGCTCTGCACCTTG
GTGATCAAATAAATTCGATAGCTTGTGTAATAATGGCGGCATACTATCAGTAG
TAGGTGTTTTCCCTTTCTTTAGCGACTTGATGCTCTTGATCTTCCAATACGCA
ACCTAAAGTAAAATGCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAATGCATTCTCTAGTG
AAAAACCTTGTTGGCATAAAAAGGCTAATTGATTTTCGAGAGTTTCATACTGTT
TTTCTGTAGGCCGTGTACCTAAATGTACTTTTGCTCCATCGCGATGACTTAGTA
AAGCACATCTAAAACCTTTTAGCGTTATTACGTAAAAAATCTTGCCAGCTTTCCC
CTTCTAAAGGGCAAAGTGAGTATGGTGCCTATCTAACATCTCAATGGCTAAG
GCGTCGAGCAAAGCCCGCTTATTTTTTACATGCCAATACAATGTAGGCTGCTCT
ACACCTAGCTTCTGGGCGAGTTTACGGGTTGTTAAACCTTCGATTCCGACCTCA
TTAAGCAGCTCTAATGCGCTGTTAATCACTTTACTTTTATCTAATCTAGAGGGT
CTGGGTCTCTTTGGCATGGTTCGAATTAATTTCGCGTCGAGCCGGCCGCGGGTAC
AATCCGGTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGA
TGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCTCAAGCCTGCCACACCTCAAGCT
TGACAACAAAAAGATTGTCTTTTCTGACCAGATGGACGCGGCCACCCTCAAAG
GCATCACCGCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAAACTGAC
AATCTTAGCGCAGAAGTCATGCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACA
GTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGG
CGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGGTTTCCGATCCAAGAGTACTGAAAGAC
CGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGGCGTCGAAGCTTGATGGG
TCGCTCGGTGTTTCGAGGCCACACGCGTCACCTTAATATGCGAAGTGGACCTCG

GACCGCGCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTTCTGAATTGCCCGGCGAGCTCGAC
TT
TCACTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCTA
TCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGG
AGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTC
GACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTT
CTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGA
TAGGGAGTGGTAAACTCGACGGTTCGAGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGA
GGCCTATAAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGC
GGCCCCGAATTGCGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAAC
GCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTC
GTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGAC
CAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGC
ACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCC
CAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCT
AGCCTCGAGAATTCACGCGTGGTACCGAGCTCGGATCTGCGATCTAAGTAAGC
TTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAA
AGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCA
ACTGCATAAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCCTGGAACAATTGCTTTTA
CAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCC
GTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAAT
CGTCGTATGCAGTGAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGGCGCGTT
ATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAAT
TGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAGG
GGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATT
ATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTT
GTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCC
TTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGG
TCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGA ACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCA
TGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAG
TGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATA
TGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGG
AGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCC
TTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAA
ATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAA
GAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACAT
CAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGGTAAA
GTTGTTCCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCT
GGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCG
GTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTT
GACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGA
ATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCCGAG
GTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGA ACTTCCCGCCCGCTTGTGTTTTGGAGC

ACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGT
AACAAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCG
AAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAA
AGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGTAACGGCCGCCAGT
GTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATC
TAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCT
CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTC
CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC
AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC
GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGTCGACATCGATGCTAGA
GTGGAAGGTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAG
TGTGGCGGTAAACATATTAGGAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCGAGGA
GCTGAGGCCCGATCACTTGGTGTCTGGCCTGCACCCGCGCTGAGTTTGGCTCTAG
CGATGAAGATACAGATTGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGG
GAAAGAATATATAAGGTGGGGGTCTTATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAG
CCGCCGCCGATGAGCACCAACTCGTTTGATGGAAGCATTGTGAGCTCATAT
TTGACAACGCGCATGCCCCATGGGCGGGGGTGCGTGAGAATGTGATGGGCTC
CAGCATTGATGGTCGCCCGTCCTGCCCGCAAACCTACTACCTTGACCTACGA
GACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACTGCAGCCTCCGCCGCCGCTTCAGCCG
CTGCAGCCACCGCCCGCGGGATTGTGACTGACTTTGCTTTCCTGAGCCCGCTTG
CAAGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATCCGCCCGCGATGACAAGTTGACGGCTCTTT
TGGCACAATTGGATTCTTTGACCCGGGAACCTAATGTCGTTTCTCAGCAGCTGT
TGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCTGAAGGCTTCCCTCCCTCCCAATGCGG
TTTAAAACATAAATAAAAAACCAGACTCTGTTTGGATTTGGATCAAGCAAGTG
TCTTGCTGTCTTTATTTAGGGGTTTTGCGCGCGCGGTAGGCCCGGGACCAGCGG
TCTCGGTCGTTGAGGGTCTGTGTATTTTTTCCAGGACGTGGTAAAGGTGACTC
TGGATGTTTCCAGATACATGGGCATAAGCCCGTCTCTGGGGTGGAGGTAGCACCA
CTGCAGAGCTTCATGCTGCGGGGTGGTGTGTAGATGATCCAGTCGTAGCAGG
AGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAAATGTCTTTCAGTAGCAAGCTGATTGCCAGG
GGCAGGCCCTTGGTGTAAGTGTTTACAAAGCGGTTAAGCTGGGATGGGTGCAT
ACGTGGGGATATGAGATGCATCTTGGACTGTATTTTTAGGTTGGCTATGTTCCC
AGCCATATCCCTCCGGGGATTTCATGTTGTGCAGAACCACCAGCACAGTGTATC
CGGTGCACTTGGGAAATTTGTCATGTAGCTTAGAAGGAAATGCGTGGAAGAAC
TTGGAGACGCCCTTGTGACCTCCAAGATTTTCCATGCATTCGTCCATAATGATG
GCAATGGGCCACGGGCGGCGGCCTGGGCGAAGATATTTCTGGGATCACTAAC
GTCATAGTTGTGTTCCAGGATGAGATCGTCATAGGCCATTTTTACAAAGCGCG
GGCGGAGGGTGGCAGACTGCGGTATAATGGTTCATCCGGCCCAGGGGCGTAG
TTACCCTCACAGATTTGCATTTCCACGCTTTGAGTTCAGATGGGGGGATCATG
TCTACCTGCGGGGCGATGAAGAAAACGGTTTTCCGGGGTAGGGGAGATCAGCTG
GGAAGAAAGCAGGTTCTGAGCAGCTGCGACTTACCGCAGCCGGTGGGCCCGT
AAATCACACCTATTACCGGGTGCAACTGGTAGTTAAGAGAGCTGCAGCTGCCG
TCATCCCTGAGCAGGGGGGCCACTTCGTTAAGCATGTCCCTGACTCGCATGTTT
TCCCTGACCAAATCCGCCAGAAGGCGCTCGCCGCCAGCGATAGCAGTTCTTG
CAAGGAAGCAAAGTTTTTCAACGGTTTTGAGACCGTCCGCCGTAGGCATGCTTT

TGAGCGTTTGACCAAGCAGTTCCAGGCGGTCCCACAGCTCGGTACCTGCTCT
ACGGCATCTCGATCCAGCATATCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGGCGGCTTT
CGCTGTACGGCAGTAGTCGGTGCTCGTCCAGACGGGCCAGGGTCATGTCTTTC
CACGGGCGCAGGGTCCCTCGTCAGCGTAGTCTGGGTACGGTGAAGGGGTGCGC
TCCGGGCTGCGCGCTGGCCAGGGTGCGCTTGAGGCTGGTCCTGCTGGTGCTGA
AGCGCTGCCGGTCTTCGCCCTGCGCGTCCGCCAGGTAGCATTGACCATGGTGT
CATAGTCCAGCCCCTCCGCGGCGTGCCCTTGCGCGCAGCTTGCCCTTGGAG
GAGGCGCCGCACGAGGGGCAGTGCAGACTTTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGCG
CGAGAAATACCGATTCCGGGGAGTAGGCATCCGCGCCGCAGGCCCCCGCAGAC
GGTCTCGCATTCCACGAGCCAGGTGAGCTCTGGCCGTTCCGGGGTCAAAAACCA
GGTTTCCCCCATGCTTTTTGATGCGTTTTCTTACCTCTGGTTTCCATGAGCCGGTG
TCCACGCTCGGTGACGAAAAGGCTGTCCGTGTCCCCGTATACAGACTTGAGAG
GCCTGTCCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGG
TGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATG
CAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCG
CTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTCGGAATCTT
GCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCG
AGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTG
CTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCT
TCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGA
TGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAA
CTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGC
ACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTC
CCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGC
CGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACTCAAGAAATTGGAGCCAATCAATT
CTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCG
CGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGGTCC
TGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGAGGACCCGGCTAGGCTG
GCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGT
GAAGCGACTGCTGCTGCAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTC
TTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACC
ATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCT
ACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCC
CGCCGCATCCATAACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGC
ATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTAT
CATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAAGTGACCAA
ACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAA
CGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGT
GAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTC
GGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGC
TTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGG
GTGTTGGCGGGTGTCCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGA
GTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCAC
CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCA

GGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA
TCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCA
GGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
GACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
GACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG
TGGCGCTTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTT
GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCC
TTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCA
CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTG
CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTA
TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC
TACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTT
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCT
TAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG
CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACT
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG
TCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGG
CGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCT
CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGACGTTATCACTCATGGTTATGGCA
GCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTG
CTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTA
CCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCA
GCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAA
TGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCT
TCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGGTTCGCGCACATTT
CCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAC
CTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTTATCA
TGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCATCATCAAT
AATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTG
TGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGA
AGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGCCGGATGTGGTAAAA
GTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTATACGGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGT
TTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCAAGTAATGTTTGGCCATTT
TCGCGGGA AAAACTGAATAAGAGGAAGTGAAATCTGAATAATTCTGTGTTACTC

ATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGTTTACGTGGAG
ACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCGGGTCAAAGTTGGCG
TTTTATTATTATAGTCAGCTCTAG

Gesamtsequenz der Cetuximab-Expressionskassette

atggaattggggctgagctgggttttctgtgctatatttaaatgtgtccag
A S M E L G L S W V F L V A I F K C V Q
tgcaggtgcagctgaagcagtcaggacctggcctagtgcagccctcacagagcctgtcc
C Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S
atcacctgcacagtctctggtttctcattaactaactatggtgtacactgggttcgccag
I T C T V S G F S L T N Y G V H W V R Q
tctccaggaaagggtctggagtggctgggagtgatatggagtgggaaacacagactat
S P G K G L E W L G V I W S G G N T D Y
aatacacctttcacatccagactgagcatcaacaaggacaattccaagagccaagtttc
N T P F T S R L S I N K D N S K S Q V F
tttaaatgaacagtctgcaatctaatacagccatataattactgtccagagccctc
F K M N S L Q S N D T A I Y Y C A R A L
acctactatgattacgagtttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctcctcg
T Y Y D Y E F A Y W G Q G T L V T V S S
agcgcctccaccaagggccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctct
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
gggggcacagcggcctgggctgcctggcaaggactactccccgaaccggtagcggtg
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
tctggaactcaggegcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtc
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
tcaggacttactcctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagctgggcaccag
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
cccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactctgggg
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G
ggaccgtcagtctctcttccccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggacc
G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T
cctgaggtcacatgcgtggtgggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaac
P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
tggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtac
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
aaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatc
K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
tccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggat
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D

gagctgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgac
ELTKNQVSLTCLVKGFPYPSD
 atgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctccc
IAVEWESNGQPENNYKTPP
 gtgctggactccgagcgtccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgatgcatgaggctctgcacaaccactac
WQQGNVFSCSVMEALHNHY
 acgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatctagacgagctaaa
TQKSLSLSPGK S R R A K
 cgagctccagtcaaacagacacttaattttgatctttgaaattggctggcgatgctgag
 R **APVKQTLNFDLLKLAGDVE**
 agtaatccaggccagggccgc[atggacatgaggggtcccgcctcagctcctggggctc
SNPGP G G R M D M R V P A Q L L G L
 ctgctactctgcctgcaggggtccagatgtgacatctgctgactcagctcagtcac
 L L L C L Q G A R C **DILLTQSPVI**
 ctgtctgtgagtcaggagaaagagtcagtttctctgcagggccagtcagggtattggc
LSVSPGERVSFSCRASQGIG
 acaaacataactggatcagcaaagaacaaatggttctccaaggcttctcataaagtat
TNIHWYQQR TNGSPRL LIKY
 gcttctgagctatctctgggatccctccaggttagtgagcagtgatcaggacagat
ASESISGIPSRFSGSGSGTD
 ttactcttagcatcaacagtgaggagctgaagatattgcagattactgtcaaaa
FTLSINSVESEDIADYYCQQ
 aataataactggccaaccacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaaacgaactgtg
NNNWPTTFGAGTKLELK **RTV**
 ggcgccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcc
GAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 tctgttgctgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtg
SVVCLLN NFYPREAKVQWKV
 gataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggac
DNALQSGNSQESVTEQDSKD
 agcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaa
STYSLSS TL T L S K A D Y E K H K
 gtctacgctgcgaagtaccatcagggcctgagctcgcctcacaagagcttcaac
VYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 aggggagagtgtaggtttaaac
R G E C -

Lila: konstante leichte Kette
 Hellgrün: konstante schwere Kette IgG1
 Gelb: variable schwere Kette
 Braungrün: variable leichte Kette
 Blau: 2A-Peptid/Furinschnittstelle

pShuttleCetuximab (Klon 3)

TAACATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGG
GGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAG
TAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACG
GATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACA
ATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAA
GATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAA
TTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATACTGGTACCGCGGCCCGCTCGAGTCTAGA
GATATCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTT
CCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCTGCCCCACCCACCCCCAGAATAGAATGAC
ACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTTCTCATTTTTATTAGGAAAGGACAGTG
GGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAG
ATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTT
AGGTGACACTATAGAATAGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGACGTTTAAACCTA
ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGGGT
GACTTCGCAGGCGTAGACTTTGTGTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCAGCGTCAG
GGTGCTGCTGAGGCTGTAGGTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCTCTGTGACACTCTC
CTGGGAGTTACCCGATTGGAGGGCGTTATCCACCTTCCACTGTACTTTGGCCTC
TCTGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTCA
ACTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGCGCGCCACAGTTCGT
TTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGCACCGAACGTGGTTGGCCAGTTATTATTTTGT
TGACAGTAATAATCTaCAATATCTTCAGACTCCACACTGTTGATGCTtAGAGTAA
AAcCTGTCCCTGATCCACTGCCACTAAACCTGGAAGGGATCCCAGAGATAGAC
TCAGAAGCATACTTTATGAGAAGCCTTGGAGAACCAcTTGTTCTTTGCTGATAC
CAGTGTATGTTTGTGCCAATActCTGACTGGCCCTGCAGGAGAACTGACTCTT
TCTCCTGGACcCcCAGACAGGATGACTGGAGACTGAGTCAGCAAGATGTACAT
CTGGCACCTTGCAGGCAGAGTAGCAGGAGCCCCAGGAGCTGAGCGGGGACCC
TCATGTCCATGCGGCCCGCTGGGCTGGATTACTCTCGACATCGCCAGCCAATT
TCAAAGATCAAATTAAGTGTCTGTTTACTGGAGCTCGTTTAGCTCGTCTAG
ATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTGCAGAGCC
TCATGCATCACGGAGCATGAGAAGACGTTCCCCTGCTGCCACCTGCTCTTGTCC
ACGGTGAGCTTGCTaTAGAGGAAGAAGGAGCCGTCGGAGTCCAGCACGGGAG
GCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCCGGCTGCCATTGCTCTCCACTCCACGGCGA
TGTCGCTGGGATAGAAGCCTTTGACCAGGCAGGTCAGGCTGACCTGGTTCTTG
GTCAiCTCcTCCC GGATGGGGGCAGGGTGTACACCTGTGGTTCTCGGGGCTGC
CCTTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCGATGGGGGCTGGGAGGGCTTTGTTGGAG
ACCTTGCACTTGTACTCCTTGCCATTCAGCCAGTCCTGGTGCAGGACGGTGAGG
ACGCTGACCACACGGTACGTGCTGTTGTA CTGCTCCTCCCGtGGCTTTGTCTTGG
CATTATGCACCTCCACGtCGTCCACGTACCAGTTGAACTTGACCTCAGGGTCTT
CGTGGCTCACGTCCACCACCACGCATGTGACCTCAGGGGTCCGGGAGATCATG
AGGGTGTCTTGGGTTTTGGGGGGAAGAGGAAGACTGACGGTCCCCCAGGAG
TTCAGGTGCTGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCACAAGATTTGGGCTC
AACTcTCcTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTGATTCACGTTGCAGATGTAG
GTCTGGGTGCCCAAGCTGCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTGCTGAGGGAGTA

GAGTCCTGAGGACTGTAGGACAGCCGGGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTCAGG
GCGCCTGAGTTCCACGACACCGTCACCGGTTCCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
GCAGCCCAGGGGcTGTGTGCCCCAGAGGTGCTCTTGGAGGAGGGTGCCAGGG
GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCCT
TGGCCCCAGTAAGCAAACCTCGTAATCATAGTAGGTGAGGGCTCTGGCACAGTA
ATATATGGCTGTGTCATTAGATTGCAGACTGTTCATTTTAAAGAAAACCTTGGCT
CTTGGAATTGTCCTTGTGGATGCTCAGTCTGGATGTGAAAGGTGTATTATAGTC
TGTGTTTCCACCACTCCATATCACTCCCAGCCACTCCAGACCCTTTCCTGGAGA
CTGGCGAACCCAGTGTACACCATAGTTAGTTAATGAGAAACCAGAGACcGTGC
AGGTGATGGACAGGCTCTGTGAGGGCTGCACTAGGCCAGGTCTGACTGCTTC
AGCTGCACCTGACACTGGACACATTTAAATATAGCAACAAGGAAAACCCAGCT
CAGCCCCAATTCATGCTAGCCTATAGTGAGTCGTATTAAGTACTCTAGCCTTA
AGAGCTGTAATTGAACTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
ATGTCAGTAAGACCAATAGGTGCCTATCAGAAACGCAAGAGTCTTCTCTGTCT
CGACAAGCCCAGTTTCTATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACT
TACCTGCCAGTGCCTCACGACCAACTTCTGCAAGGCTACCTTAAGAGAGTCA
CTGCAGCTTAAGTTCGAGACTGTTGTGTCAGAAGCACTGACTGCGTTAGCAATT
TAACTGTGATAAACTACCGCAATAAAGCTTCcCAATTCGGGGCCGCGGAGGCT
GGATCGGTCCCGtTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCA
GGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTAC
ACGCCTACcTCGACCCTCGACGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGA
AAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGT
CGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCA
CTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAG
TGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA
AGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCG
AGCTCGCCGGGCAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGCGCGGTCCGA
GGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCC
ATCAAGCTTCGACcgCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCT
TTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCAC
CGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGACTGTT
GGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTAAGATTGTCA
GTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCC GCGGTGATGCCTTT
GAGGGTGGCCGCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACAATCTTTTTGTTGTCAAGCTT
GAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCA
CTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACCGGAATTGTACCC
GCGGCCcCTCGACCGAATTAATTCACCATGCCAAAGAGACCCAGACCCTCTAG
ATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCCG
GAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAG
CCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCC
ATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAG
CTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAG
TCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGT
ATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGTTTTTCACTAG
AGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTAT

TGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTAC
TGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGG
TGCAGAGCCAGCCTTCTTATTTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAA
ACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCCGCGTACAGCCGCGCGGTACGAAAAAC
AATTACGGGTCTACCATCGAGGGCCTGCTCGATCTCCCGGACGACGACGCCCC
CGAAGAGGCGGGGCTGGCGGCTCCGCGCCTGTCTTTCTCCCCGCGGGACACA
CGCGCAGACTaTC_gACGGCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTC
CACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTT
CGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCCGGGTCCGGGATTTACCCCC
ACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAG
ATGTTTACCGATGCCCTTGGAATTGACGAGTACGGTGGGTAGGGGGCGCGAGG
ATCGATCCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTG
ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC
CGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAAA
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG
GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGG_{ctt}CTGAtATCGAATTCAAGCTTGTGACTCGA
AGATCTGGGCGTGGTAAAGGGTGGGAAAGAATATATAAGGTGGGGGTCTTATG
TAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCGCCGCCATGAGCACCAACTCGTTT
GATGGAAGCATTGTGAGCTCATATTTGACAACGCGCATGCCCCATGGGCCGG
GGTGCGTGAGAATGTGATGGGCTCCAGCATTGATGGTTCGCCCCGTCTGCCCG
CAAACCTACTACCTTGACCTACGAGACCGTGTCTGGAACGCCGTTGGAGACT
GCAGCCTCCGCCGCCGCTTCAGCCGCTGCAGCCACCGCCCCGCGGGATTGTGAC
TGACTTTGCTTTCTGAGCCCGCTTGCAAGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATCCGC
CCGCGATGACAAGTTGACGGCTCTTTTGGCACAATTGGATTCTTTGACCCGGGA
ACTTAATGTCGTTTCTCAGCAGCTGTTGGATCTGCGCCAGCAGGTTTCTGCCCT
GAAGGCTTCTCCCTCCCAATGCGGTTTAAACATAAATAAAAAACCAGACT
CTGTTTGGATTTGGATCAAGCAAGTGTCTTGCTGTCTTTATTTAGGGGTTTTGC
GCGCGCGGTAGGCCCGGGACCAGCGGTCTCGGTGCGTTGAGGGTCTGTGTATT
TTTTCCAGGACGTGGTAAAGGTGACTCTGGATGTTTACAGATACATGGGCATAAG
CCCGTCTCTGGGGTGGAGGTAGCACCCTGCAGAGCTTCATGCTGCGGGGTGG
TGTTGTAGATGATCCAGTCGTAGCAGGAGCGCTGGGCGTGGTGCCTAAAAATG
TCTTTCAGTAGCAAGCTGATTGCCAGGGGCAGGCCCTTGGTGTAAAGTGTTTACA
AAGCGGTTAAGCTGGGATGGGTGCATACGTGGGGATATGAGATGCATCTTGG
CTGTATTTTTAGGTTGGCTATGTTCCAGCCATATCCCTCCGGGGATTCATGTT
GTGCAGAACCACCAGCACAGTGTATCCGGTGCACCTTGGGAAATTTGTCATGTA
GCTTAGAAGGAAATGCGTGGAAGAACTTGGAGACGCCCTTGTGACCTCCAAGA
TTTTCCATGCATTCGTCCATAATGATGGCAATGGGCCACGGGCGGCGGCCTG
GGCGAAGATATTTCTGGGATCACTAACGTCATAGTTGTGTTCCAGGATGAGAT
CGTCATAGGCCATTTTTACAAAGCGCGGGCGGAGGGTGCCAGACTGCGGTATA
ATGGTTCCATCCGGCCCAGGGGCGTAGTTACCCTCACAGATTTGCATTTCCAC
GCTTTGAGTTCAGATGGGGGGATCATGTCTACCTGCGGGGCGATGAAGAAAAC
GGTTTCCGGGGTAGGGGAGATCAGCTGGGAAGAAAGCAGGTTCTGAGCAGC
TGCGACTTACCGCAGCCGGTGGGCCCGTAAATCACACCTATTACCGGGTGCAA
CTGGTAGTTAAGAGAGCTGCAGCTGCCGTCATCCCTGAGCAGGGGGGCCACTT

CGTTAAGCATGTCCCTGACTCGCATGTTTTCCCTGACCAAATCCGCCAGAAGGC
GCTCGCCGCCAGCGATAGCAGTTCTTGCAAGGAAGCAAAGTTTTTCAACGGT
TTGAGACCGTCCGCCGTAGGCATGCTTTTGAGCGTTTGACCAAGCAGTTCCAG
GCGGTCCCACAGCTCGGTACCTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCATATCTCC
TCGTTTCGCGGGTTGGGGCGGCTTTCGCTGTACGGCAGTAGTCGGTGCTCGTCC
AGACGGGCCAGGGTCATGTCTTTCCACGGGCGCAGGGTCTCGTCAGCGTAGT
CTGGGTACGGTGAAGGGGTGCGCTCCGGGCTGCGCGCTGGCCAGGGTGGCGCT
TGAGGCTGGTCTGCTGGTGTGAAGCGCTGCCGGTCTTCGCCCTGCGCGTCCG
CCAGGTAGCATTTGACCATGGTGTATAGTCCAGCCCCCTCCGCGGCGTGGCCC
TTGGCGCGCAGCTTGCCCTTGAGGAGGCGCCGCACGAGGGGCAGTGCAGACT
TTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGCGCGAGAAATACCGATTCCGGGGAGTAGGCAT
CCGCGCCGCAGGCCCGCAGACGGTCTCGCATTCACGAGCCAGGTGAGCTCT
GGCCGTTCCGGGTCAAAAACCAGGTTTCCCCCATGCTTTTTGATGCGTTTCTTA
CCTCTGGTTTTCCATGAGCCGGTGTCCACGCTCGGTGACGAAAAGGCTGTCCGT
GTCCCCGTATACAGACTTGAGAGGGAGTTTAAACGAATTCAATAGCTTGTTGC
ATGGGCGGCGATATAAAATGCAAGGTGCTGCTCAAAAAATCAGGCAAAGCCT
CGCGCAAAAAGAAAGCACATCGTAGTCATGCTCATGCAGATAAAGGCAGGT
AAGCTCCGGAACCACCACAGAAAAAGACACCATTTTTCTCTCAAACATGTCTG
CGGGTTTCTGCATAAACACAAAATAAAATAACAAAAAACATTTAAACATTAG
AAGCCTGTCTTACAACAGGAAAAACAACCCTTATAAGCATAAGACGGACTACG
GCCATGCCGGCGTGACCGTAAAAAAACTGGTCACCGTGATTA AAAAGCACCCAC
CGACAGCTCCTCGGTATGTCCGGAGTCATAATGTAAGACTCGGTAAACACAT
CAGGTTGATTCATCGGTGAGTGTAAAAAGCGACCGAAATAGCCCGGGGGAAT
ACATACCCGCAGGCGTAGAGACAACATTACAGCCCCCATAGGAGGTATAACA
AAATTAATAGGAGAGAAAAACACATAAACACCTGAAAAACCCTCCTGCCTAG
GCAAAATAGCACCCCTCCCGCTCCAGAACAACATACAGCGCTTCACAGCGGCAG
CCTAACAGTCAGCCTTACCAGTAAAAAAGAAAACCTATTA AAAAACACCCACT
CGACACGGCACCCAGCTCAATCAGTCACAGTGTA AAAAAGGGCCAAGTGCAGA
GCGAGTATATATAGGACTAAAAAATGACGTAACGGTTAAAGTCCACAAAAAA
CACCCAGAAAACCGCACGCGAACCTACGCCAGAAACGAAAGCCAAAAAAC
CACAACCTCCTCAAATCGTCACTTCCGTTTTCCACGTTACGTAACCTCCCATTT
TAAGAAAACCTACAATTTCCCAACACATACAAGTTACTCCGCCCTAAAACCTACG
TCACCCGCCCGTTCCACGCCCGCGCCACGTCACAAACTCCACCCCTCATT
ATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGATGTTAATTAACA
TGCATGGATCCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAT
ACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCG
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCC
ACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAA
AGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAT

CGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGA
CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAT
GAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACC
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCA
TCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGA
TTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG
CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGCCATGA
GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCG
CAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAG
GGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGG
CGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACC GGAATTGCCAGC
TGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTT
TCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACA
GGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCC
GGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCG
GCTGCTCTGATGCCGCGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCGGTTCTTT
TTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCG
CGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG
ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG
CAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAA
GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGA
TCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCG
CCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGC
GATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATC
GACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC
CCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGC
TTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG
ACGAGTTCTTCTGAATTTTGTAAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACC
AATAGGCCGAAATCGGCAACATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGCGATA
GGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGA
CTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTG
AACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTTTCGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCTCTAAAT
CGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGA
ACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGC
TGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATG
CGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATTCAGGATCGAATTAATTCTTAAT

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne unzulässige 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: