

**Untersuchungen zur antiangiogenen Wirkung
interner Kringleregionen des Vorläuferproteins
Plasminogen *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Esther Raskopf

aus

Bonn

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. W. H. Caselmann

2. Referent: Prof. Dr. V. Herzog

Tag der Promotion: 2. Dezember 2005

meinem Mann

meinen Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. W. H. Caselmann, der mir in seinem Labor die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat und mich während dieser Arbeit betreut hat.

Weiter möchte ich Prof. Dr. V. Herzog ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung in der Math.-Nat. Fakultät und für die Übernahme des Co-Referats bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. V. Schmitz, der diese Arbeit mitbetreut hat und durch seine ständige Diskussionsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Therapie bedanken: Annemarie Musch, Annabelle Vogt, Jeeja Kempf, Maren Klöckner, Sevil Gerceker, Miroslaw Kornek, Ingeborg Höschler, Ursula Becker, Maria-Angeles Gonzalez-Carmona, Ute Henseler und Per Hoffmann. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit haben mich bei dieser Arbeit sehr unterstützt.

Bei Herrn B. Bialaschik und den Mitarbeitern des Tierhauses möchte ich mich für die Betreuung meiner Mäuse bedanken.

Bei den Labors von Prof. Spengler, Prof. Schmidt-Wolf, Prof. von Bergmann und dem Institut für Molekulare Medizin und Immunologie von Prof. Knolle möchte ich mich herzlich für die Mitbenutzung von Geräten bedanken.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinem Mann Jörg möchte ich ganz besonders für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit, vor allem in der Endphase bedanken. Auch bei meinem Bruder, der mir bei vielen Computerproblemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Katja Schmitz und Jörg danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Aminosäuren und ihre Symbole

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
Ad	Adenovirus
aFGF	Acidic fibroblast growth factor
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bFGF	basic fibroblast growth factor
CAM	Chorioallantoic Membrane
cDNA	copy DNA (durch reverse Transkription von RNA)
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Erdbeschleunigung (9,81 Nm)
h	Stunde
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
HBSS	Hanks buffered salt solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF1- α	Hypoxia inducible factor1- α

HIF2- α	Hypoxia inducible factor2- α
K	Kringle-Region (von Plasminogen)
K1	Kringle-Region 1 von Plasminogen
K1-3	Kringle-Region 1-3 von Plasminogen
K1-4	Kringle-Region 1-4 von Plasminogen
K1-4.5	Kringle-Region 1-4.5 (80% von K5) von Plasminogen
K1-5	Kringle-Region 1-5 von Plasminogen
K2	Kringle-Region 2 von Plasminogen
K2-3	Kringle-Region 2-3 von Plasminogen
K3	Kringle-Region 3 von Plasminogen
K4	Kringle-Region 4 von Plasminogen
K5	Kringle-Region 5 von Plasminogen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Gen kodierend für das Enzym β -Galactosidase
LLC	Lewis Lungenkarzinom
min	Minute
ml	Milliliter
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2 (Gelatinase A)
muthPlgK3	Plasminogen cDNA mit einer Restriktions- erkenntnisstelle hinter Kringle 3 (AS 356)
muthPlgK4	Plasminogen cDNA mit einer Restriktions- erkenntnisstelle hinter Kringle 4 (AS 473)
muthPlgK5	Plasminogen cDNA mit einer Restriktions- erkenntnisstelle hinter Kringle 5 (AS 583)
MW	Molecular weight (Molekulargewicht)

opu	optical particle units, die Gesamtheit an Molekülen, die in einer Virushaltigen Lösung enthalten sind
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PC	Protein-Convertase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEDF	Pigment epithelial derived factor
pfu	plaque forming units, Einheit zur Wirksamkeit adenoviraler Vektoren
Plg	Plasminogen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
Plg	Plasminogen-Protein
rhPlgK1-4	cDNA aus Plasminogen von AS 1 bis 477, enthält die Kringleregionen 1-4
rhPlgK1-5	cDNA aus Plasminogen von AS 1 bis 583, enthält die Kringleregionen 1-5
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI1640	R P Medical Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur (23 °C)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
sc.	subkutan
sFlk1	lösliches Fragment des VEGF-Rezeptors 2
sFlt	lösliches Fragment des VEGF-Rezeptors 1
siRNA	small interfering RNA
SN	konditionierter Zellüberstand (von Zellen, die mit Adenoviren transduziert wurden)

TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
tPa	Gewebe Plasminogen Aktivator
ü. N.	über Nacht
uPa	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wthPIg	cDNA von humanem Plasminogen in Wildtypform

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom - Epidemiologie.....	1
1.1.1	Faktoren der Hepatokarzinogenese.....	1
1.1.2	Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms.....	2
1.1.3	Konventionelle Therapien gegen HCC.....	3
1.2	Angiogenese – die Bildung neuer Blutgefäße.....	3
1.2.1	Tumorangiogenese und deren Inhibition.....	4
1.3	Das Vorläuferprotein Plasminogen.....	6
1.3.1	Charakterisierung der einzelnen Kringleregionen.....	8
1.3.2	Das Spaltprodukt Angiostatin.....	9
1.4	Die Endoprotease Furin.....	11
1.5	Gentherapie solider Tumoren.....	11
1.5.1	Allgemeine Einführung.....	11
1.5.2	Adenovirale Vektoren.....	12
1.5.3	Angiostatische Gentherapie.....	13
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	17
2	Material.....	18
2.1	Geräte.....	18
2.2	sonstiges Material.....	18
2.3	Reagenzien.....	19
2.3.1	Enzyme.....	19
2.3.2	Kits.....	20
2.4	Bakterienstämme.....	20
2.5	Zelllinien.....	20
2.5.1	911-Zellen.....	20
2.5.2	HEK 293-Zellen.....	20
2.5.3	A549-Zellen.....	21
2.5.4	HUVE-Zellen.....	21
2.5.5	LLC1-Zellen.....	21
2.5.6	Hepa129-Zellen.....	21
2.6	Tierstämme.....	21
2.6.1	BL/6 (C57BL/6NCrI).....	22
2.6.2	C3H/N (C3H/HeNCrI).....	22
2.6.3	BALB/c (BALB/cAnNCrI).....	22
2.7	verwendete Primer.....	22
2.7.1	Primer zur Synthese der Furin-Restriktionsstelle.....	22
2.7.2	Primer zur Synthese von rhPIgK1-4 und rhPIgK1-5 cDNA.....	23
2.7.3	Kontrollprimer für die RT-PCR.....	23

2.7.4	Primer für die Sequenzierung	24
2.8	Reagenzien für die Zellbiologie.....	24
2.9	Reagenzien für die Molekularbiologie.....	25
2.10	Reagenzien und Lösungen für die Mausmodelle	25
2.11	Reagenzien für die Histologie	25
2.12	sonstige Reagenzien	25
2.13	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	25
2.13.1	Lösungen für die Virusproduktion und Aufreinigung.....	26
2.13.2	Lösungen für die Molekularbiologie	27
2.13.3	Lösungen für die <i>in vitro</i> Experimente.....	27
3	Methoden.....	29
3.1	Synthese der Plasminogenderivate	29
3.1.1	Synthese von rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 cDNA.....	30
3.1.2	Zielgerichtete Mutagenese durch Hybridisierung, Strangsynthese und Ligation.....	31
3.1.3	Zielgerichtete Mutagenese durch PCR	34
3.2	Synthese und Amplifikation der adenoviralen Vektoren (He et al., 1998)	36
3.2.1	Klonierung der Plasminogen-Derivate in den adenoviralen Helfervektor pShuttleCMV	36
3.2.2	Rekombination der pShuttleCMV-Konstrukte mit AdEasy1	38
3.2.3	Lipofektion	41
3.2.4	Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren	42
3.2.5	Isolierung von Virus-DNA (Elsom, 1997)	43
3.2.6	Bestimmung der optical particle units (opu).....	44
3.2.7	Plaque-Assay zur Bestimmung der Viruskonzentration.....	45
3.2.8	Nachweis der Replikationsdefizienz.....	46
3.3	Nachweis der Genexpression <i>in vitro</i>	46
3.3.1	Infektion von A549-Zellen.....	46
3.3.2	RT-PCR.....	47
3.4	<i>in vitro</i> Experimente	48
3.4.1	Infektion von A549-Zellen.....	48
3.4.2	Tube Formation Assay	49
3.4.3	Proliferationsassay	49
3.4.4	Apoptose Assay	50
3.5	<i>in vivo</i> Experimente.....	51
3.5.1	Genexpression <i>in vivo</i>	51
3.5.2	<i>in vivo</i> Matrigel-Assay	53
3.5.3	Tumormodelle	53
3.5.4	Tumorthherapie	54
3.6	Histologie	55
3.6.1	Herstellung von Cryo-Gewebeschnitten.....	55
3.6.2	Immunhistochemische Färbung von Cryoschnitten	56
3.7	Statistik.....	56

4	Ergebnisse.....	58
4.1	Synthese der Plasminogenderivate	58
4.1.1	Synthese der cDNA für rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5	58
4.1.2	Synthese der Furin-Erkennungsstellen	59
4.2	Synthese der rekombinanten adenoviralen Vektoren.....	61
4.2.1	Konstruktion der pShuttleCMV-Vektoren	61
4.2.2	Rekombination von pShuttleCMV mit AdEasy1	62
4.2.3	Transfektion der AdEasy1-Konstrukte	63
4.2.4	Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren	64
4.2.5	Nachweis der Replikationsdefizienz.....	65
4.2.6	Nachweis des Transgens im Virus.....	65
4.3	Nachweis der Genexpression in vitro	67
4.4	in vitro Experimente	68
4.4.1	Tube Formation Assay	68
4.4.2	Proliferationsassay	71
4.4.3	Apoptose-Assay	73
4.5	in vivo Experimente.....	78
4.5.1	Nachweis der Genexpression <i>in vivo</i>	78
4.5.2	Matrigel-Assay <i>in vivo</i>	79
4.5.3	Systemische Therapie subkutaner LLC-Tumoren	82
4.5.4	Lokale Therapie subkutaner HCC-Tumoren	88
5	Diskussion	97
5.1	Synthese der Plasminogenderivate	98
5.2	Synthese der adenoviralen Vektoren und Genexpression in vitro.....	99
5.3	Funktionelle in vitro Untersuchungen	101
5.4	Funktionelle in vivo Untersuchungen	102
5.5	Systemische Therapie subkutaner LLC-Tumoren	103
5.6	Lokale Therapie subkutaner HCC-Tumoren.....	104
5.7	Ausblick.....	105
6	Literaturverzeichnis.....	107
7	Zusammenfassung	118
	Erklärung	120
	Lebenslauf	121

1 Einleitung

1.1 *Das hepatozelluläre Karzinom - Epidemiologie*

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine der weltweit fünf häufigsten Tumorentitäten. Mit geschätzten 800.000 neuen Fällen pro Jahr ist es der häufigste primäre Lebertumor. Dabei ist die Tendenz gerade in westlichen Ländern steigend. In Deutschland sind 1% aller Karzinome HCC mit einer Inzidenz von 4,7 pro 100.000 männlichen und 2,1 pro 100.000 weiblichen Einwohnern. Generell ist die Mortalitätsrate seit Mitte der achtziger Jahre steigend. Die Überlebensrate liegt dabei ohne Therapie bei durchschnittlich einem Jahr (Caselmann, 1998; Caselmann et al., 1999; Parkin et al., 1999; Durr & Caselmann, 2000; Kubicka et al., 2000; Parkin et al., 2001; Bruix et al., 2004).

1.1.1 **Faktoren der Hepatokarzinogenese**

Es gibt verschiedene ätiologische Faktoren der Hepatokarzinogenese. Die wichtigsten sind Infektionen mit Hepatitis B (HBV) und/oder C (HCV) Virus, Alkohol, Aflatoxin-Exposition, und Zirrhose (Kountouras & Lygidakis, 2000; Okuda, 2000).

Soweit bekannt, beeinflussen virus-spezifische und virus-unspezifische Immunantworten die Hepatokarzinogenese (Liang et al., 2000; Lauer & Walker, 2001). Der Lebenszyklus der Hepatozyten wird durch die chronische Entzündung deutlich verkürzt, was zu einer erhöhten Proliferationsrate führt (Guo et al., 2000). Dies führt zu einer erhöhten Mutationsrate und genetischer Instabilität. Hepatozyten akkumulieren diese genetischen Defekte, wodurch eine maligne Transformation sehr wahrscheinlich wird. Momentan ist aber noch unklar, ab welchem Stadium diese genetischen Veränderungen irreversibel werden (Liang & Heller, 2004).

Aufgrund einer chronischen Entzündung bedingt durch chronische HBV-Infektion entwickelt sich häufig (12 – 55 %) ein HCC (Fattovich et al., 2004). Dabei kann HBV die Hepatokarzinogenese direkt und indirekt induzieren. Ein direkter Weg führt z. B. über das HBV-kodierte Protein HBx (Rabe & Caselmann, 2000; Rabe et al., 2001). Dieses ist unter anderem in der Lage, die Expression verschiedener zellulärer und viraler Gene zu transaktivieren und ist daher möglicherweise relevant für die Transformation und Proliferation von Hepatozyten (Avantaggiati et al., 1993). Indirekt löst eine HBV-

Infektion eine Leberzirrhose aus, die in 60-90 % die Basis für eine HCC-Entstehung darstellt (Johnson, 1997).

Alkohol spielt gerade in Industrieländern als Kofaktor der Hepatokarzinogenese eine große Rolle. In Europa und den USA ist Alkohol die häufigste Ursache der Zirrhose. Die direkte Wirkung von Alkohol auf die Hepatokarzinogenese bleibt aber umstritten (Nalpas et al., 1991; De Mitri et al., 1995).

Aflatoxin, ein Toxin des Aspergillus-Pilzes, gilt als chemisches Hepatokarzinogen, welches vor allem in Lebensmitteln (z.B. verschimmelte Erdnüsse und Geteide) vorkommt. In Leberzellen von Aflatoxin-exponierten Personen ist häufig eine inaktivierende Mutation im Kodon 249 eines Allels des Tumorsuppressorgens p53 zu finden. Dies führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der Hepatozyten und somit zu einer Begünstigung des Tumorwachstums (Bailey et al., 1996; Ghebranious & Sell, 1998).

1.1.2 Molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms

Die Leberzelle (Hepatozyt) stellt den Ursprung jedes HCC dar. Im Zuge der Entwicklung einer chronischen Hepatitis und/oder Zirrhose werden viele Hepatozyten zerstört und inflammatorische Zellen invadieren die Leber. Diese Prozesse verändern drastisch die Matrix und die Mikroumgebung der Leber (Bosch et al., 1999; Buendia, 2000). Die Entwicklung des HCC verläuft in drei Schritten: 1. Initiation (Auslöser der malignen Transformation), 2. Promotion (Klonale Expansion und Focusbildung abnormaler Hepatozyten) und 3. Progression (Tumorwachstum) (Dragan & Pitot, 1992; Durr et al., 2000).

Ursache der malignen Transformation sind eine ganze Reihe Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, welche an der Modulation der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind. Auch einige Cyclin-abhängige Kinasen, die den Hepatozyten-Zellzyklus regulieren, spielen dabei eine Rolle. Eine Fehlregulierung kann zur malignen Transformation führen. Wachstumsfaktoren, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an der Karzinogenese von Hepatozyten beteiligt sind, sind z.B. IGF-2 (insulin-like growth factor-2), TGF- α (transforming growth factor- α) und - β , EGF (epidermal growth factor), aFGF (acidic fibroblast growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor) (Caselmann, 1998; Durr et al., 2000; Okuda, 2000).

1.1.3 Konventionelle Therapien gegen HCC

Als kurative Therapieoptionen gelten die Leberteilektomie sowie totale Hepatektomie und Transplantation. Jedoch sind auch die Ansätze wegen der multifokalen Entstehung und im Blut zirkulierende Tumorzellen durch hohe 5-Jahresrezidivraten gekennzeichnet. Während bei Patienten ohne Leberzirrhose ein aggressiveres operatives Management möglich ist, kann die Mehrzahl der Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose selbst bei kleinen, technisch einfach zu resezierenden Tumoren nicht einer onkologisch sinnvollen Resektion zugeführt werden, denn die eingeschränkte Leberfunktion sowie die reduzierte Parenchymreserve (in Verbindung mit einer portalen Hypertension) limitieren die operativen Möglichkeiten (Lau, 2000; Okuda, 2000). Der Einsatz von Chemotherapeutika zur Bekämpfung des HCC ist ebenfalls nur wenig erfolgreich. Dies liegt vor allem an der Funktion der HCC-Zellen, welche in großem Maße Gene exprimieren, die in Medikamenten-Metabolismus und Inaktivierung involviert sind. Auch lokale Therapien (Ethanolinjektion, Thermoablation oder Chemoembolisation) zeigen nur begrenzte Wirkung (Hillert & Rogiers, 2000; Lau, 2000; Di Maio et al., 2002; Carr, 2004). Gerade diese generell schlechte Prognose für Patienten mit HCC macht die Entwicklung neuer Therapien dringlich.

1.2 Angiogenese – die Bildung neuer Blutgefäße

Die Bildung neuer Blutgefäße teilt sich in Vasculogenese und Angiogenese. Als Vasculogenese wird die *de novo* Gefäßbildung aus Angioblasten oder Stammzellen bezeichnet. Angiogenese ist Austreiben (sprouting), Verbindungsbildung (bridging) und Wachstum durch Bildung interstitieller Gewebesäulen in das Lumen bereits bestehender Gefäße (Intussusception) aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Ellis et al., 2001; Jain, 2003). Durch Wachstumsstimulation können ruhende Endothelzellen wieder in den Zellzyklus eintreten, migrieren, die Basalmembran auflösen und ein Lumen bilden (Yancopoulos et al., 2000; Bhushan et al., 2002).

Angiogenese spielt bei verschiedenen biologischen Prozessen eine Rolle, wie z. B. der Wundheilung und der Organregeneration. In der Regel kommt Angiogenese im adulten Organismus nicht vor: die Bildung neuer Blutgefäße ist abhängig von einem streng regulierten System aus pro- und anti-angiogenen Faktoren. Die Verlagerung dieses Gleichgewichts in Richtung der proangiogenen Faktoren wird als „angiogenic switch“ bezeichnet, in dessen Verlauf die Endothelzellen aktiviert werden. Dies findet vor allem

bei der Blutgefäßeinsprossung in Tumoren statt, gilt aber auch für die physiologische, pathologische und Entwicklungsangiogenese (Distler et al., 2002; Tonini et al., 2003).

Angiogenese wird in zwei Phasen gegliedert: Aktivierung („sprouting“) und Auflösung („resolution“). Die Phase der Aktivierung umfaßt a) erhöhte vaskuläre Permeabilität und extravaskuläre Fibrin-Ablagerungen; b) Auflösung der Gefäßwände; c) Degradierung der Basalmembran; d) Zell-Migration und Invasion in die Extrazelluläre Matrix; e) Proliferation der Endothelzellen und f) kapilläre Lumenbildung. Die Phase der Auflösung beinhaltet a) Inhibition der Endothelzellproliferation; b) Beendigung der Zellmigration; c) Rekonstitution der Basalmembran; d) Reifung der Verbindungskomplexe; e) Assembly der Gefäßwände, welches die Rekrutierung und Differenzierung glatter Muskelzellen und Pericyten mit einschließt (Pepper, 2001).

Angiogenese ist abhängig von streng kontrollierten Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Diese Interaktionen werden durch integrale Membranproteine, wie Integrine und extrazelluläre Proteinase und deren Inhibitoren vermittelt (Eliceiri, 2001; Eliceiri & Cheresh, 2001; Pepper, 2001).

Eine große Zahl von Wachstumsfaktoren ist in der Lage, Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu stimulieren. Dazu zählt die FGF (Fibroblast Growth Factor) Familie und deren Tyrosinkinaserzeptoren, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), HIF (Hypoxia inducible Factor) 1- α und HIF2- α und andere. VEGF ist ebenfalls ein Endothelzell-spezifischen Mitogen (Ferrara, 1999; Eliceiri, 2001; Eliceiri et al., 2001), doch konnte mittlerweile gezeigt werden, daß VEGF ein auch über autokrine Mechanismen Einfluß auf Tumorzellen ausübt (Schoeffner et al., 2005).

1.2.1 Tumorangiogenese und deren Inhibition

Die Umschaltung zum angiogenen Phänotyp im Tumor erfolgt bei einer kritischen Größe von ca. 1-2 mm³. Ab dieser Größe ist der Tumor nicht mehr in der Lage, sich allein durch Diffusion zu ernähren und es kommt zu einem Wachstumsarrest. Dies führt zu einer Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, der pH-Wert sinkt in einen kritischen Bereich ab. Als Antwort auf dieses wachstumshemmende Milieu kommt es zur Hochregulierung der beiden Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α . Dies wiederum führt über eine erhöhte Transkriptionsrate und Stabilisierung von RNA zu einer erhöhten Expression von VEGF (Jones et al., 2001; Folkman, 2002). Durch die vermehrte Expression und Sekretion von VEGF werden Endothelzellen

angeregt, neue Gefäße zu bilden und so die Versorgung des Tumors wieder sicherzustellen (Shibuya, 2001).

Es wird postuliert, daß durch die vermehrte Expression pro-angiogener Faktoren das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren zu Gunsten der pro-angiogenen Faktoren verlagert wird. Dies führt zur Bildung neuer Blutgefäße. Werden aber wieder anti-angiogene (angiostatische) Faktoren hochreguliert, verschiebt sich das Gleichgewicht wieder zu Gunsten der angiostatischen Faktoren und die Bildung neuer Blutgefäße bleibt aus.

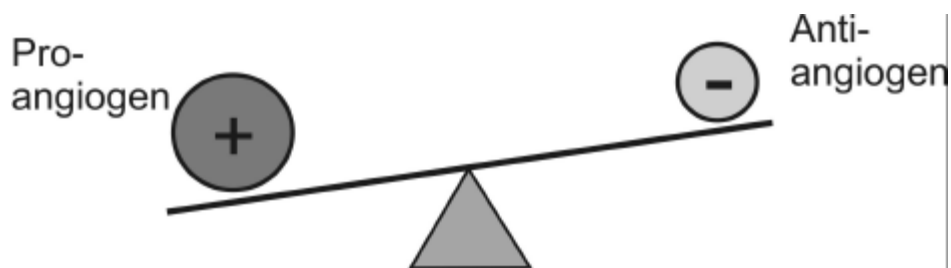


Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema zur Regulation pro- und anti-angiogener Faktoren.

Zu den bisher bekannten anti-angiogenen (angiostatischen) Faktoren zählen unter anderem Thrombospondin-1, interne Fragmente von Precursor-Proteinen wie Angiostatin und Endostatin, TNF- α (Tumor Necrosis-Factor- α), sowie lösliche Formen des VEGF-Rezeptor 1 (sFlt) und VEGF-Rezeptor 2 (sFlk-1) (O'Reilly et al., 1994; Cao et al., 1997; O'Reilly et al., 1997; Raskopf et al., 2005; Schmitz et al., 2005). Die Wirkung der einzelnen angiostatischen Faktoren ist unterschiedlich. Einige inhibieren Proliferation und Migration der Endothelzellen, andere induzieren Apoptose. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über einen Teil der bisher bekannten Angiogenese-Inhibitoren.

Tabelle 1: Übersicht über einige angiostatisch wirksame Faktoren. $\bar{\text{~}}$: wirkt inhibierend; - : wirkt fördernd (zusammengefaßt in (Gasparini, 1999)).

Inhibitor	Ursprung	Wirkungsweise
Angiostatin	Plasminogen	- Endothelzellproliferation - Endothelzellapoptose
Endostatin	Collagen Typ XVIII	- Endothelzellproliferation - Apoptose
Thrombospondin-1	Blutplättchen, Fibroblasten	- Collagen-Synthese - Endothelzell-Proliferation und Migration
IFN- α	Lymphocyten, Phagocyten	- Endothelzellproliferation und Migration - bFGF-induzierte Angiogenese
IFN- β	Fibroblasten, Epithelzellen	- Endothelzellproliferation
IFN- γ	T-Zellen, Natural Killer Cells	wirkt zytotoxisch auf die Endothelzellproliferation
IL-12	Phagocyten, B-Zellen, Mastzellen	- IFN- γ , IP-10
TNF- α	Makrophagen	- bFGF

1.3 Das Vorläuferprotein Plasminogen

Plasminogen ist ein 92 kDa großes Vorläufer-Protein, bestehend aus 791 Aminosäuren (AS). Es setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen: eine Signalsequenz, eine N-terminale Prä-Aktivierungsdomäne, fünf über Disulfidbrücken gekoppelte Kringle-Regionen und eine Serin-Protease-Domäne (Ji et al., 1998). Humanes Plasminogen liegt in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen vor: Typ 1, mit einem O-gebundenen (Thr 345) und einem N-gebundenen (Asn 289) Oligosaccharid und Typ 2 mit zwei O-gebundenen Oligosacchariden (Ser 248 und Thr 345). Weiterhin enthält Plasminogen verschiedene Protease-Erkennungssequenzen, wie z.B. für Elastase (4 Schnittstellen), Aureus V8 Protease, Pepsin und für die aktivierenden Proteasen uPa (Urokinase Plasminogen Aktivator) und tPa (Gewebe Plasminogen Aktivator)(Novokhatny et al., 1984; Soff, 2000).

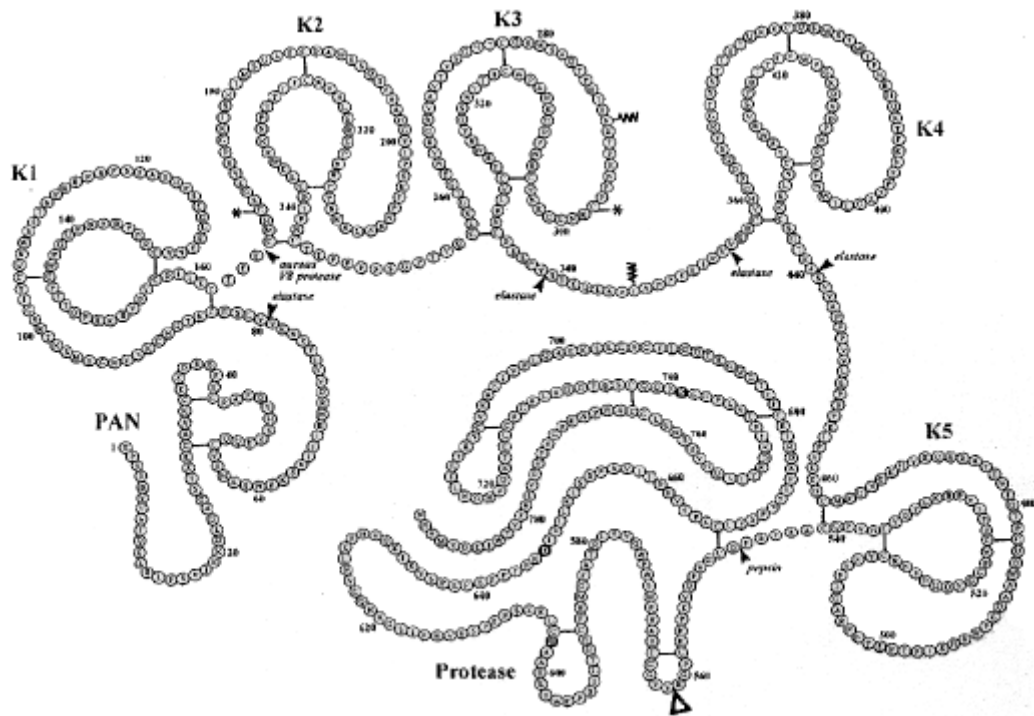


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Gesamtplasminogen (Soff, 2000). Dargestellt sind die Signalsequenz, Prä-Aktivierungsdomäne, alle fünf Kringle-Regionen, sowie eine Serin-Protease-Domäne. Zusätzlich sind alle bekannten enzymatischen Restriktionsstellen angegeben.

Die Aktivierung dieses im Blut zirkulierenden Zymogens wird durch spezifische Serinproteasen vermittelt, die Plasminogen zwischen AS 560 (Arg) und 561 (Val) spalten. Daraus resultiert die aktive Serin-Protease Plasmin. Es handelt sich dabei um ein heterodimeres Enzym, dessen zwei Polypeptidketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die N-terminale A-Kette enthält die fünf sog. Kringle-Regionen (K). Die C-terminale B-Kette enthält die Serin-Protease-Domäne, welche für die katalytische Aktivität verantwortlich ist (Robbins et al., 1967). Die konservierten Kringle-Regionen kommen ebenfalls in vielen anderen Proteinen vor, die bei Blutgerinnung und Fibrinolyse eine Rolle spielen. Viele dieser Kringle-Regionen, so auch die Kringle-Regionen 1 und 4 von Plasminogen/Plasmin besitzen eine Lysin-Bindungsstelle, wodurch eine Interaktion mit Fibrin, Matrixproteinen und Zellrezeptoren gewährleistet wird (Novokhatny et al., 1984). Die aktive Proteinase Plasmin (mit einer Größe von 90 kDa) katalysiert die Degradation von Proteinen der Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Dies geschieht durch Hydrolyse von Peptidbindungen an der C-terminalen Seite von Lys und Arg. Dadurch wird u.a. die Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe ermöglicht. Es gibt zwei verschiedene Arten von Plasminogen-Aktivatoren: Der Urokinase-Typ (uPa) und Gewebe-Typ (tPa). uPa spielt

eine große Rolle in der Tumorbilogie, während die Rolle von tPa in der Generierung von Plasmin für Fibrinolyse und Blutgefäße liegt. Weiterhin gehören zum Plasminogen-Aktivierungssystem die inhibitorisch wirkenden Serpine PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) und PAI-2, sowie der uPa-Rezeptor (uPAR) (Schmitt et al., 1997; Andreasen et al., 2000).

1.3.1 Charakterisierung der einzelnen Kringleregionen

Die fünf Kringleregionen des Plasminogen haben für sich oder in Kombination miteinander unterschiedliche Wirkungsweisen. Für Kringle 1 (K1) konnte eine dosisabhängige Inhibition der Endothelzellproliferation nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für Kringle 2 (K2) und Kringle 3 (K3), wobei der antiproliferative Effekt von K2 geringer ist. K4 (Kringle 4) zeigt nur einen schwachen antiproliferativen Effekt im Vergleich zu K1. Dies liegt wahrscheinlich an den positiv geladenen Lysin-Paaren (angrenzend an Cys 22 und Cys 80). Kringle 5 (K5), der wie K4 eine Lysinbindungsstelle besitzt, zeigt eine mit K1 vergleichbare antiproliferative Wirkung. K1 und K5 besitzen keine positiv geladenen Lysin-Bindungsstellen (Cao et al., 1996; Cao et al., 1997).

Die Kombination verschiedener Kringleregionen kann die angiostatische Wirkung steigern, aber auch inhibieren. Das Fragment K2-3 führt nur zu einer schwachen antiproliferativen Wirkung, die mit K2 alleine vergleichbar ist. Es wird daher vermutet, daß die angiostatische Wirkung von K3 durch die Bindung mit K2 inhibiert wird. Eine Kombination aus beiden Einzelfragmenten hingegen zeigt eine sehr starke antiproliferative Wirkung. Die Kombination von K1 mit K2 oder K4 führt ebenfalls zu einer erhöhten antiproliferativen Wirkung verglichen mit den einzelnen Kringleregionen (Cao et al., 1996).

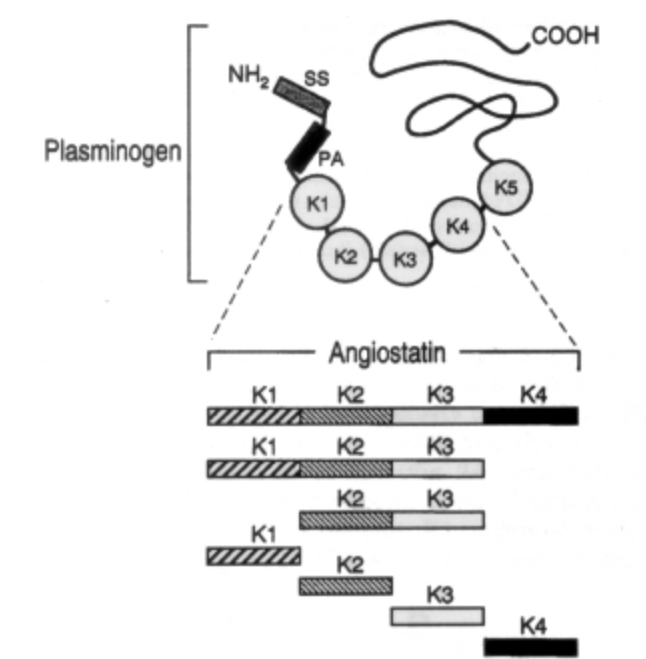


Abbildung 3: Darstellung der verschiedenen Kringleregionen (Cao et al., 1996).

1.3.2 Das Spaltprodukt Angiostatin

Am besten untersucht ist Angiostatin, es umfaßt die Kringleregionen 1-4 (K1-4) von Plasminogen. Aufgrund verschiedener Protease-Erkennungssequenzen innerhalb des Proteins kann Plasminogen/Plasmin in verschiedene Angiostatin-Derivate gespalten werden. Angiostatin ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese, welcher speziell proliferierende Endothelzellen angreift. O'Reilly und Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß Angiostatin die bFGF (basic fibroblast growth factor)-induzierte Endothelzellproliferation *in vitro* und die bFGF-induzierte Angiogenese *in vivo* inhibiert (O'Reilly et al., 1994; Folkman, 1995; Cao et al., 1996). Angiostatin wird nicht direkt von Tumorzellen exprimiert, wie in einer Studie gezeigt werden konnte, sondern es entsteht durch Cleavage von Plasminogen durch die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2, Gelatinase A) (O'Reilly et al., 1999). O'Reilly und Arbeitsgruppe postulieren, daß im Laufe der erhöhten Plasminogen-Expression im Tumor auch die Rate an Angiostatin zunimmt, was zu einer Inhibition des Metastasen-Wachstums führt. Dies begründet sich durch die erhöhte Permeabilität der Blutgefäße im Tumor, wodurch vermehrt Plasminogen in den Blutkreislauf gelangt, welches dann andernorts zu Angiostatin gespalten wird. Dieses zirkulierende Angiostatin führt dann zur Inhibition der Metastasen (O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1999). Weiterhin führt Angiostatin im Tumor zu einer Herabregulation von VEGF, was zu einer Inhibition des Wachstums führt (Hajitou et al., 2002).

Ein Angiostatin-ähnliches Molekül, bestehend aus den Kringleregionen 1-3 (K1-3) ist in seiner antiangiogenen Wirkung potenter als Angiostatin. K1-3 kann physiologisch durch Elastase-Verdau von Plasminogen/Plasmin synthetisiert werden. Die antiproliferative Wirkung von K1-3 ist deutlich größer als bei Angiostatin (Cao et al., 1996). K1-3 inhibiert die Migration von Endothelzellen (Schmitz et al., 2002). Dies führt zu einer Inhibition der Neo-Angiogenese, was zu einer vermehrten Apoptoserate in Tumorzellen führt (Griscelli et al., 1998).

Ein Sonderfall der Angiostatin-ähnlichen Moleküle stellt das Plasminogenderivat muthPlgK3 dar. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Angiostatin-Derivaten, die entweder aus cDNA oder auf Proteinebene durch Elastase-Verdau entstehen, wurde hier strangabwärts K3 anstelle der AS 1069 bis 1072 von humanem Plasminogen eine Erkennungsstelle für die Endoprotease Furin eingeführt. Durch diesen neuartigen Ansatz können auf Proteinebene die ersten drei Kringleregionen gespalten und freigesetzt werden. Die Spaltung nicht aller mutierter Plasminogenmoleküle ist dabei beabsichtigt. Auf diese Weise soll der angiostatische Effekt durch eine synerge Wirkung der verschiedenen Spaltprodukte gesteigert werden. Schmitz et al. konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, daß muthPlgK3 in seiner Wirkung mit rekombinantem K1-3 vergleichbar ist. Beide hemmen signifikant die Endothelzellproliferation und -migration, die VEGF-induzierte Angiogenese und das Tumorwachstum in verschiedenen Mausmodellen (Schmitz et al., 2002).

Ein weiteres, Angiostatin-ähnliches Molekül ist Kringle 1-5 (K1-5): Plasmin ist in der Lage, sich selbst durch Autoproteolyse strangabwärts AS 77 (Lys) und AS 529 (Arg) in das interne Fragment K1-5 abzuspalten. Das Fragment (auch als Angiostatin_{4,5}, oder K1-4.5 bezeichnet), setzt sich aus den Kringleregionen 1-4, sowie 85 % von Kringle 5 zusammen. Dieses 452 AS große Fragment ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein hoch potenter Inhibitor der bFGF-induzierten Angiogenese. K1-5 hemmt die Endothelzellproliferation und somit auch Neovaskularisierung und Tumorwachstum im Mausmodell. Im Vergleich zu Angiostatin ist K1-5 ein wesentlich stärkerer Inhibitor der Angiogenese. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß dieses Fragment nicht nur auf die Endothelzellproliferation wirkt, sondern auch durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade Endothelzellen in die Apoptose führt (Cao et al., 1999; Hanford et al., 2003).

1.4 Die Endoprotease Furin

Die ubiquitär vorkommende Endoprotease Furin ist 794 AS groß und zählt zu den Typ-I Transmembranproteinen. Das Enzym findet sich in allen Vertebraten und vielen Invertebraten. Die große extrazelluläre Domäne ist homolog zu der entsprechenden Domäne anderer Familienmitglieder der Protein-Convertasen (PC). Die PC-Familie wiederum zählt zur Subtilisin Superfamilie der Serin-Endoproteasen. Die größte Homologie findet sich in der Subtilisin-ähnlichen Domäne. Diese aus 3 AS bestehende Domäne (-Asp-His-Ser-) wird als „Catalytic Triad“ bezeichnet. Neben dem Signal-Peptid, welches die Translokation des Proenzym in das Endoplasmatische Retikulum steuert, enthält Furin zusätzliche Prodomänen, welche N-terminal von der Signal-Peptidase-Schnittstelle und C-terminal von einem konservierten Satz basischer AS flankiert werden. Diese Prodomäne spielt eine entscheidende Rolle für die Faltung, Aktivierung, den Transport der PCs und für Regulierung der PC-Aktivität. Furin und andere PCs haben eine sog. P-Domäne, welche essentiell für die Enzymaktivität und die Modulation des pH-Werts und des Calcium-Bedarfs ist. Die cytoplasmatische Domäne kontrolliert die Lokalisierung und das Sorting von Furin im *trans*-Golgi-Netzwerk und im endosomalen System (Nakayama, 1997; Molloy et al., 1999).

Furin wandelt eine große Zahl an Vorläuferproteinen in aktive Proteine um. Dazu zählen verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Pro-Insulin-like growth factor), Hormone (z.B. pro-parathyroid hormone), Plasmaproteine (z.B. Proalbumin), Rezeptoren (z.B. Insulin-pro receptor), Matrixmetalloproteinasen (z.B. Stromelysin-3), virale Envelope Glykoproteine (z.B. Cytomegalovirus Glykoprotein B) und bakterielle Exotoxine (z.B. Anthrax protective antigen). Furin erkennt bevorzugt eine Konsensus-Sequenz aus der AS-Folge -Arg-X-Lys/Arg-Arg-, wobei die Schnittstelle strangabwärts dem C-terminalen Arg liegt. Furin schneidet auch ähnliche (-Arg-X-X-Arg- oder -Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg) Sequenzen, allerdings nicht so effektiv (Nakayama, 1997).

1.5 Genterapie solider Tumoren

1.5.1 Allgemeine Einführung

Die Genterapie stellt einen neuen Ansatz dar, Krankheiten zu behandeln, deren Fortschreiten zu verhindern oder zu verlangsamen. Das Prinzip basiert darauf, genetisches Material (in Wildtypform oder genetisch verändert) in krankhaft veränderte, oder auch gesunde Zellen einzubringen. Um die Transduktion der Zellen zu

gewährleisten, wird das genetische Material in der Regel durch Vektoren in die Zellen gebracht. Diese Vektoren werden in zwei Klassen eingeteilt: virale und nicht-virale Vektoren. Virale Vektoren werden in der Regel wegen ihrer höheren Transduktions-Effizienz bevorzugt. Sie können wiederum in zwei Klassen unterteilt werden: Langzeit-exprimierende (Retroviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV) und „gutless“ Adenoviren) und Kurzzeit-exprimierende (Erstgenerations-Adenoviren (Ad)) Viren (Prieto et al., 2003). Zu den nicht-viralen Vektoren zählen kationische Lipide. Aber auch nackte DNA kann, z.B. durch Elektroporation oder ballistischen Transfer in die Wirtszelle eingebracht werden.

Gene, die zur Therapie von malignen Erkrankungen eingesetzt werden, decken ein breites Spektrum ab. So werden Gene (in den meisten Fällen Tumorsuppressorgene) eingesetzt, deren Produkte Apoptose auslösen (P53, PTEN, ARF, INK4A-KIP1-Fusionsprotein, APC) oder die Proliferation blockieren (INK4A, RB, p130, BRCA1; (McCormick, 2001)). Andere Gene lösen eine Immunantwort gegen Tumorzellen aus (Interleukin-12, CD40-Ligand, B7; (Sun et al., 2000; Barajas et al., 2001)).

Das genetische Material, welches in der Gentherapie eingesetzt wird, besteht nicht nur aus DNA, es kann auch RNA in die Zelle eingebracht werden, um so die Expression eines schädlichen Gens zu inhibieren. Antisense-Oligonucleotide sind Moleküle, die komplementär zu einem Teil der Ziel-RNA sind, daran binden und RNaseH-Aktivität induzieren. Durch Degradation und ribosomalen Arrest wird die Translation physikalisch blockiert, das Gen wird nicht exprimiert (Kurreck, 2003). Small interfering RNA (siRNA) sind doppelsträngige Ribonucleotide, welche an die mRNA binden und dadurch deren Degradation veranlassen (Elbashir et al., 2001). Ribozyme, RNA-Moleküle mit einer katalytischen Aktivität, können eingesetzt werden, um spezifisch mRNA zu schneiden, um so deren Expression zu inhibieren (Cech, 2002).

1.5.2 Adenovirale Vektoren

Adenoviren sind lineare doppelsträngige DNA-Viren mit einer Größe von ca. 35 Kilobasen (kb). Beide DNA-Stränge werden transkribiert und fast alle Transkripte werden in großem Umfang gespleißt. Virale Transkriptionseinheiten werden in der Regel als frühe (E1, E2, E3 und E4) und späte Regionen bezeichnet. Dies ist abhängig vom Zeitpunkt der Transkription relativ zum Start der viralen DNA-Replikation. Die hohe Dichte und Komplexität der viralen Replikation schränkt die Manipulation der Adenoviren auf die frühen Regionen E1, E2A, E3 und E4 ein. In den meisten

rekombinanten Vektoren werden Transgene anstelle der E1 oder E3 Region inseriert. Die E1-Deletion führt zu defektiven Viren, die nicht in der Lage sind sich zu replizieren. Die E3 Region codiert für Proteine, welche die Immunantwort des Wirts umgehen und so die Replikation des Virus ermöglichen (Kay et al., 2001; Modrow, 2002)

Aufgebaut ist ein Adenovirus aus einem icosaedrischen Capsid mit einem Durchmesser von 60 – 90 nm und einem internen DNA/Protein-Kern. Das äußere Capsid besteht aus 252 Capsomeren und ist so arrangiert, daß 240 Hexone und 12 Pentonbasen gebildet werden. Diese sind an jedem Pentonbasisprotein lokalisiert, von welchen die Antennen-ähnlichen Fiberproteine abstehen. Diese Fiberproteine ermöglichen es dem Virus, während der Infektion über den Coxsackie Adenovirus Rezeptor an die Zelle anzudocken. Die Serotypen 2 und 5 der Untergruppe C werden hauptsächlich in der Gentherapie maligner Erkrankungen eingesetzt. In Wildtypform vorkommend können Adenoviren beim Menschen Grippe-ähnliche Symptome auslösen (He et al., 1998; Modrow, 2002).

Transgene, die durch adenoviral vermittelten Gentransfer in die Wirtszelle gelangen, werden nur transient exprimiert, da sie nicht in das Wirtsgenom integrieren. Zusätzlich werden adenovirale Proteine vom Immunsystem des Wirtsorganismus erkannt und eine Immunantwort gegen diese Antigene ausgelöst (Harui et al., 1999).

Adenovirale Vektoren haben einen natürlichen Hepatropismus: sie transduzieren bevorzugt Hepatozyten und akkumulieren dadurch spontan in der Leber. Dies macht sie gerade für die Therapie von Lebertumoren interessant (Roy-Chowdhury & Horwitz, 2002). Vorteilhaft ist weiterhin, daß sie sehr gut ruhende, sich nicht teilende Zellen infizieren und in hohen Titerstufen (bis 1×10^{13} pfu/ml) hergestellt werden können (Kay et al., 2001).

1.5.3 Angiostatische Gentherapie

Im Gegensatz zur Immuntherapie und der Gentherapie defekter Tumorsuppressorgene, zielt die angiostatische Gentherapie nicht auf die Bekämpfung der Tumorzellen selbst ab, sondern auf die Blutgefäße, welche den Metabolismus des Tumors ermöglichen (Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie Abtransport von Abfallprodukten). Ziel sind die Endothelzellen, aus denen neue Blutgefäße gebildet werden. Verschiedenste angiostatisch wirksame Moleküle sind mittlerweile bekannt, welche in unterschiedlichen Tumormodellen mittels adenoviralem Gentransfer getestet worden

sind. Dazu zählen Angiostatin und Angiostatin-ähnliche Moleküle (Griscelli et al., 1998; Schmitz et al., 2004; Schmitz et al., 2004), Endostatin (Schmitz et al., 2004), sFlk-1 (Raskopf et al., 2005), sFlt (Schmitz et al., 2005), PEDF (Wang et al., 2003), Apolipoprotein A (Yu et al., 2005) und andere.

Die adenoviral vermittelte Gentransfer angiostatischer Faktoren wurde bisher bereits in mehreren Tumormodellen untersucht. So führt die intratumorale Gabe von AdPEDF in einem Lungentumormodell zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich mit unbehandelten Tieren. Gleichzeitig wird eine Abnahme der Blutgefäßdichte im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnet. Die systemische Gabe von AdPEDF führt im gleichen Tumormodell und in einem HCC-Modell ebenfalls zu einer Reduktion der Blutgefäßdichte und dadurch auch, verglichen mit den Kontrolltieren, zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens (Wang et al., 2003).

Endostatin, das C-terminale Fragment von Collagen TypXVIII wirkt inhibierend auf VEGF. Die systemische Gabe des adenoviralen Vektors codierend für Endostatin inhibiert die Blutgefäßbildung in Brust- und Lungentumoren, was in einem verminderten Tumorwachstum resultiert. Darüber hinaus wird auch die Bildung von Mikrometastasen der primären Lungentumoren in der Lunge vollständig inhibiert (Sauter et al., 2000; Schmitz et al., 2004).

Zwei weitere Angiogenese-Inhibitoren, lösliche Fragmente der VEGF-Rezeptoren 1 (sFlt) und 2 (sFlk-1) inhibieren bei systemischer Gabe der adenoviralen Konstrukte bis zu 80 % das Tumorwachstum im Vergleich zu nicht behandelten Kontrolltieren. Dies wurde sowohl in einem murinen Lungenkarzinom-Modell, als auch in einem humanen Pankreaskarzinom-Modell untersucht (Kuo et al., 2001). Gentransfer für eine lösliche Form von sFlk-1 zeigte in einem Hepatom-Modell eine Hemmung des Tumorwachstums um 70 % (Raskopf et al., 2005). sFlk-1 wurde bereits von Davidoff und Arbeitsgruppe in einen AAV-Vektor inkloniert und dessen angiostatische Wirkung nach intraportaler Injektion untersucht. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß in dem untersuchten Nierentumor-Modell neben 67 % Inhibition des Tumorwachstums (verglichen mit der Kontrolle) die Expression von sFlk-1 auch nach 25 Wochen noch nachweisbar und angiostatisch wirksam ist (Davidoff et al., 2002).

Angiostatin, von dem mittlerweile unterschiedliche Derivate vorliegen (K1-3, K1-4, muthPlgK3, K1-4.5, K1-5), werden ebenfalls zur angiostatischen Therapie mittels adenoviraler Vektoren eingesetzt. Bereits 1998 konnte gezeigt werden, daß die

intratumorale Gabe von AdK1-3 in einem Gliom-Modell in der Ratte und einem Brustkarzinom-Modell in der Maus zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums in beiden Modellen führt und auch die Blutgefäßbildung stark reduziert ist (Griscelli et al., 1998). Die Wirkung von Angiostatin (K1-4) führt in einem in die Lunge metastastierenden Brustkrebs-Modell nach intranasaler Gabe zu einer Verringerung der Metastasenanzahl und -größe (Gyorffy et al., 2001). Erst vor kurzem konnte in einem humanen Brustkrebsmodell die Wirkung von K1-5 durch adenoviral vermittelten Gentransfer gezeigt werden: AdK1-5 führte dabei zu einer Inhibition des Tumorwachstums um 90 % mit einer vollständigen Tumorregression von 40 % (Galaup et al., 2005). Das Angiostatin-ähnliche Molekül hPIgmutK3, welches durch Proteolyse generiert wird, wird ebenfalls durch adenoviralen Gentransfer in die Tumorzellen eingebracht. Die systemische Gabe von AdmuthPIgK3 führt in einem HCC-Tumormodell in der Maus zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums. Auch mit AdK1-3 konnte im gleichen Tumormodell eine signifikante Hemmung beobachtet werden (Schmitz et al., 2002). Eine verlängerte Expressionszeit von Angiostatin wird, wie auch schon für sFlk gezeigt, durch AAV-Vektoren erreicht. AAV-vermittelter Transfer von Angiostatin-Gen führte in einem Gehirntumor-Modell in der Ratte zu einer signifikanten Reduktion des Tumovolumens und zu einem Langzeitüberleben von 5 Wochen bei 40% der therapierten Tiere (Ma et al., 2002). Ein ähnlicher AAV-Vektor, ebenfalls kodierend für Angiostatin, konnte nach intraportaler Injektion in einem Leber-Metastasen-Modell in der Maus das Metastasenvolumen und zu über 70% die Metastasierung hemmen. Das Langzeitüberleben wurde durch die AAV-Gabe ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollgruppen verdoppelt (Xu et al., 2003).

Zusätzlich zum viralen Gentransfer von Angiostatin-Gen kann die Therapie in Kombination mit einer Radiotherapie durchgeführt werden. So konnte in einem Gliom-Tumormodell in der Ratte gezeigt werden, daß durch die Kombination von Ad-K1-3 mit einer Radiotherapie signifikant höhere antitumorale Effekte zu beobachten waren, als bei der Therapie mit nur einer Komponente (Griscelli et al., 2000).

Nicht-adenoviraler Gentransfer angiostatischer Moleküle umfasst zum einen den *ex vivo* Gentransfer, oder auch die Einbringung von DNA in die Tumorzellen durch Liposomen. Vor kurzem konnte zum ersten mal in einem HCC-Modell die angiostatische Wirkung von Angiostatin in einem *ex vivo*-Modell gezeigt werden. Die Implantation von mit Angiostatin-Gen stabil transfizierten HCC-Zellen in Mäuse führt zu einem antitumoralen Effekt: je höher der Anteil der transfizierten Zellen im Tumor ist, desto geringer ist

dessen Blutgefäßdichte und Volumen (Ishikawa et al., 2003). Gentransfer des Angiostatin-Gens (einkloniert in einen eukaryontischen Expressionsvektor) durch Liposomen führt bei intratumoraler und systemischer Gabe in einem Mammakarzinom-Modell zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgroße und der Metastasierung (Sacco et al., 2000; Sacco et al., 2001).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Für fortgeschrittene Stadien des HCC sind aktuell keine systemischen Therapien verfügbar. Kurative Ansätze wie die Lebertransplantation kommen in dieser Situation nicht in Frage, so daß sich weiterhin die Betreuung von HCC-Patienten auf palliativ-supportive Maßnahmen beschränkt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine potentiell systemische Therapie für die Behandlung des fortgeschrittenen HCC im experimentellen Tumormodell zu entwickeln. Dazu sollen verschiedene Plasminogenderivate (Plasminogen-cDNA von Kringle 1-4 (rhPlgK1-4) und 1-5 (rhPlgK1-5), Plasminogen mutiert hinter Kringle 4 (muthPlgK4) und 5 (muthPlgK5), sowie Wildtyp Plasminogen cDNA (wthPlg) synthetisiert und deren angiostatische Wirksamkeit durch adenoviralen Gentransfer *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Hereaus Sepatech (Osterode)
Durchflußzytometer	Epics XL, Beckman Coulter (Krefeld)
Elektrophorese-Kammer (DNA)	Biorad (München)
Elektroporationsgerät	Easyjet, EquiBio (Maidstone, UK)
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Festwinkelrotor	SW50 TI, Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Gefriermikrotom	Leica (Wetzlar)
Gel-Video-Printer	Mitsubishi (Japan)
Kühlzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Minishaker	IKA, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Netzgerät (Elektrophorese)	Biorad (München)
PCR-Cycler	Eppendorf GmbH (Hamburg)
pH-Elektrode	Hannah Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer	Gene Quant, Pharmacia (Freiburg)
Schüttler	ProMax 2000, Heidolph (Kelheim)
Sicherheitswerkbank	Hereaus Sepatech (Osterode)
Swing Out Rotor	SW41 TI, Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Thermomixer	Eppendorf GmbH (Hamburg)
Tischzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Ultrazentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
UV-Tisch	Berthold (Pforzheim)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänningen)
Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge	DuPont (Bad Homburg)
Sorvall GSA (Rotor)	DuPont (Bad Homburg)
Sorvall SS34 (Rotor)	DuPont (Bad Homburg)

2.2 sonstiges Material

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Cryo-Röhrchen (2 ml)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)

Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
6-, 24-, 96-Well-Platten	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (100 mm)	Greiner Labortechnik GmbH (Frickenhausen)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Optiseal Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
offene Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Dialyse-Kammer (10.000 MWCO)	Perbio (Bonn)
Einmal-Kanüle (20G x 1½)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Spritzen (Amefa 2ml, 5 ml, 10 ml)	B.Braun (Melsungen)
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Nahtmaterial resorbierbar, Maxon HR13 (1m, USP 5/0)	Aesculap (Tuttlingen)
Elektroporationsküvette	EquiBio (Maidstone, UK)
Quarzküvette	Hellma (Mühlheim)
Dako Pen	Dako Cytomation GmbH (Hamburg)
Chirurgische Instrumente	Martin, Tuttlingen
Skalpell (Cutfix No. 22)	Aesculap (Tuttlingen)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser (Braunschweig)
FACS-Röhrchen, 5ml (75 mm x 12 mm)	Labomedic (Bonn)

2.3 Reagenzien

2.3.1 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB Biolabs (Frankfurt a. M.) bezogen.

RQ1 DNase	Promega (Mannheim)
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
RNAsin	Promega (Mannheim)
Platinum-Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
RNase A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Proteinase K	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	NEB Biolabs (Frankfurt a. M.)

2.3.2 Kits

AccepTor pSTBlue-1 Vektor-Kit	Novagen (Madison, WI, USA)
GenElute Plasmid MiniPrep Kit	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nucleobond AX100 MidiPrep Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Nucleobond AX500 MaxiPrep Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Wizard PCR Preps	Promega (Mannheim)
GeneEditor Site Directed	Promega (Mannheim)
Mutagenesis Kit	
GenElute Total Mammalian RNA-Kit	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nucleobond RNAII Kit	Macherey & Nagel (Düren)
RedTaq Ready Mix	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Complete Mini	Roche (Mannheim)
Protease-Inhibitoren Mix	
BrdU-Proliferation Assay	Roche (Mannheim)

2.4 Bakterienstämme

XL1-blue	erhalten von Dr. Volker Schmitz (Bonn)
BMH-7118	Promega (Mannheim)
DH10-B	erhalten von María-Á. Gonzalez-Carmona (Bonn)
BJ 5183	erhalten von Dr. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
NovaBlue Singles	Novagen (Madison, WI, USA)

2.5 Zelllinien

2.5.1 911-Zellen

Diese Zelllinie stammt aus humanen embryonalen Retinoblasten. Die Zellen sind mit der E1-Region des humanen Adenovirus Typ 5 stabil transformiert, so daß sich in dieser Zelllinie replikationsdefiziente Adenoviren vermehren lassen (Fallaux et al., 1996). Diese Zellen werden in DMEM mit Glutamax, 10 % FCS und 50 u/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. Die Zellen werden mit Accutase abgelöst.

2.5.2 HEK 293-Zellen

Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie aus embryonalem Nierenepithel des Menschen. HEK 293-Zellen (ATCC CRL-1573) sind zusätzlich mit einem Fragment des humanen

Adenovirus Typ 5 stabil transformiert, wodurch sie sich als Verpackungszellen zur Virusproduktion eignen. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgt analog zu 2.5.1.

2.5.3 A549-Zellen

A549-Zellen (ATCC CCL-185) sind humane Lungenkarzinom-Zellen. Die Zellen wachsen adhärent und zeigen eine epitheliale Morphologie. A549-Zellen werden wie in 2.5.1 beschrieben kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wird Trypsin/EDTA-Lösung verwendet.

2.5.4 HUVE-Zellen

Human umbilical endothelial vein cells (HUVEC, CascadeBiologics Inc., Portland) sind menschliche Endothelzellen, welche aus der Nabelschnur gewonnen werden. Die Kultivierung erfolgt in Medium200 mit LSGS. Zur Ablösung der Zellen wird Accutase verwendet.

2.5.5 LLC1-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine murine Zelllinie des Lewis Lungen Karzinoms, LLC (ATCC CRL-1642). Diese Zelllinie wurde aus einem Lungentumor aus C57bl/6 Mäusen etabliert. Diese Zellen wachsen adhärent. Sie werden wie in 2.5.1 beschrieben kultiviert und mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst.

2.5.6 Hepa129-Zellen

Diese Zelllinie Hepa129 hat ihren Ursprung aus einem Tumorfragment. Dieses stammt aus einem murinen HCC, welcher aus einer C3H-Maus isoliert wurde. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um eine Suspensionszelllinie, welche in RPMI1640 mit Glutamax, 10 % FCS und Pen/Strep kultiviert wird.

2.6 Tierstämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Tierstämme wurden von der Firma Charles River bezogen. Für die tierexperimentellen Studien wurden männliche Tiere mit einem Alter von sechs bis acht Wochen verwendet.

2.6.1 BL/6 (C57BL/6NCrI)

Aus einer Kreuzung des Bestandes von „Miss Abby Lathrop“, entwickelt 1921 von C. C. Little. Die Linien 6 und 10 wurden 1937 separiert. 1948 von Hall zum Jackson Labor. Vom Jackson Labor 1951 zum NIH (32. Generation). Zu Charles River Laboratories 1974 von NIH. 1975 wurde die Zucht hysterektomiert.

Dieser Stamm ist syngen zur Lewis Lungekarzinom-Zelllinie LLC1.

2.6.2 C3H/N (C3H/HeNCrI)

Strong (1920) entwickelte diesen Stamm aus einer Kreuzung eines „Bagg Albino“-Weibchens und eines DBA/J-Männchens. Ein Wurf von vier Weibchen und zwei Männchen wurde 1930 an Andervont weitergegeben; zu Heston in der 35. Generation. Zum NIH in der 57. Generation (1951). Von dort 1974 zu Charles River Laboratories. Die Hysterektomie erfolgte 1975.

Dieser Mausstamm ist syngen zur HCC-Zelllinie Hepa129.

2.6.3 BALB/c (BALB/cAnNCrI)

H. J. Bagg entwickelte den „Bagg Albino“ 1913 aus dem Bestand eines Ohio-Züchters. Die Inzucht erfolgte 1923 durch Mc Dowell. Zu Snell in 1932 (F26); zu Andervont in 1935. In der Generation F72 von Andervont zum NIH. 1974 zu Charles River Laboratories, 1975 dort hysterektomiert.

2.7 verwendete Primer

Die hier verwendeten Primer wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) synthetisiert.

2.7.1 Primer zur Synthese der Furin-Restriktionsstelle

2.7.1.1 Primer für das GeneEditor Site directed Mutagenesis System

MuthPlgK4:

5'- P-G AAA AAA TGC TCA CGG AGG AGT GTT GTA GCA C -3'

MuthPlgK5:

5'- P-G GCC CCT TCA TTT AGA CGT AGG AGG CCT CAA GTG GAG C -3'

2.7.1.2 Primer für die PCR-basierte Mutagenese

PlgmutK4for:

5'- CAA CCT GAA AAA ATG CTC ACG GAG ACG GAG TGT TGT AGC ACC TCC C -
3'

PlgmutK4rev:

5'- CGG AGG TGC TAC AAC ACT CCT CCG TCT CCG TGA GCA TTT TTT CAG GTT
G -3'

PlgmutK5for:

5'- GTG TGC GGC CCC TTC ATT TAG ACG TAG GAG GCC TCA AGT GGA GCC
GAA G -3'

PlgmutK5rev:

5'- CTT CGG CTC CAC TTG AGG CCT CCT ACG TCT AAA TGA AGG GGC CGC
ACA A -3'

2.7.2 Primer zur Synthese von rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 cDNA

T7-Primer :

5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'

PlgK1-4rev:

5'- AAG CTT TTA CGC TTC TGT TCC -3'

PlgK1-5rev:

5'- AAG CTT TTA AAA TGA AGG GGC -3'

2.7.3 Kontrollprimer für die RT-PCR

β -Actin (human) right:

5'- GAACTTTGGGGATGCTCGC -3'

β -Actin (human) left:

5'- CGGGAAATCGTGCGTGACAT -3'

β -Actin (murin) for:

5'- TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG -3'

β -Actin (murin) rev:

5'- TTTGATGTCACGCACGATTTCC -3'

2.7.4 Primer für die Sequenzierung

Signal I:

5'- GCGGCCGCATGGAACATAAGGAAGTGGTTC -3'

PlgSeq:

5'- ACC TGT CAG CAC TGG AGT -3'

Signalrev:

5'- GAA TGC CCT GCA GGT GAA TTC -3'

K4for:

5'- GCTGGCCTGACAATGAAC -3'

K5rev:

5'- ATATCAAGGTGCCTCCAC -3'

2.8 Reagenzien für die Zellbiologie

DMEM (4,5 g Glucose, mit Glutamax)	Sigma (Taufkirchen)
DMEM/Ham`s F-12	Sigma (Taufkirchen)
RPMI 1640 (mit Glutamax)	PAA (Cölbe)
HBSS	Sigma (Taufkirchen)
Medium200	Cascade Biologics Inc. (Portland, OR, USA)
OptiMEM	Invitrogen (Mannheim)
Fötale Kälberserum	PAA (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin	Sigma (Taufkirchen)
LSGS	Cascade Biologics Inc. (Portland, OR, USA)
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma (Taufkirchen)
Accutase	PAA (Cölbe)
Matrigel	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Lipofectamine	Invitrogen (Mannheim)
rekombinantes humanes VEGF	Sigma (Taufkirchen)

2.9 Reagenzien für die Molekularbiologie

Agarose	Serva (Heidelberg)
100 bp-Leiter	Promega (Mannheim)
1 kb-Leiter	Invitrogen (Mannheim)

2.10 Reagenzien und Lösungen für die Mausmodelle

Ketavet	Pharmacia (Erlangen)
Rompun	Bayer (Leverkusen)
NaCl (0,9 %)	B. Braun (Melsungen)

2.11 Reagenzien für die Histologie

rat anti mouse CD31	Cedarlane (Hornby, Ontario, Kanada)
rabbit anti rat (Biotin)	Dako Cytomation GmbH (Hamburg)
Aquatex	Merck (Darmstadt)
Antibody Diluent	Dako Cytomation GmbH (Hamburg)
Biotin Blockierungssystem	Dako Cytomation GmbH (Hamburg)
Mayers Hämalaun	Sigma (Taufkirchen)
Streptavidin-Biotin HRP/AEC	Dako Cytomation GmbH (Hamburg)

2.12 sonstige Reagenzien

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka Feinchemikalien GmbH (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co (Heidelberg) und Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen.

2.13 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Phosphate buffered saline (PBS)

NaH ₂ PO ₄	20,0 mM
NaCl	50,0 mM
pH 7,4	

LB-Medium

Bactotrypton	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
ad 1000 ml A. bidest	

Der pH-Wert wird auf 7.0 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

LB-Agarplatten

Bacto-Agar	15 g
LB-Medium	1000 ml

LB-Medium mit dem Agar autoklavieren und auf 50 °C abkühlen lassen.
Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugeben, mischen und auf Kulturschalen verteilen.

2.13.1 Lösungen für die Virusproduktion und Aufreinigung

Tris/Cl-Lösung für die Virusaufreinigung

Tris-Base	0,1 M
pH 8.0 (eingestellt mit HCl)	

Cäsiumchlorid-Lösung

Soviel CsCl in 100 ml A. bidest geben, bis die Lösung gesättigt ist und CsCl ausfällt.

Anschließend wird die Lösung steril filtriert.

OD-Puffer

SDS	0,1 %
Tris/Cl	10 mM
EDTA	1 mM

Die Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen.

2.13.2 Lösungen für die Molekularbiologie

NaOH/EDTA-Lösung

NaOH2 M
EDTA.....2 mM

Die Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen.

Proteinase K-Puffer

Tris/Cl100 mM
NaCl150 mM
EDTA.....12,5 mM
SDS.....1 %
pH 7.4

TAE-Puffer

Tris/Cl4,84 g
Eisessig1,14 ml
EDTA (0,5M)2 ml
ad 1000 ml A. bidest
pH 8.0

2.13.3 Lösungen für die *in vitro* Experimente

Stop-Lösung

H₂SO₄.....1 M
in A. bidest

Brefeldin A Stammlösung

Brefeldin A.....10 mM
in Methanol

PBS⁺⁺ mit BSA

NaH ₂ PO ₄	1,15 g
NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O.....	0,133 g
BSA	0,1 %
ad 1000 ml A. bidest	
pH 7.4	

DNA-Extraktionspuffer

Natriumhydrogenphosphat (0,2 M).....	192 ml
Zitronensäure (0,1 M)	8 ml
pH 7.8	

Propidiumiodid-Lösung

Natriumcitrat	3,8 mM
Propidiumiodid.....	50 µg/ml
in PBS	

RNase A Stammlösung

RNase A.....	10 mg/ml
in A.bidest	
5 min bei 95 °C aufkochen	

3 Methoden

3.1 Synthese der Plasminogenderivate

Die Freisetzung angiostatischer Kringleregionen aus dem Vorläufer-Protein Plasminogen erfolgte durch Generierung von cDNA-Fragmenten aus Wildtyp-Plasminogen. Dazu wurden Primer generiert, die downstream Kringle 4 oder Kringle 5 ein Stop-Codon und eine HindIII-Schnittstelle inserierten. Durch die Freisetzung interner Kringleregionen aus Plasminogen resultierten Fragmente, welche angiostatisches Wirkpotential aufwiesen.

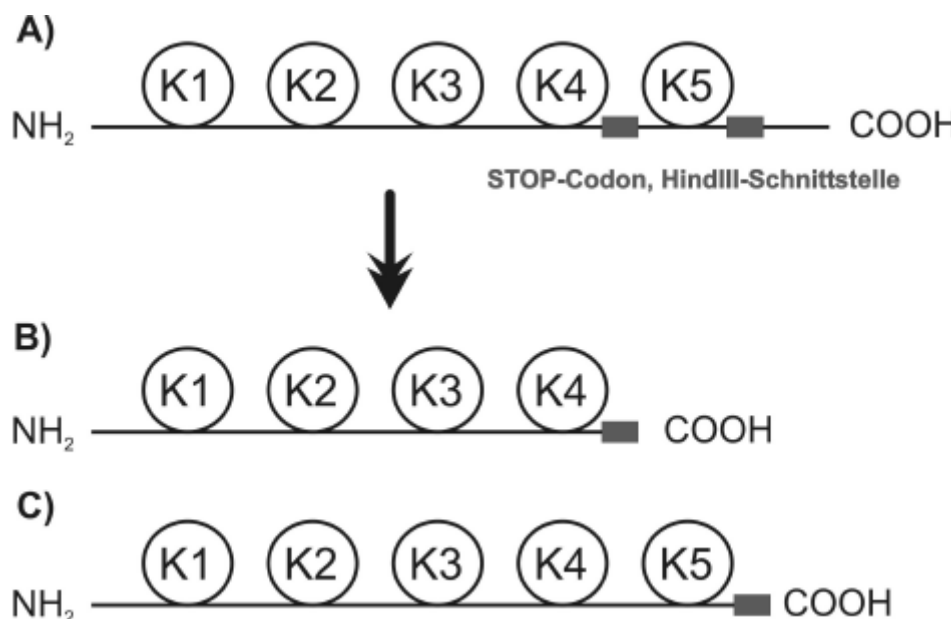


Abbildung 4: Generierung angiostatisch wirksamer Kringle-Regionen aus dem Vorläufer-Protein Plasminogen. A) Wildtypform des Plasminogen B) Nach Einführung eines Stop-Codons und einer HindIII-Schnittstelle strangabwärts Kringle 4 entsteht rhPlgK1-4 (Angiostatin). C) Durch Insertion eines Stop-Codons und einer HindIII-Schnittstelle hinter Kringle 5 entsteht rhPlgK1-5.

In einem weiteren Ansatz zur Freisetzung der angiostatisch wirksamen Kringleregionen aus dem Vorläufer-Protein wurde die cDNA-Sequenz von Wildtyp-Plasminogen (wthPlg) durch zielgerichtete Mutagenese derart verändert, daß strangabwärts Kringle 4 oder Kringle 5 zwölf Nukleotide ausgetauscht wurden und durch für Arginin (Arg) kodierende Triplets ersetzt wurden. Dadurch entstanden im Bereich der eingeführten Mutationen mit der neuen Aminosäureabfolge -Arg-Arg-Arg-Arg- optimale Restriktions-erkennungsstellen für die Endoprotease Furin. So konnte z.B. aus dem downstream

Kringle 4 mutierten Plasminogen durch enzymatische Restriktion an der Mutationsstelle verschiedene Kringle-Regionen (Kringle 1-4 und Kringle 5 mit C-terminalem Ende) gleichzeitig mit dem Ziel einer gegenseitigen Wirkungssteigerung abgespalten werden.

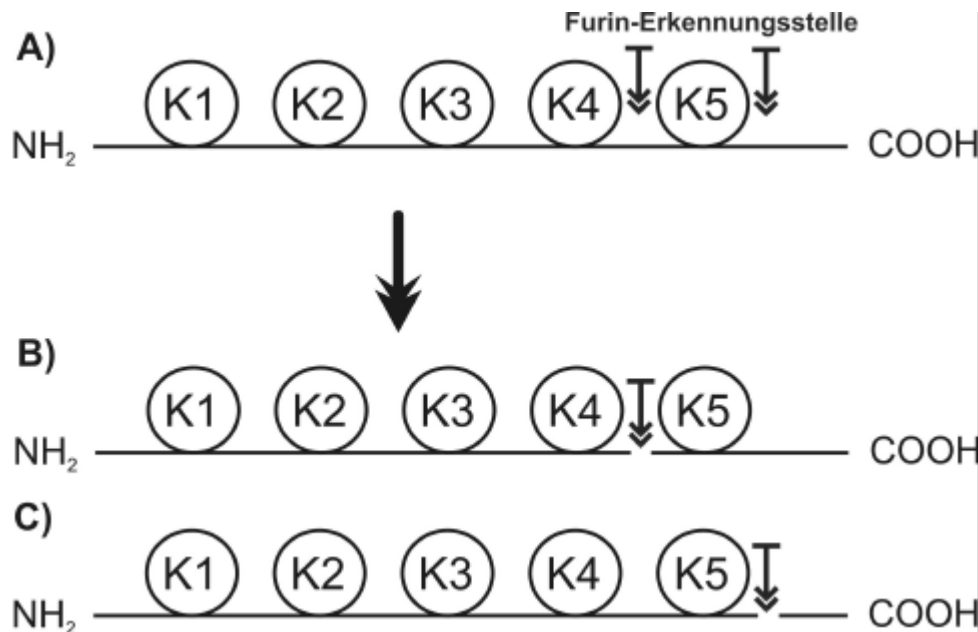


Abbildung 5: Synthese der Furin-Erkennungsstellen aus Wildtyp-Plasminogen. A) Wildtypform des Plasminogen. B) Die durch enzymatische Restriktion hinter Kringle 4 freigesetzten Fragmente K1-4 und K5 mit C-Terminus. C) K1-5 und C-terminales Fragment von Plasminogen nach enzymatischer Restriktion hinter Kringle 5.

Zur Synthese der Furin-Erkennungsstelle wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Zum einen die zielgerichtete Mutagenese durch Hybridisierung, Strangsynthese und Ligation, sowie der zielgerichteten Mutagenese basierend auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

3.1.1 Synthese von rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 cDNA

Zur Synthese von cDNA für Kringle 1-4 (rhPlgK1-4) und Kringle 1-5 (rhPlgK1-5) aus humaner Wildtyp-Plasminogen cDNA (wthPlg) wurden Primer generiert, die zur Synthese von rhPlgK1-4 direkt hinter der Elastaseschnittstelle downstream Kringle 4 ein Stop-Codon und eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease HindIII inserierten (reverse Primer PlgK1-4rev). Zur Synthese von rhPlgK1-5 wurde direkt hinter der Peptidaseschnittstelle downstream Kringle 5 ein Stop-Codon und eine HindIII-Schnittstelle inseriert (reverse Primer PlgK1-5rev). Aus diesen Primern und einem Primer für den T7-Promotor (forward Primer) wurde cDNA aus wthPlg (einkloniert in den prokaryontischen Expressionsvektor pBluescript S/K+) amplifiziert.

PCR-Ansatz:

pBluescriptwthPlg (50 ng/μl).....	5 μl
forward Primer (100 mM).....	1 μl
reverse Primer (100 mM).....	1 μl
RedTaq Ready Mix.....	25 μl

ad 50 μl A. bidest

PCR-Bedingungen:

94 °C für 3 min

35 Zyklen: 94 °C für 20 s

55 °C für 30 s

72 °C für 90 s

72 °C für 10 min

Nach der Amplifikation wurde die cDNA sequenziert (Seqlab, Göttingen), um die korrekte Inserierung des Stop-Codons und der HindIII-Schnittstelle zu überprüfen.

Die korrekt amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des AccepTor Vector Kits in den Konstruktionsvektor pSTBlue-1 subkloniert. Dies erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die so gewonnenen Klone wurden über GenElute Miniprep-Säulen aufgereinigt und zur Kontrolle auf das Insert für 2 h mit HindIII und NotI verdaut:

Plasmid-DNA.....	200 ng
HindIII (20.000 U/ml)	0,1 μl
NotI (10.000 U/ml)	0,1 μl
NEB-Puffer 2	1 μl
BSA (100x)	0,1 μl

ad 10 μl A. bidest

Nach erfolgtem Verdau wurde dieser mit 5x Probenpuffer versetzt und auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt. Einige der korrekt verdauten Klone wurden zur weiteren Verwendung asserviert.

3.1.2 Zielgerichtete Mutagenese durch Hybridisierung, Strangsynthese und Ligation

Diese Mutagenese-Methode basierte auf der Denaturierung der DNA und anschließendem annealing mit spezifischen Primern und neuer Doppelstrang (DS)-

DNA-Synthese. Die Mutagenese setzte sich aus mehreren Teilschritten zusammen: 1. Alkalische Denaturierung der Template-DNA, 2. Hybridisierungsreaktion mit spezifischen Primern, 3. Strangsynthese und Ligation, 4. Elektroporation in *E.coli* BMH71-18. Dieser Bakterienstamm ist reparatur-negativ (repair minus, mutS), wodurch eine Selektion gegen die Mutation verhindert wurde. Eine erneute Transformation in *E.coli* XL1-blue gewährleistete die Trennung zwischen mutierten und Wildtyp-Plasmiden.

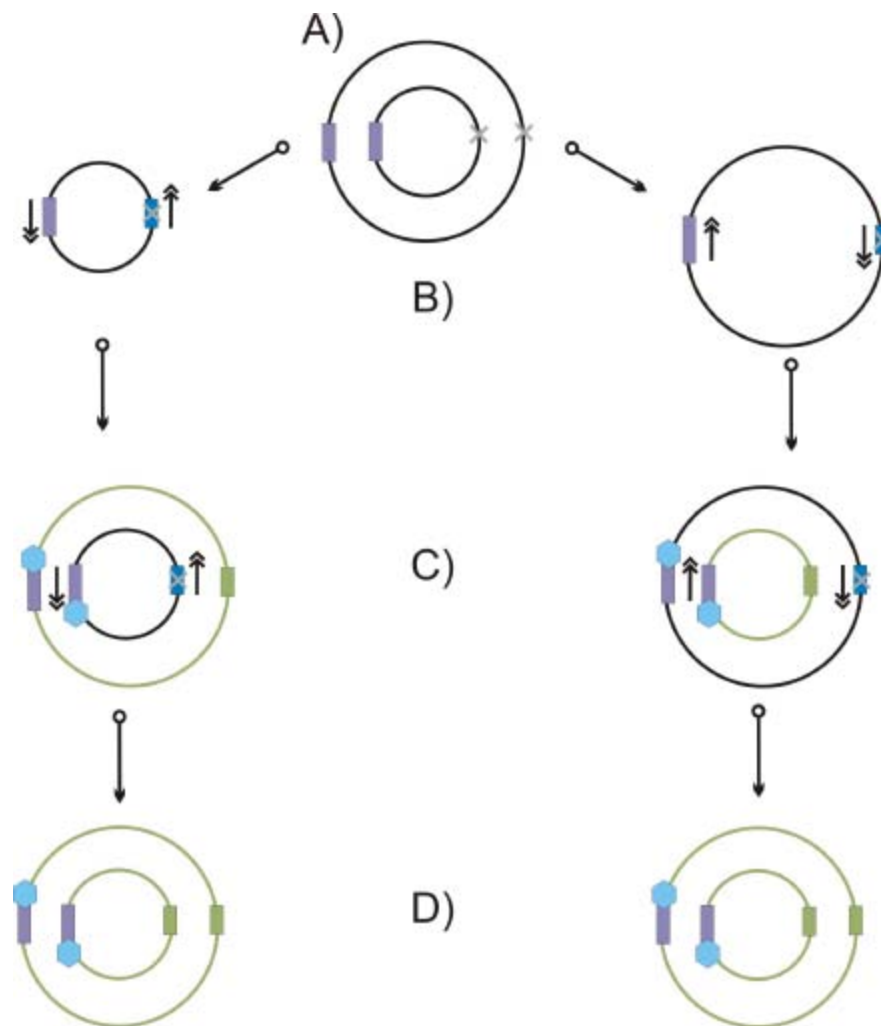


Abbildung 6: Schema der zielgerichteten Mutagenese durch Denaturierung, Hybridisierung, Strangsynthese und Ligation. A) Die zu mutierende Sequenz ist durch ein X gekennzeichnet. Die Antibiotika-Resistenz des Ursprungsplasmids ist flüchtigerfarbig dargestellt. B) Die Doppelstrang-DNA wird denaturiert. Dann erfolgt die Hybridisierung eines Primers (blau dargestellt), der die zu mutierende Sequenz enthält. Parallel dazu wird ein zusätzlicher Primer zur Änderung der Antibiotikaresistenz eingesetzt (blaues Hexagon). C) Die Strangsynthese erfolgt an beiden Einzelsträngen (Pfeile). D) Es wird auf die doppelsträngigen Plasmide selektiert, welche die neue Antibiotikaresistenz enthalten.

Die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese erfolgte mit Hilfe des Site directed Mutagenesis Kit.

2 µg DNA-Template wurde mit 2 µl NaOH/EDTA-Lösung gemischt und mit A.bidest auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zu der Lösung wurden 75 µl Ethanol (100 %) und 2 µl Ammoniumacetat (2 M) zugegeben. Die DNA wurde bei -70 °C für 30 min gefällt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 13.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl A. bidest resuspendiert.

Zur Hybridisierung der Primer (MuthPIgK4, MuthPIgK5) mit der Wildtyp-DNA wurde folgender Ansatz zur DNA-Lösung pipettiert:

template-DNA (aus der Denaturierung)	10 µl
selection Oligo	1 µl
Mutagenese-Primer	1,53 µl
Annealing Buffer	2 µl
A. bidest	15,4 µl

Die Kontrollreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers angesetzt.

Die Ansätze wurden im Wasserbad 5 min bei 75 °C inkubiert und dann im Wasserbad langsam auf 37°C abgekühlt.

Nach dem Abkühlen wurde zur Durchführung der Strangsynthese und der danach folgenden Ligation der nachstehende Ansatz zur Hybridisierungsreaktion pipettiert:

A. bidest	5 µl
Synthese-Puffer	3 µl
T4-DNA-Polymerase	1 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Dieser Ansatz wurde 90 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden elektrokompetente BMH71-18 mit der DNA transformiert. Dazu wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ansatzes gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in Elektroporationsküvetten überführt und in einem Elektroporationsgerät bei 1700 Volt, 201 Ohm und 25 µFahrad für 0,05 s elektroporiert. Die Bakterien wurden aus der Küvette entnommen und mit 4ml LB-Medium (versetzt mit 50 µl Antibiotika-Mix) über Nacht (ü. N.) im Schüttler bei 225 rpm und 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die DNA aus der Kultur vom Vortag über das GenElute Plasmid Miniprep Kit isoliert. Elektrokompente E.coli XL1-blue wurden mit 1 µl der isolierten DNA transformiert. Die Elektroporation erfolgte wie vorbeschrieben. Die transformierten E.coli wurden mit 1 ml LB-Medium gemischt und 60 min bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Bakteriensuspension entnommen und auf einer Agarplatte (versetzt mit 50 µl Antibiotika-Mix) ausplattiert. Diese wurde bei 37 °C ü. N. im Bakterienbrutschrank inkubiert.

An Tag drei wurden von den Platten 10-15 einzelne Kolonien in 5 ml LB-Medium (versetzt mit 50 µl Antibiotika-Mix) überführt und ü. N. bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

Am folgenden Tag wurde aus den Bakterien-Kulturen DNA mit Hilfe des GenElute Plasmid Miniprep Kits isoliert und anschließend sequenziert, um Klone mit vollständig mutierter Sequenz zu selektionieren.

3.1.3 Zielgerichtete Mutagenese durch PCR

Eine weitere Methode zur Durchführung der zielgerichteten Mutagenese basiert auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Für jede Mutationsstelle wurden zwei Primer, sense (PlgmutK4for oder PlgmutK5for) und antisense (PlgmutK4rev oder PlgmutK5rev), eingesetzt, welche die zu mutierende Sequenz enthalten. In einer PCR-Reaktion mit pBluescriptwthPlg als Template wurden die zu mutierenden Nucleotide ausgetauscht. Die PCR wurde mit einer sehr niedrigen Zykluszahl (15-20 Zyklen) und einer high fidelity Polymerase durchgeführt, welche das vollständige Plasmid amplifiziert. Durch die vollständige Amplifizierung des Plasmids entfiel das Umklonieren in ein weiteres Plasmid. Anschließend wurde über die Restriktionsendonuklease DpnI selektiv methylierte, prokaryontische DNA verdaut, um so bakterielle Wildtyp-DNA zu eliminieren. Mit der verbliebenen DNA wurden E. coli XL1-blue über Elektroporation transformiert.

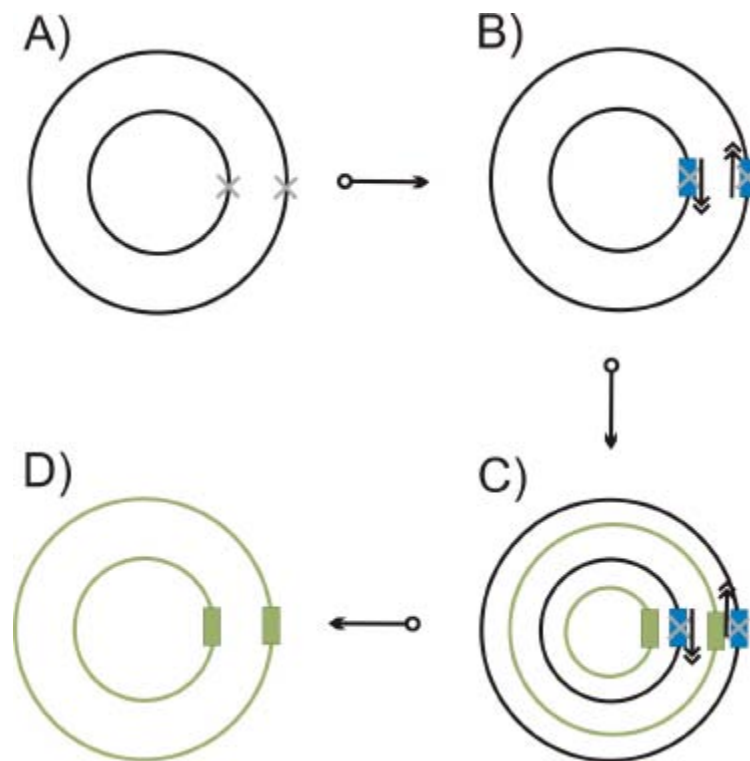


Abbildung 7: Zielgerichtete Mutagenese durch PCR. A) Die zu mutierende Stelle ist durch ein X gekennzeichnet. B) Ein Primerpaar (blau dargestellt), welches die zu mutierende Sequenz enthält, deckt strangaufwärts und strangabwärts der Mutationsstelle sense und antisense Strang ab. C) Die PCR erfolgt mittels einer high fidelity Polymerase, die das vollständige Plasmid in beide Richtungen amplifiziert (Pfeile). D) Durch Verdauung der prokaryontischen DNA mit DpnI wird auf die durch PCR amplifizierte DNA mit der mutierten Sequenz selektioniert.

PCR-Ansatz für die zielgerichtete Mutagenese:

PCR high fidelity Puffer	5 µl
PCR high fidelity Taq-Polymerase.....	1 µl
MgSO ₄	2 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
Primer forward (100 mM).....	0,25 µl
Primer reverse (100 mM).....	0,25 µl
Template DNA (50 ng/µl).....	5 µl
ad 50 µl A. bidest	

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C für 30 s

18 Zyklen: 95 °C für 30 s

72 °C für 60 s

68 °C für 12 min

Zu jedem PCR-Ansatz wurde anschließend 1 µl DpnI pipettiert und 1 h bei 37 °C verdaut. 5 µl aus dem PCR-Ansatz wurde für eine Elektroporation in elektrokompente XL1-blue verwendet. Diese erfolgte wie vorbeschrieben (Abschnitt 3.1.2). Die Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Am folgenden Tag wurden 10-15 Klone in jeweils 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) bei 225 rpm und 37 °C ü. N. inkubiert.

Die DNA wurde am folgenden Tag mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit isoliert und zur Kontrolle auf die Mutation sequenziert.

3.2 Synthese und Amplifikation der adenoviralen Vektoren (He et al., 1998)

Die Synthese der adenoviralen Vektoren erfolgte mit dem AdEasy System: Die Plasminogenderivate wurden in den adenoviralen Helfervektor pShuttleCMV inkloniert welcher Teile (left arm, right arm, Long Terminal Repeats) des adenoviralen Genoms enthielt. Anschließend erfolgte die Rekombination mit dem adenoviralen Plasmid AdEasy1 (enthält left arm, right arm) in Rekombinase-positiven (RecA(+)) Bakterien. Nach erfolgreicher Rekombination wurde das AdEasy-Konstrukt über Lipofektion in die Verpackungszelllinie HEK-293 eingebracht. Durch Rekombination mit der in der Zelllinie enthaltenen adenoviralen E1-Region wurden replikationsdefiziente Adenoviren synthetisiert.

3.2.1 Klonierung der Plasminogen-Derivate in den adenoviralen Helfervektor pShuttleCMV

Die durch zielgerichtete Mutagenese synthetisierten Plasminogen-Derivate (muthPIgK4, muthPIgK5), sowie wthPIg wurden aus dem Vektor pBluescript mittels HindIII, NotI und BspHI ausgeschnitten und in den Vektor pShuttleCMV inkloniert. HindIII und NotI schnitten das Insert aus dem Vektor, während BspHI den Vektor in mehrere kleine Fragmente schnitt, so daß Insert und Vektor voneinander aufgetrennt werden konnten.

pBluescriptmuthPIgK4, muthPIgK5, wthPIg	1 µg
BspHI (10.000 U/ml)	2 µl
HindIII (20.000 U/ml)	2 µl
NotI (10.000 U/ml)	2 µl
NEB-Puffer 2	3 µl
BSA (100x)	0,3 µl
Ad 30 µl A. bidest	

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

Das Insert wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Wizard PCR Preps).

Die cDNA-Konstrukte rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5, einkloniert in pSTBlue-1 wurden ebenfalls mit HindIII und NotI verdaut, um sie danach in den Vektor pShuttleCMV ligieren zu können.

pSTBluerhPlgK1-4, rhPlgK1-5.....	1 µg
HindIII (20.000 U/ml)	2 µl
NotI (10.000 U/ml)	2 µl
NEB-Puffer 2	3 µl
BSA (100x)	0,3 µl
Ad 30 µl A. bidest	

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Der vollständige Verdau wurde auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt und rhPlgK1-4 bzw. rhPlgK1-5 aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolation der cDNA aus dem Gel erfolgte wie vorbeschrieben.

Anschließend wurden die Plasminogenderivate und die Wildtypform mit pShuttleCMV ligiert. Dazu wurde pShuttleCMV ebenfalls mit HindIII und NotI verdaut:

pShuttleCMV	2,5 µg
HindIII (20.000 U/ml)	5 µl
NotI (10.000 U/ml)	5 µl
NEB-Puffer 2	7,5 µl
BSA (100x)	0,75 µl
Ad 75 µl A. bidest	

Die Inkubation erfolgte für 3h bei 37 °C.

Der vollständige Ansatz wurde auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt und ausgeschnitten. Die Isolation des Vektors aus dem Gel erfolgte wie vorbeschrieben.

Zur Ligation von pShuttleCMV mit den Plasminogen-Derivaten wurde zuerst die DNA-Konzentration von Vektor und Insert photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Ligrationsreaktion nach folgendem Schema pipettiert:

pShuttleCMV	100 ng
Plasminogen-Derivat cDNA.....	300 ng
Ligase-Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase (2.000.000 U/ml)	1 µl
ad 10 µl A. bidest	

Der Ansatz wurde ü. N. bei RT inkubiert.

Am Folgetag wurden Hitzeschock-kompetente XL1-blue mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert. Dazu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit dem vollständigen Ligationsansatz gemischt. Die Bakterien-DNA-Suspension wurde für 30 s bei 42 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend sofort in Eis überführt. Die Suspension wurde mit 1ml LB-Medium vermischt und 45 min bei 250 rpm inkubiert. Der Ansatz wurde bei 5.000 g für 1 min abzentrifugiert und in 100 µl LB Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf Kanamycin-haltigen (25 µg/ml) Agarplatten ausplattiert. 5-10 Klone wurden ausgewählt und für eine Mini-Präparation in 5 ml LB-Medium (mit 25 µg/ml Kanamycin) ü. N. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem GenElute Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Überprüfung der korrekten Ligation der Plasminogen-Derivate mit pShuttleCMV wurden Teile der präparierten DNA mit HindIII und NotI verdaut.

Miniprep-DNA.....	8 µl
HindIII (20.000 U/ml)	0,5 µl
NotI (10.000 U/ml)	0,5 µl
NEB-Puffer 2	1 µl
BSA (10 x)	1 µl

Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37 °C.

Der vollständige Ansatz wurde auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt.

Jeweils ein Klon der korrekt ligierten Plasminogen-Derivate wurde für die Rekombination mit AdEasy1 ausgewählt. Die Klone wurden in 100 ml LB-Medium (25 µg/ml Kamamycin) ü. N. bei 37 °C und 250 rpm kultiviert und am folgenden Tag die DNA über eine Midipräparation mit Hilfe des Kits Nucleobond AX100 nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.2 Rekombination der pShuttleCMV-Konstrukte mit AdEasy1

Die Rekombination von pShuttleCMVmuthPIg-K4, -K5, sowie pShuttleCMVrhPIgK1-4, -K1-5 und -wthPIg mit AdEasy1 erfolgte in recA(+)-Bakterien. Selektion auf

rekombinierte Klone erfolgte zum einen über Antibiotika: Während der Rekombination wird die Ampicillin-Resistenz von AdEasy1 eliminiert, während die Kanamycin-Resistenz von pShuttleCMV erhalten blieb.

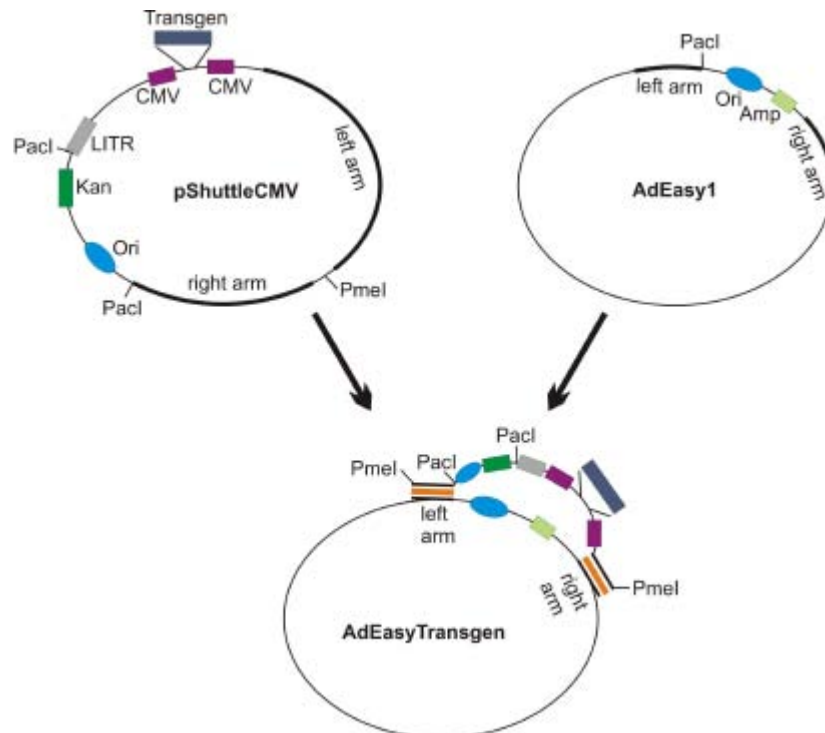


Abbildung 8: Rekombination von pShuttleCMVTransgen mit AdEasy1. Beide Plasmide rekombinieren am linken und rechten Arm (right arm, left arm), wodurch die Ampicillinresistenz von AdEasy1 eliminiert, sowie das LITR (Long inverted terminal repeat) und beide CMV-Promotoren in AdEasy1 eingebracht werden (modifiziert nach (He et al., 1998).

Nach erfolgter Rekombination wurde dieses Ereignis durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease PacI überprüft. Durch diesen Verdau liessen sich bei erfolgreicher Rekombination auf einem Agarose-Gel zwei Fragmente mit einer Größe von 30 kb, sowie 3 kb oder 4,5 kb differenzieren. Hatte die Rekombination nicht stattgefunden, entstanden durch den Verdau mit PacI Fragmente von 30 kb und 7,5 kb.

Je 6 µg der pShuttleCMV-Konstrukte wurden für die Rekombination mit PmeI linearisiert.

pShuttleCMV-Plasminogenderivate.....	6 µg
PmeI (10.00 U/ml)	6 µl
NEB-Puffer 4	5 µl
BSA (100 x)	0,5 µl
ad 50 µl A. bidest	

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C.

Die DNA wurde anschließend mittels Phenol/Chloroform-Fällung aufgereinigt. Dazu wurde der Verdau auf 100 µl mit *A. bidest* aufgefüllt, mit 200 µl Phenol/Chloroform versetzt und 1 min gevortext. Der Ansatz wurde bei 10.000 g für 5 min abzentrifugiert und 100 µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues RG überführt. Diese wurde dann mit 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5.2) und 250 µl Ethanol (100 %, -20 °C) gemischt und erneut für 1 min gevortext. Das Gemisch wurde anschließend bei -80 °C für 5 min inkubiert und 15 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 200 µl Ethanol (70 %, 4 °C) gewaschen. Die DNA wurde erneut für 5 min bei 10.000 g pelletiert und abschließend zu 500 ng/µl in *A. bidest* resuspendiert.

Für die Rekombination wurden 100 ng AdEasy1 und 200 ng der pShuttleCMV-Plasminogenderivate (verdaut mit PmeI) miteinander gemischt und auf 10 µl mit *A. bidest* aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde mit elektrokompetenten recA(+) Bakterien (BJ5183) vermischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und die Bakterien wie vorbeschrieben elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen zur Rekombination in 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 10 min bei 37 °C und 250 rpm in einem Schüttler inkubiert. Je 125 µl der Bakteriensuspension wurden auf Kanamycin-haltigen (25 µg/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden 20 bis 30 der kleinsten Kolonien in je 3 ml LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) überführt und für eine Mini-Präparation ü. N. bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die DNA wurde mit Hilfe des GenElute Plasmid-Miniprep Kits isoliert und zur Kontrolle auf das Rekombinationsereignis mit PacI verdaut.

Miniprep-DNA.....	8,7 µl
PacI (10.000 U/ml)	0,2 µl
NEB-Puffer 1	1 µl
BSA (100x)	0,1 µl

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C.

Der vollständige Ansatz wurde auf einem Agarose-Gel (0,8 %) aufgetrennt, um rekombinante Klone von nicht rekombinanten differenzieren zu können.

Anschließend wurden recA(-) Bakterien (DH10B) mit 50 ng Plasmid-DNA (von positiv rekombinierten AdEasy-Plasminogenderivaten) wie vorbeschrieben elektroporiert. Am Folgetag wurde ein Klon der jeweiligen Plasminogen-Derivate ausgewählt und in 500 ml

LB-Medium (mit 25 µg/ml Kanamycin) ü. N. bei 37 °C für eine Maxi-Präparation kultiviert. Am folgenden Tag wurde die DNA mit dem Nucleobond AX500 Kit nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

Nach der Maxipräparation wurde die DNA der AdEasy-Plasminogen-Derivate zur Kontrolle der korrekten DNA-Sequenz durch die Firma SeqLab sequenziert.

3.2.3 Lipofektion

Zur Synthese der Adenoviren wurden die in AdEasy vorliegenden Plasminogenderivate durch Transfektion mit Lipofectamine in 293-Zellen eingebracht. Durch die mit einem Fragment der adenoviralen E1-Region stabil transfizierten 293-Zellen war es möglich, durch Rekombination von AdEasy1 mit der E1-Region rekombinante Adenoviren zu synthetisieren.

Einen Tag vor der Lipofektion wurden 4×10^5 293-Zellen in einer T25-Zelkulturflasche ausgesät und ü. N. im Brutschrank inkubiert.

10 µg DNA (aus den Maxi-Präparationen der AdEasy-Plasminogen-Derivate) wurde mit PacI verdaut.

Maxiprep-DNA.....	10 µg
PacI (10.000 U/ml)	5 µl
NEB-Puffer 1	10 µl
BSA (100x)	1 µl
ad 100 µl A. bidest	

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C.

Die DNA wurde anschließend über Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Dazu wurde die DNA mit 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5.2) und 250 µl Ethanol (100 %, -20 °C) versetzt und 1 min gevortext. Das Gemisch wurde 5 min bei -80 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 200 µl Ethanol (70 %, 4 °C) gewaschen und 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet für 5 min getrocknet und in 40 µl A. bidest resuspendiert.

10 µl Lipofectamine und 20 µl DNA-Lösung (250 ng/µl) wurden mit jeweils 250 µl OptiMEM gemischt. Beide Lösungen wurden zusammenpipettiert, leicht gemischt und 30 min bei RT inkubiert.

Die Zellen wurden 2 x mit OptiMEM gewaschen und 10 min im Brutschrank mit 2,5 ml OptiMEM präinkubiert. Die DNA/Lipofectamine-Lösung wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben und gut gemischt. Anschließend wurden die Zellen 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die OptiMEM-Lösung abgesaugt und durch 3 ml DMEM (2 % FCS) ersetzt.

Die Zellen wurden bis zur Bildung zytopathischer Plaques im Brutschrank inkubiert und täglich auf ihren Zustand kontrolliert. Die Bildung zyopathischer Plaques erfolgte in einem Zeitraum von sieben bis vierzehn Tagen.

3.2.4 Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren

Adenoviren wurden amplifiziert, um ausreichende Mengen und Konzentrationen für *in vitro* und *in vivo* Experimente zu erhalten. Dazu wurden große Mengen mit Adenoviren infizierte 911-Zellen (im Schnitt $2,5 \times 10^8$ Zellen) aufgebrochen und die darin enthaltenen Viruspartikel freigesetzt. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Viruslösung erfolgte über zweifache Cäsiumchlorid-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation und anschließende Dialyse gegen PBS.

3.2.4.1 Amplifikation der Adenoviren

Zur Amplifikation wurden 911-Zellen auf 30 T175-Zellkulturflaschen expandiert und bis zu einer Konfluenz von 80 % - 90 % im Brutschrank inkubiert.

Zur Infektion wurden Zellüberstände aus vorhergehenden Virus-Infektionen eingesetzt. Dazu wurden jeweils 2 ml der virushaltigen Zellüberstände zu je einer T175-Zellkulturflasche gegeben und auf 15 ml mit DMEM (2 % FCS) aufgefüllt. Die Flaschen wurden anschließend 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden weitere 15 ml DMEM (2 % FCS) auf die Zellen gegeben und für 48 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen geerntet, indem sie mittels einer Pipette vom Flaschenboden gespült wurden. Die Zellsuspension wurde in 50 ml-RG überführt und bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets in insgesamt 15 ml Tris/Cl (0,1 M, pH 8.0) resuspendiert. Teile des Überstands wurde für spätere Infektionen asserviert.

Die Freisetzung des Virus erfolgte durch viermaliges Einfrieren in flüssigem N₂ und Auftauen im Wasserbad (bei 37 °C). Anschließend wurden die Zelltrümmer für 5 min bei

1500 g pelletiert und der Überstand für die Gleichgewichts-Ultrazentrifugation abgenommen.

3.2.4.2 Cäsiumchlorid-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation

Für die erste Cäsiumchlorid (CsCl)-Ultrazentrifugation wurden OptiSeal-Zentrifugenröhrchen mit 3 ml gesättigter CsCl-Lösung befüllt. Darauf wurde 5 ml Viruslösung pipettiert und das Zentrifugenröhrchen mit Tris/Cl (0,1 M, pH 8.0) aufgefüllt. Die Röhrchen wurden verschlossen und auf einer Feinwaage gegen Tara-Zentrifugenröhrchen auf 0,001 g austariert. Die Zentrifugation erfolgte in einem Festwinkelrotor bei 100.000 g für 22 h bei 4 °C mit maximaler Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse.

Nach der Zentrifugation wurde die Virusbande abgesaugt. Dazu wurde das Zentrifugenröhrchen zuerst entlüftet und dann eine 26-Gauge-Kanüle 1 cm unterhalb der unteren Virusbande in das Zentrifugenröhrchen eingeführt. Die Virusbande wurde mit einer Spritze vorsichtig abgesaugt und in ein frisches OptiSeal Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde mit Tris/Cl-CsCl (im Verhältnis 2:1 gemischt) aufgefüllt und erneut wie vorbeschrieben zentrifugiert.

Nach der zweiten Ultrazentrifugation wurde die Virusbande wie oben beschrieben abgesaugt und in eine Dialyse-Kammer überführt. Die Virus-Lösung wurde zuerst 30 min bei RT gegen PBS dialysiert. Das PBS wurde gegen frisches ersetzt und die Dialyse bei 4 °C für 30 min fortgesetzt. Das PBS wurde danach wieder gegen frisches PBS (4 °C) ersetzt und für 1 h bei 4 °C weiter dialysiert. Danach wurde die Viruslösung aus der Dialysekammer entnommen, mit Glycerol (Endkonzentration 10 %) versetzt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Isolierung von Virus-DNA (Elsom, 1997)

Um alle synthetisierten Adenoviren auf das korrekte Transgen zu testen, wurde Virus-DNA (von AdwthPlg, AdrhPlgk1-4, AdrhPlgK1-5, AmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5) aus SN (SN) von infizierten 911-Zellen isoliert. Über PCR mit spezifischen Primern wurde anschließend das Transgen amplifiziert und sequenziert.

10 ml SN von mit den verschiedenen Adenoviren infizierten 911-Zellen wurde steril filtriert (0,2 µm Filter) und für 1 h in einem Swing-Out Rotor bei 100.000 g (mit maximaler Beschleunigung und mittlerer Bremswirkung) zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 400 µl Proteinase K-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde zur Lösung RNase A (Endkonzentration 0,1 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 100 µl Proteinase K (0,5 mg/ml) zugegeben und 60 min bei 37 °C inkubiert.

Die Virus-DNA wurde anschließend mit Ethanol wie in 3.2.3 beschrieben gefällt. Die so gewonnene Virus-DNA wurde in 50 µl A. bidest resuspendiert und in einer PCR mit spezifischen Primern (forward Primer PlgSeq; reverse Primer K1-4rev, K1-5rev, K5rev) zur Überprüfung des Transgens eingesetzt.

PCR-Ansatz:

RedTaq Ready Mix.....	25 µl
Primer forward (100mM).....	1 µl
Primer reverse (100mM).....	1 µl
Template DNA.....	500 ng

ad 50 µl A. bidest

PCR-Bedingungen:

95 °C für 90 s

35 Zyklen: 95 °C für 20 s

55 °C für 30 s

72 °C für 2 min

72 °C für 10 min

3.2.6 Bestimmung der optical particle units (opu)

Die Bestimmung der Gesamtzahl aller Viruspartikel in der Viruslösung (optical particle units, opu) lieferte einen ersten Anhaltspunkt über die Ausbeute nach Virusaufräufung und Dialyse. Anhand dieser Bestimmung konnten die Verdünnungsstufen im Plaque-Assay angepaßt werden.

Die Viruslösung wurde im Verhältnis 1:25 mit frisch angesetztem OD-Puffer gemischt und 10 min bei 56 °C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Messung der Viruslösung erfolgte im Photometer bei 260 nm gegen OD-Puffer als Nullwert. Die Berechnung der opu erfolgte mit nachstehender Formel:

$$\text{opu/ml} = \text{OD}_{260} \times 25 \times 1,1 \times 10^{12}$$

3.2.7 Plaque-Assay zur Bestimmung der Viruskonzentration

Die Anzahl der aktiven, infektiösen Viruspartikel (plaque forming units, pfu) wurde durch ein zytotoxisches Plaque-Assay bestimmt. Die Bestimmung erfolgte über eine aufsteigende Verdünnungsreihe, wobei im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde.

1×10^4 293-Zellen wurden pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Viruslösung entsprechend der Tabelle 2 in DMEM (2 % FCS) verdünnt. Zur Infektion der 293-Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 50 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufe (angepasst an die vorher ermittelten opu/ml) in achtfacher Bestimmung in die Wells pipettiert. Als Negativkontrolle wurde eine Reihe ohne Virus mitgeführt.

Tabelle 2: Verdünnungsreihe zur Durchführung des Plaque Assays

Verdünnungsstufe	Medium	Virus	Verdünnung
1	495 μ l	5 μ l	1×10^2
2	990 μ l	10 μ l	1×10^4
3	990 μ l	10 μ l	1×10^6
4	500 μ l	500 μ l	2×10^6
5	500 μ l	500 μ l	4×10^6
6	500 μ l	500 μ l	8×10^6
7	500 μ l	500 μ l	$1,6 \times 10^7$
8	500 μ l	500 μ l	$3,2 \times 10^7$
9	500 μ l	500 μ l	$6,4 \times 10^7$
10	500 μ l	500 μ l	$1,28 \times 10^8$
11	500 μ l	500 μ l	$2,56 \times 10^8$
12	500 μ l	500 μ l	$5,12 \times 10^8$
13	500 μ l	500 μ l	$1,02 \times 10^9$
14	500 μ l	500 μ l	$2,05 \times 10^9$
15	500 μ l	500 μ l	$4,1 \times 10^9$
16	500 μ l	500 μ l	$8,19 \times 10^9$
17	500 μ l	500 μ l	$1,63 \times 10^9$
18	500 μ l	500 μ l	$3,26 \times 10^9$
19	500 μ l	500 μ l	$6,52 \times 10^9$
20	500 μ l	500 μ l	$1,3 \times 10^{10}$

Die Zellen wurden 6 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit weiteren 150 μ l DMEM (2 % FCS) pro Well versetzt. Die Zellen wurden acht Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden unter dem Durchlichtmikroskop die entstandenen Plaques ausgezählt und die plaque forming units (pfu) berechnet. Dazu wurde die höchste Verdünnung ermittelt, in welcher noch ein Plaque erkennbar war. Dies wurde in achtfacher Bestimmung durchgeführt und anschließend die Werte gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor (20) multipliziert. Der daraus resultierende Wert ergab die Anzahl der infektiösen Partikel/ml (pfu/ml).

3.2.8 Nachweis der Replikationsdefizienz

Neben der Bestimmung der Anzahl der infektiösen Viruspartikel, wurde ebenfalls untersucht, ob durch die Synthese der replikationsdefizienten Adenoviren durch Rekombination in den Helferzelllinien replikationsfähige Wildtypviren entstanden sind. Diese sind in der Lage, normale Zelllinien (wie A549-Zellen) zu infizieren und lytische Plaques zu bilden.

5×10^4 A549-Zellen wurden am Vortag in 6-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen wie im Plaque-Assay infiziert. Dazu wurde der Virus mit 1 ml DMEM (2 % FCS) in verschiedenen Verdünnungsstufen (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10}) aufgenommen und auf die A549-Zellen pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend für acht Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Anzahl der gebildeten lytischen Plaques am Durchlichtmikroskop bestimmt.

3.3 Nachweis der Genexpression in vitro

Um zu untersuchen, ob die adenoviralen Vektoren das Transgen exprimieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde RNA aus mit Virus infizierten Zellen isoliert und revers transkribiert. Die daraus resultierende cDNA wurde in einer PCR mit für Plasminogen spezifischen Primern eingesetzt.

3.3.1 Infektion von A549-Zellen

Zur Gewinnung von RNA wurden A549-Zellen mit den adenoviralen Plasminogen-Derivaten infiziert. A549-Zellen exprimieren kein Plasminogen, so daß diese gleichzeitig als Negativkontrolle genutzt werden können.

Am Vortag wurden 5×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und ü. N. im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 MOI (multiplicity of infection, Anzahl der Viruspartikel/Zelle) der adenoviralen Plasminogenkonstrukte und einem Kontrollvektor (AdlacZ) infiziert. Dazu wurden 500 MOI der verschiedenen Viren in 750 μ l DMEM (2 % FCS) aufgenommen und gemischt. Die Viruslösung wurde auf die Zellen gegeben und 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit DMEM/Ham`s F-12 gewaschen und für 42 h in 750 μ l DMEM/Ham`s F-12 im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen zur RNA-Isolierung verwendet.

3.3.2 RT-PCR

Aus A549-Zellen, die wie in 3.3.1 beschrieben infiziert wurden, wurde über das GenElute Total Mammalian RNA Kit RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. RNA wurde in 30 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und verbliebene DNA mit DNase verdaut:

RNA.....	30 μ l
RQ1 DNase-Puffer 10x.....	4 μ l
RQ1 DNase	5 μ l
DEPC-H ₂ O	1 μ l

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

Der RNA-Gehalt wurde anschließend bei 260 nm photometrisch mit folgender Formel bestimmt:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

1 μ g RNA wurde für eine RT-Reaktion eingesetzt:

RNA.....	1 μ g
Random Hexamere	0,1 μ g
ad 11 μ l DEPC-H ₂ O	

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend direkt für 2 min auf Eis abgekühlt, um Dimerbildung zu verhindern.

Nach der Abkühlung wurde folgender Ansatz zur RNA pipettiert:

dNTPs (20 mM)	2,5 µl
RNAsin	0,7 µl
MMLV-RT Puffer 5x.....	4 µl
MMLV Reverse Transkriptase	1 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die anschließende PCR wurde wie folgt angesetzt:

RedTaq Ready Mix.....	25 µl
Primer forward (100 mM).....	1 µl
Primer reverse (100 mM).....	1 µl
Template DNA.....	5 µl
ad 50 µl A. bidest	

PCR-Standardbedingungen:

95 °C für 90 s

25 Zyklen: 95 °C für 20 s

55 °C für 30 s

72 °C für 90 s

72 °C für 10 min

Die PCR wurde mit für die entsprechenden Kringleregionen spezifischen Primern (forward: Signal I; reverse: K1-4rev, K1-5rev, K5rev) und mit Primern für das Cytoskelett-Protein β -Actin als Kontrollreaktion durchgeführt. Nach der PCR wurden je 10 µl der PCR-Ansätze auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetragen und aufgetrennt.

3.4 *in vitro* Experimente

3.4.1 Infektion von A549-Zellen

Zur Gewinnung von SN für die funktionellen *in vitro* Assays (Tube Formation Assay, Proliferationsassay und Apoptoseassay) wurden ebenfalls A549-Zellen verwendet.

Am Vortag wurden 3×10^6 Zellen in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät und ü. N. im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 MOI der adenoviralen Konstrukte und einem Kontrollvektor (AdlacZ) in 15 ml DMEM (2 % FCS) infiziert. Anschließend wurden die Zellen 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit DMEM/Ham`s F-12 gewaschen und für 42 h in 17 ml DMEM/Ham`s F-12 im Brutschrank inkubiert.

Der Überstand wurde nach der Inkubationszeit abgenommen, mit Proteinase-Inhibitor versetzt, aliquotiert und für *in vitro* Untersuchungen asserviert.

3.4.2 Tube Formation Assay

Um die Fähigkeit der verschiedenen Plasminogenderivate, die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen zu beeinflussen, zu untersuchen, wurde ein sogenanntes „tube formation Assay“ durchgeführt. Die Wirkung der Plasminogenderivate wurde durch die Anzahl der gebildeten interzellulären Verbindungen der Endothelzellen („tubes“) bewertet.

Eine 24-Well-Platte wurde mit 300 µl Matrigel (versetzt mit 10 ng/ml VEGF) beschichtet und zur Polymerisation 30 min im Brutschrank inkubiert. Auf diese Beschichtung wurden in Dreifachbestimmung $2,5 \times 10^4$ HUVE-Zellen in 75 µl Medium200 pro Well pipettiert. Dazu wurde 75 µl konditionierter SN von A549-Zellen (aus 3.4.1) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 150 µl Medium200 (mit 10 % LSGS) auf die Zellen gegeben und diese für 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden Tubes (geschlossene, gefäßähnliche Strukturen) im Durchlichtmikroskop (400 x Vergrößerung) ausgezählt.

3.4.3 Proliferationsassay

Die Auswirkungen der Plasminogenderivate auf die Proliferation von Endothelzellen und Tumorzellen wurde anhand eines BrdU-Proliferationsassays untersucht. Dazu wurden Endothelzellen (HUVEC) und verschiedene Tumorzelllinien (LLC1, Hepa129) mit konditioniertem SN (aus 3.4.1) von A549-Zellen präinkubiert. Darüber hinaus wurde die Beeinflussung des adenoviralen Gentransfers auf die Proliferation bei Tumorzellen untersucht.

Am Vortag wurden 1×10^4 Zellen der entsprechenden Zelllinien (HUVEC, LLC1, Hepa129) in vierfach-Bestimmung in einer 96-Well Platte ausgesät und ü. N. im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 50 µl konditioniertem SN (aus 3.4.1) für 2 h bei RT präinkubiert. Anschließend wurden 50 µl Medium (entsprechend der Zelllinie) auf die Zellen gegeben und diese für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Markierung mit 10 µl BrdU Labeling Solution pro Well für 4 h im Brutschrank. Nach der Inkubation wurde das Medium entweder durch Abschütten (für adhärente Zellen) oder durch Zentrifugation und vorsichtigem Absaugen (für Suspensionszellen) entfernt. Die Zellen

wurden mit 200 μ l/Well FixDenat für 30 min bei RT fixiert. Die Fixierungslösung wurde entfernt und die Zellen mit 100 μ l/Well anti-BrdU-POD Working Solution bei RT für 90 min inkubiert. Die AK-Lösung wurde entfernt und die Zellen 3 x mit 300 μ l/Well Waschlösung gewaschen. Abschließend wurde 100 μ l/Well Substratlösung auf die Zellen gegeben und je nach Intensität der Farbentwicklung 5 bis 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion mit 10 μ l Stop-Lösung abgestoppt und die Farbreaktion bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch Bildung des Mittelwerts aller vier Werte und Umrechnung der optischen Dichte in prozentuale Anteile mit LacZ als Ausgangswert (100 %).

3.4.4 Apoptose Assay

Um DNA durchflußzytometrisch darzustellen, wurden interkalierende Farbstoffe wie das Propidiumiodid (PI) verwendet. PI kann zur Unterscheidung von vitalen und toten Zellen genutzt werden: Die Membranintegrität toter Zellen ist nicht mehr gewährleistet, wodurch PI in die Zelle aufgenommen werden kann. Durch Anfärbung der DNA können Zellen auch hinsichtlich ihrer Zellzyklusverteilung analysiert werden. Der DNA-Gehalt einer Zelle ist abhängig von ihrer jeweiligen Zellzyklus-Phase. Zellen der G_0/G_1 -Phase besitzen den gleichen DNA-Gehalt ($2n$, bei Tumorzellen aber oft abweichend). Die während der S-Phase stattfindende Replikation führt zu einem erhöhten DNA-Gehalt, wobei die Zellen in dieser Phase des Zellzyklus unterschiedlich viel DNA besitzen. Am Ende der S-Phase liegt der DNA-Gehalt bei $4n$. Während der G_2/M -Phase erhöht sich die Menge an DNA nicht mehr. Während der Mitose entstehen schließlich zwei Tochterzellen, welche $2n$ DNA besitzen. In einem Histogramm sind sowohl die Zellen der G_0/G_1 -Phase als auch die der G_2/M -Phase als Peak zu erkennen. Dazwischen liegen die Zellen der S-Phase.

Der Nachweis apoptotischer Zellen durch Färbung mit PI und FACS (Fluorescence activated cells sorting) war durch die sogenannte Sub G_1 -Fraktion möglich: Apoptische Zellen mit weniger als $2n$ DNA erschienen im Histogramm links vom G_0/G_1 -Phase-Peak.

1×10^6 HUVE-, Hepa129 und LLC1-Zellen wurden am Vortag auf 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 4 ml konditioniertem SN (aus 3.4.1) für 2 h inkubiert. Zu den Zellen wurde anschließend 2 ml Zellkulturmedium gegeben und die Zellen für weitere 70 h inkubiert. Als Kontrolle dienten die

entsprechenden Zellen (HUVE-, Hepa129 und LLC1-Zellen), inkubiert mit 2 μM Brefeldin A anstelle des konditionierten SN.

Die Zellen wurden trypsinisiert und bei 200 g für 10 min pelletiert. Um abgelöste Zellen zu pelletieren, wurde das Zellkulturmedium ebenfalls für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in insgesamt 1 ml HBSS (Hank's buffered salt solution) resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurden diese in 10 ml Ethanol (70 %, -20 °C) transferiert und für 24 h bei -20 °C inkubiert.

Anschließend wurden die fixierten Zellen bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden 2 x mit PBS⁺⁺ mit BSA gewaschen, in 40 μl DNA-Extraktionspuffer resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert.

Danach wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert. Zum Abbau der RNA wurde zu den Zellen 50 μl RNase (10 mg/ml) gegeben und 30 min bei RT inkubiert.

Die Analyse der Proben erfolgte in einem Durchflußzytometer bei 488 nm Wellenlänge. Vor Beginn der Messung wurden mit Hilfe der Kontrollprobe die richtigen Parameter ausgewählt. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen hinsichtlich ihres DNA-Gehalts untersucht.

PI wurde im Fluoreszenzkanal 2, der Licht der Wellenlänge 555-560 nm detektiert, gemessen. Der Anteil der Zellen in der SubG₁-Fraktion wurde im Anschluß durch Auswertung der Daten mit Hilfe des Programms WinMDI ermittelt.

3.5 in vivo Experimente

Alle hier aufgeführten Tierexperimente wurden von der Bezirksregierung Köln in einem am 28.03.2002 genehmigten Antrag (Az. 50.203.2-BN 22, 12/01) durchgeführt.

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

3.5.1 Genexpression in vivo

Neben dem Nachweis der Genexpresion *in vitro*, wurde ebenfalls die Expression der Plasminogenderivate *in vivo* untersucht.

5 x 10⁹ pfu/Tier der jeweiligen adenoviralen Konstrukte (AdwthPIg, AdrhPIgK1-4, K1-5, AdmuthPIgK4, K5) und ein Kontrollvektor (AdlacZ) wurden intravenös in Balb/c-Mäuse

injiziert. Drei Tage später wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Leber explantiert.

Isolierung von RNA aus dem Lebergewebe erfolgte mit Hilfe des Nucleobond RNAII Kits. Dazu wurde von jedem Tier ein ca. 2 x 2 mm großes Leberfragment in einem Dounce-Homogenisator (2 ml Volumen) homogenisiert und weiter nach den Angaben des Herstellers aufbereitet. Die RNA wurde in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und der RNA-Gehalt photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Die RT-Reaktion erfolgte wie vorbeschrieben (Abschnitt 3.3.2). Es wurde 1 µg RNA eingesetzt.

Die anschließende PCR wurde wie folgt angesetzt:

RedTaq Ready Mix.....	25 µl
Primer forward (100 mM).....	1 µl
Primer reverse (100 mM).....	1 µl
cDNA aus Lebergewebe.....	5 µl
ad 50 µl A. bidest	

PCR-Standardbedingungen:

95 °C für 90 s

40 Zyklen: 95 °C für 20 s
 55 °C für 30 s
 72 °C für 90 s

72 °C für 10 min

Die PCR wurde mit für die entsprechenden Kringleregionen spezifischen Primern (forward: S1; reverse: K1-4rev, K1-5rev, K5rev) durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde eine PCR mit Primern für murines β-Actin durchgeführt:

94 °C für 5 min

60 °C für 5 min

30 Zyklen: 72 °C für 90 s
 94 °C für 45 s
 60 °C für 45 s
 72 °C für 90 s

72 °C für 10 min

Nach der PCR wurden je 10 µl der PCR-Ansätze auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetragen und aufgetrennt.

3.5.2 *in vivo* Matrigel-Assay

Dieses in ähnlicher Form bereits *in vitro* durchgeführte Assay sollte zeigen, inwieweit die adenoviralen Konstrukte in der Lage sind, die Einsprossung von Endothelzellen und somit die Blutgefäßbildung *in vivo* zu inhibieren. Matrigel wurde subkutan injiziert und die Einsprossung von Endothelzellen beurteilt.

Balb/c Mäuse wurden mit einer Kombination aus 0,01 mg/g Körpergewicht Rompun (2 %) 0,1 mg/g Körpergewicht Ketamin in 0,9 % NaCl-Lösung (100 µl Endvolumen) durch intraperitoneale Injektion betäubt und anschließend bauchseits rasiert. 500 µl Matrigel (versetzt mit 10 ng/ml VEGF) wurde jeweils rechts und links der midabdominalen Region subkutan injiziert (entspricht 2 Matrigel-Depots/Tier). 24 h später wurden die Tiere durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene mit den adenoviralen Konstrukten (AdlacZ, AdwthPIg, AdmuthPIgK4, K5, AdrhPIgK1-4, K1-5) mit 5×10^9 pfu/Maus (ad 150 µl 0,9 % NaCl) behandelt. Sieben Tage später wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Matrigel-Depots inklusive Peritoneum und Haut entnommen. Diese wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und immunhistologisch aufbereitet. Dazu wurden Cryoschnitte angefertigt und diese gegen CD31 immunhistochemisch gefärbt.

3.5.3 Tumormodelle

3.5.3.1 Etablierung eines subkutanen LLC-Modells in C57bl/6-Mäusen

Das Lewis Lung Cancer Modell wurde als Referenzmodell zum subkutanen HCC-Modell eingesetzt, da es das erste Tumormodell war, in dem angiostatische Effekte nachgewiesen werden konnten (Folkman, 1995; O'Reilly et al., 1996). Es handelte sich bei diesem Modell um ein subkutanes Tumormodell mit progressiv wachsenden Tumoren. Alle in dieser Arbeit synthetisierten adenoviralen Plasminogenderivate wurden zuerst in diesem Tumormodell getestet.

Zur Etablierung der subkutanen (sc.) Tumoren wurden C57bl/6 Mäuse wie in 3.5.2 beschrieben betäubt. Die Mäuse wurden dorso-ventral rasiert und 1×10^6 LLC1-Zellen (in 100 µl DMEM) sc. in die rechte hintere Flanke injiziert. Die Tiere wurden bis zum Erreichen eng beobachtet.

Die Kontrolle des Tumorwachstums erfolgte alle zwei Tage. Bei Erreichen eines Tumolvolumen von 50 mm^3 (nach 3 bis 5 Tagen) wurde die systemische Therapie begonnen.

3.5.3.2 Etablierung eines subkutanen HCC-Modells in C3H-Mäusen

Hierbei handelt es sich um ein HCC-Tumormodell, an welchem die Wirkung der Plasminogen-Fragmente getestet werden sollte. Das sc. Tumormodell ist im Wachstumsverhalten mit dem LLC-Modell vergleichbar, die Tumoren wachsen ebenfalls innerhalb von sieben bis zehn Tagen und lassen sich daher schon nach kurzer Zeit therapieren. Die Verlaufskontrolle gestaltet sich durch die gut sichtbaren Tumoren einfach.

Zur Etablierung sc. Tumoren in C3H-Mäusen wurden Hepa129-Zellen sc. injiziert. Die Mäuse wurden vor der Tumorzellinokulation wie in 3.5.2 betäubt. Anschließend wurden die Mäuse dorso-ventral rasiert und die Zellsuspension (1×10^6 Zellen in $100 \mu\text{l}$ RPMI1640) vorsichtig subkutan injiziert. Die Tiere wurden bis zum Erwachen eng beobachtet.

Nach zwei bis drei Tagen waren die Tumoren ertastbar. Bei Erreichen eines Tumovolumens von 150 mm^3 (nach fünf bis sieben Tagen) wurde die Therapie begonnen.

3.5.4 Tumorthherapie

Zur Therapie der sc. Tumoren wurden die in adenoviralen Vektoren vorliegenden synthetisierten Plasminogen-Derivate (wthPIg, rhPIgK1-4, rhPIgK1-5, muthPIgK4, muthPIgk5) eingesetzt. Als Kontrollvektor diente AdlacZ.

Die angiostatischen Therapien erfolgten zum einen systemisch über intraperitoneale Injektion in den Bauchraum oder durch intratumorale Injektion.

Im Verlauf wurden die Tumore in den beiden Modellen in zwei Ebenen gemessen. Die Formel

$$\text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,52$$

für elipsoide Körper ließ dabei eine ungefähre Berechnung des Tumolvolumens zu.

3.5.4.1 Systemische Therapie

Die systemische Gabe der adenoviralen Vektoren (AdlacZ, AdwthPIg; AdmuthPIgK4, -K5; AdrhPIgK1-4, -K1-5) erfolgte in einer Konzentration von 5×10^9 pfu/Maus in 150 μ l 0,9 % NaCl intraperitoneal in den Bauchraum.

Nach Beginn der Therapie wurde der Allgemeinzustand der Tiere alle zwei Tage kontrolliert und dabei die Tumorgröße durch Messung der Länge und Breite ermittelt. Beim Erreichen eines Tumordurchmessers von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

3.5.4.2 Intratumorale Therapie

Zur intratumoralen Injektion wurden die adenoviralen Plasminogenderivate in einer Konzentration von 5×10^9 pfu/Maus (in 50 μ l 0,9 % NaCl) appliziert. Zur leichteren Durchführbarkeit wurden die Tiere vorher wie oben beschrieben betäubt. Die Injektion erfolgte zentral in den Tumor.

Nach Beginn der Therapie wurde der Allgemeinzustand der Tiere alle zwei Tage kontrolliert und die Tumoren vermessen. Bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

3.6 *Histologie*

Zur histologischen Untersuchung der Vaskularisierung der Tumoren wurden Tumoren von Tieren, die aufgrund ihrer Tumorgröße getötet werden mußten, explantiert und histologisch aufbereitet. Diese Untersuchung sollte Aufschluß darüber geben, ob die Wirkung der Plasminogenderivate auf angiostatische Effekte zurückzuführen ist.

3.6.1 Herstellung von Cryo-Gewebeschnitten

Zur Herstellung von Cryo-Gewebeschnitten wurden Gewebeproben oder Matrigelkissen direkt nach der Entnahme in flüssigem N₂ für 10 min schockgefroren und anschließend in TissueTek eingebettet. Die Herstellung von Gewebeschnitten erfolgte in 6 μ m Dicke für Tumorgewebe und 10 μ m für Matrigel an einem Gefrier-Mikrotom. Anschließend wurden die Schnitte bei RT getrocknet und immunhistochemisch aufbereitet.

3.6.2 Immunhistochemische Färbung von Cryoschnitten

Die immunologische Färbung von CD31 (PECAM, Placental/Endothelial Cell Adhesion Molecule) visualisiert Endothelzellen, welche die Wände von Blutgefäßen auskleiden. CD31 wird von Endothelzellen exprimiert und spielt eine Rolle beim Durchtritt von phagozytotischen Leukozyten aus Blutgefäßen an entzündliche Orte.

Es wurden wie in 3.6.1 beschrieben Cryoschnitte von Tumorgewebebeobachten und Matrigelproben in 6 µm, bzw. 10 µm Dicke hergestellt.

Die Schnitte wurden ü. N. bei RT getrocknet und am Folgetag für 10 min in Aceton (4 °C) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min bei RT getrocknet und mit einem Wachsstift zur besseren Durchführbarkeit der Färbung eingekreist.

Die Schnitte wurden zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit Kaninchenserum (1:5 in PBS verdünnt) für 10 min inkubiert. Das Serum wurde vorsichtig entfernt und anschließend mit Primärantikörper (rat anti mouse CD31, 1:200 in Antibody Diluent) ü. N. bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte für 15 – 20 min auf RT gebracht und 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (rabbit anti rat, 1:200 in Antibody Diluent) für 30 min bei RT.

Danach wurden die Schnitte erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Schnitte mit Streptavidin Peroxidase für 30 min inkubiert.

Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit AEC-Substrat für 15 min inkubiert.

Danach wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen und eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun durchgeführt:

Dazu wurden die Schnitte 5 min mit Mayers Hämalaun inkubiert und anschließend unter fließendem kaltem Leitungswasser gebläut.

Abschließend wurden die Präparate in Aquatex eingedeckelt.

3.7 Statistik

Alle Statistik-Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms InStat durchgeführt.

Von allen Daten wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) angegeben.

Unterschiede in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen, sowie Unterschiede in den Tumervolumina wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney Test für ungepaarte Stichproben ermittelt.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des log-rank Tests. p-Werte <0,05 wurden als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Synthese der Plasminogenderivate

4.1.1 Synthese der cDNA für rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5

Die Generierung von rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 erfolgte durch Austausch von 8 Nucleotiden gegen ein Stop-Codon und die HindIII-Schnittstelle. Als Matrize diente cDNA der Wildtypform des humanen Plasminogen (wthPlg). Durch PCR mit spezifischen Primern wurden die Fragmente synthetisiert. Nach der vollständigen Sequenzierung wurden die PCR-Produkte in den Konstruktionsvektor pSTBlue-1 inkloniert und durch Blau-Weiß-Screening positive Klone selektioniert. Diese wurden durch HindIII/NotI-Verdau auf die korrekte Insertion des Transgens überprüft.

rhPlgK1-4:

5' - aggtgggagtactgcaacctgaaaaaatgctcaggaacagaagcgt**taa**aagctt -3'

Originalsequenz:

5' - aggtgggagtactgcaacctgaaaaaatgctcaggaacagaagcgcgagtgttgta -3'

rhPlg-K1-5:

5' - ctttacgactactgtgatgtccctcagtgtgcggcccttcatttt**taa**aagctt -3'

Originalsequenz:

5' - ctttacgactactgtgatgtccctcagtgtgcggcccttcatttgattgtggg -3'

Abbildung 9: Ausschnitt aus den Sequenzierungen für rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5. Durch PCR mit spezifischen Primern (T7, PlgK1-4rev und PlgK1-5rev) wurde ein Stop-Kodon (taa, fett dargestellt) und eine anschließende HindII-Schnittstelle (aagctt, unterstrichen dargestellt) in cDNA von wthPlg eingeführt. Der korrekte Austausch der Nucleotide wurde durch Sequenzierung mit dem Primer K4for überprüft. Die vollständige cDNA wurde mit Signal I und PlgSeq sequenziert, um Mutationen in der Wildtypsequenz ausschließen zu können.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte zur Synthese von rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 zeigte die korrekte Einführung des Stop-Codons sowie der danach folgenden HindIII-Schnittstelle hinter Kringle 4 bzw. hinter Kringle 5 (Abbildung 9).

Um Mutationen im Transgen auszuschließen, wurde die vollständige cDNA (rhPlgK1-4, rhPlgK1-5) sequenziert. Es konnten dabei keine Mutationen in der Wildtypsequenz detektiert werden, so daß die cDNA für nachfolgende Versuche eingesetzt werden konnte.

Die Ligation der PCR-Produkte mit dem Konstruktionsvektor pSTBlue-1 wurde neben einer Blau-Weiß-Selektion auch über Verdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und NotI überprüft.

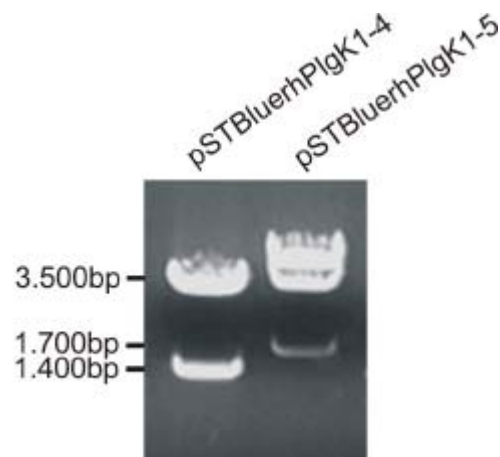


Abbildung 10: Verdau von pSTBluerhPlgK1-4 und pSTBluerhPlgK1-5 mit HindIII und NotI im Agarose-Gel (1 %). Nach der Inserierung des Stop-Kodons und der HindIII-Schnittstelle wurde rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 in den Vektor pSTBlue (linearisiert mit HindIII und NotI) subkloniert. Nach der Ligation wurden die Plasmide pSTBluerhPlgK1-4 und pSTBluerhPlgK1-5 mit HindIII und NotI verdaut um so die korrekte Insertion des Transgens zu überprüfen

Der Verdau von pSTBluerhPlgK1-4 und -K1-5 zeigte für beide Plasmide eine Bande auf der Höhe von 3.500 bp. Für pSTBluerhPlgK1-4 zeigte sich eine weitere Bande auf der Höhe von 1.400 bp und für pSTBluerhPlgK1-5 eine weitere Bande auf Höhe von 1.700 bp, passend zu den erwarteten Fragmentgrößen von 1419 bp für rhPlgK1-4 und 1737 bp für rhPlgk1-5, sowie 3476 bp für den Vektor pSTBlue (Abbildung 10).

4.1.2 Synthese der Furin-Erkennungsstellen

Durch zielgerichtete Mutagenese strangabwärts der Kringleregionen 4 oder 5 von Plasminogen wurden Erkennungsstellen für die Endoprotease Furin eingeführt. Dadurch sollte eine Abspaltung der einzelnen Kringleregionen auf Proteinebene erfolgen. Der Nucleotid-Austausch gegen zwölf Nucleotide kodierend für vier Arginin erfolgte mit dem Site directed Mutagenesis Kit und durch PCR basierte Mutagenese.

Nach erfolgter Mutagenese wurden Klone zur Kontrolle auf die eingeführte Furin-Erkennungsstelle sequenziert.

muthPlgK4:

5' - caggtgggagtactgcaacctgaaaaaatgctcac**ggagacggagg**agtgtttagca
cctccgcctg -3'

Originalsequenz:

5' - caggtgggagtactgcaacctgaaaaaatgctcaggaacagaagc**gag**agtgtttagca
cctccgcctg -3'

muthPlgK5:

5' - tactgtagtcctcagtggtgcgcccttcattt**agacgtaggagg**cctcaagtggag
ccgaagaaatgtcc - 3'

Originalsequenz:

5' - tactgtagtcctcagtggtgcgcccttcattt**gattgtgggaag**cctcaagtggag
ccgaagaaatgtcc - 3'

Abbildung 11: Ausschnitte aus den Sequenzierungen für muthPlgK4 und muthPlgK5. Durch den Austausch von zwölf Nucleotiden durch zielgerichtete Mutagenese wurde eine Erkennungsstelle für die Endoprotease Furin, bestehend aus vier aufeinanderfolgenden Arginin, in Plasminogen-cDNA generiert (fett dargestellt). Die entsprechende Wildtypsequenz ist unterstrichen dargestellt. Die korrekte Insertion der Nucleotide wurde durch Sequenzierung überprüft. Dazu wurden die Primer K4for und K5rev eingesetzt. Durch Sequenzierung mit den Primern Signal I und PlgSeq wurden Mutationen in der Wildtypsequenz von Plasminogen ausgeschlossen.

Sowohl mit dem Site Directed Mutagenesis Kit als auch mit der auf PCR basierenden Methode konnte die aus vier Arg bestehende Erkennungssequenz für Furin strangabwärts Kringle 4 (muthPlgK4) oder Kringle 5 (muthPlgK5) von Wildtyp-Plasminogen eingeführt werden. Die Furin-Erkennungsstelle war an der richtigen Stelle lokalisiert und die cDNA-Sequenz zur Kodierung der vier Arginin stimmte mit der Primer-Sequenz überein (Abbildung 11). Eine Sequenzierung der vollständigen cDNA zeigte, daß keine spontanen Mutationen in der Wildtypsequenz vorlagen.

4.2 Synthese der rekombinanten adenoviralen Vektoren

4.2.1 Konstruktion der pShuttleCMV-Vektoren

Die durch zielgerichtete Mutagenese synthetisierten Plasminogenderivate muthPlgK4 und muthPlgK5, die durch PCR synthetisierten Derivate rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 und wthPlg wurden zur Konstruktion rekombinanter Adenoviren in den adenoviralen Helfervektor pShuttleCMV einkloniert. Dazu wurden die Plasminogenderivate, sowie Wildtyp-Plasminogen mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI aus den Vektoren pBluescript (wthPlg, muthPlgK4 und muthPlgK5) und pSTBlue-1 (rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5) ausgeschnitten und in den mit den gleichen Endonucleasen geschnittenen Vektor pShuttleCMV einkloniert. Die Insertion der Plasminogenderivate wurde durch Verdau mit HindIII und NotI überprüft.

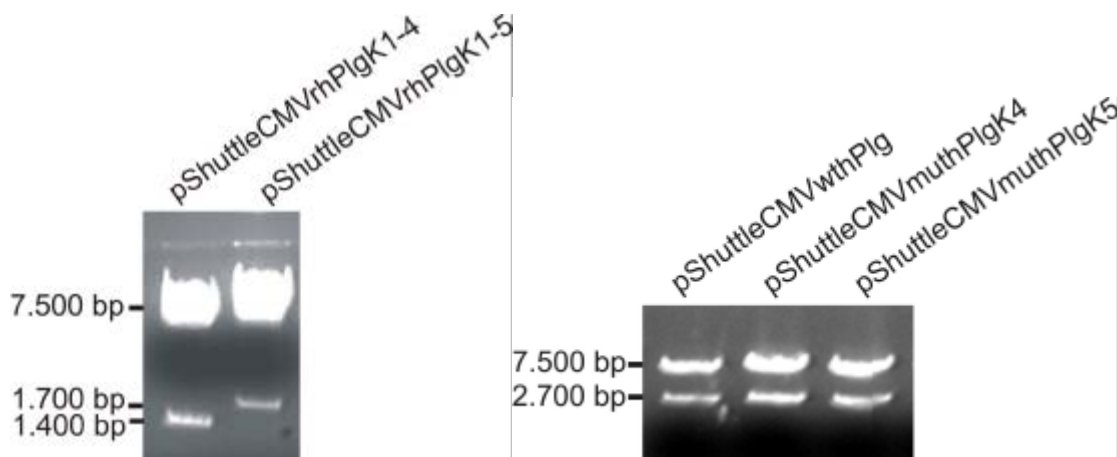


Abbildung 12: Agarose-Gel (1 %) nach Verdau der pShuttleCMV-Plasminogenderivate mit HindIII und NotI. Die Plasminogenderivate wurden aus pSTBlue und pBluescript durch Verdau mit HindIII und NotI ausgeschnitten und in den adenoviralen Helfervektor pShuttleCMV (verdaut mit HindIII und NotI) einkloniert. Die pShuttleCMV-Plasminogenderivate wurden in E.coli XL1-blue transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Aus je einem Klon wurde DNA isoliert und auf die korrekte Ligation der Plasminogenderivate mit dem Vektor durch Verdau mit HindIII und NotI überprüft.

Durch Verdau mit HindIII und NotI konnte im Agarose-Gel die Ligation der Plasminogenderivate nachgewiesen werden. Alle fünf Plasmide wiesen für pShuttleCMV eine Bande auf der Höhe von 7.500 bp auf. pShuttleCMVrhPlgK1-4 wies neben einer Bande auf der Höhe von 7.500 bp eine weitere auf der Höhe von 1.400 bp auf (entspricht rhPlgK1-4). pShuttleCMVrhPlgK1-5 wies für rhPlgK1-5 eine zusätzliche Bande auf der Höhe von 1.700 bp auf. Für pShuttleCMVwthPlg, -muthPlgK4 und -

muthPlgK5 lag eine zusätzliche Bande auf der Höhe von 2.700 bp, was dem jeweiligen Insert entsprach (Abbildung 12).

Die erwarteten Fragmentgrößen lagen für pShuttleCMV bei 7462 bp, sowie für rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5 bei 1419 bp bzw. 1737 bp. Für wthPlg, muthPlgK4 und muthPlgK5 lagen die erwarteten Fragmentgrößen bei 2712 bp.

4.2.2 Rekombination von pShuttleCMV mit AdEasy1

Nach erfolgreicher Ligation der Plasminogenderivate in pShuttleCMV wurden die pShuttleCMV-Plasminogenderivate in einer Midi-Präparation amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend wurden die Plasmide mit PmeI linearisiert und mit dem adenoviralen Vektor AdEasy1 in rec(A⁺) Bakterien (BJ5183) rekombiniert. Nach der Rekombination wurden die Rekombinationsansätze auf Agarplatten ausplattiert und am Folgetag die kleinsten Kolonien für eine Minipräparation und anschließendem Verdau mit PacI weiter kultiviert.

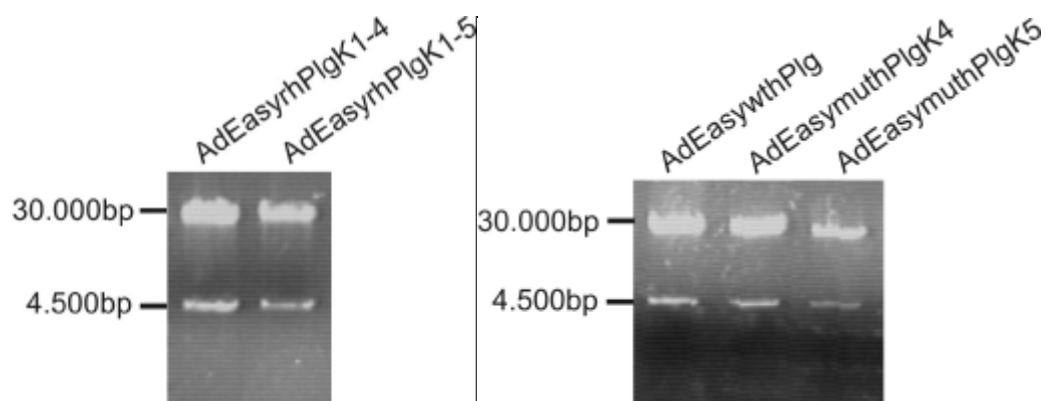


Abbildung 13: PacI Verdau nach erfolgter Rekombination der pShuttleCMV-Plasminogenderivate mit AdEasy1 im Agarose-Gel (0,8 %). Die pShuttleCMV-Plasminogenderivate wurden mit PmeI linearisiert und mit AdEasy1 rekombiniert. Die Rekombinationsansätze wurden in E.coli BJ5183 transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Aus den kleinsten Kolonien wurde DNA isoliert und zur Kontrolle auf die Rekombination mit PacI verdaut.

Der PacI-Verdau der AdEasy-Plasminogenderivate (Abbildung 13) zeigte für jedes Plasmid ein großes DNA-Fragment bei 30.000 bp und ein kleines Fragment bei 4.500 bp, bedingt durch zwei PacI-Schnittstellen, die der rekombinierte Vektor enthielt.

Dies entsprach den erwarteten Fragmentgrößen von 30.000 bp und 4.500 bp für das PacI verdaute rekombinierte Plasmid.

4.2.3 Transfektion der AdEasy1-Konstrukte

Nach erfolgreicher Rekombination der pShuttleCMV-Plasminogenderivate mit dem adenoviralen Vektor AdEasy-1 wurden die entstandenen AdEasy1-Plasminogenderivate in einer Maxi-Präparation amplifiziert und aufgereinigt. 5 – 10 µg der so gewonnenen DNA wurde dann für eine Lipofektion in 911-Zellen eingesetzt. Dazu wurden 911-Zellen mit Lipofectamine und DNA inkubiert und anschließend bis zum Einsetzen zytopathischer Effekte weiter kultiviert.

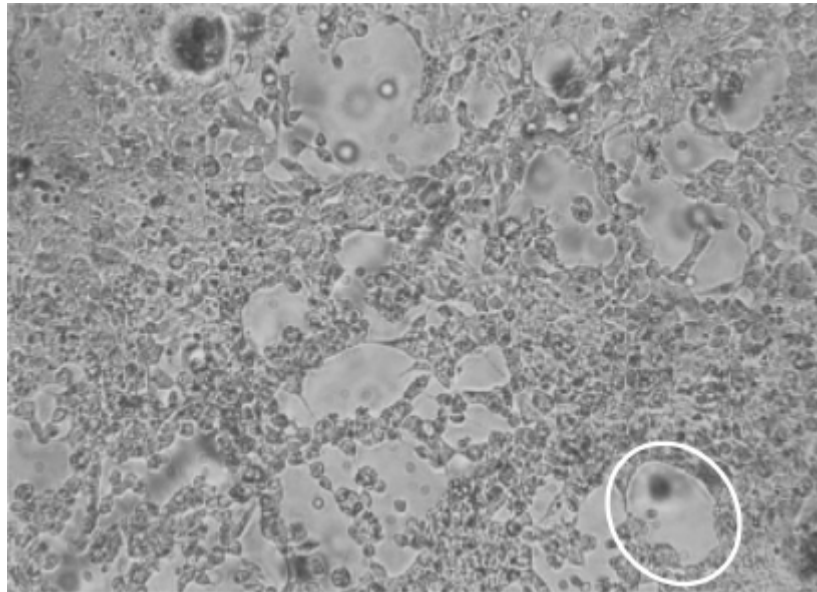


Abbildung 14: 911-Zellen acht Tage nach einer Lipofektion mit AdEasywthPlg. 4×10^5 911-Zellen wurden mit 5 µg der AdEasy1-Plasminogenderivate (linearisiert mit PacI) lipofektiert und acht bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Abbildung zeigt ein typisches Bild nach Virusinfektion von 911-Zellen. Die eingekreiste Stelle markiert einen lytischen Plaque. (Vergrößerung 400fach)

Die Bildung von Plaques setzte ab dem achten Tag ein. Es entstand ein „Loch“ (lytischer Plaque) im Zellrasen, welches sich mit steigender Inkubationszeit ausbreitete (Abbildung 14). Am Rande des Plaques begannen die Zellen, sich vom Zellkulturflaschenboden zu lösen und sich abzukugeln (zytopathischer Effekt). Für alle Plasminogenderivate setzte dieser Prozeß nach acht bis zwölf Tagen ein. Die Synthese der adenoviralen Vektoren in 911-Zellen wurde durch erneute Infektion von 911-Zellen mit Überstand aus den Lipofektionen überprüft. Auch hier führten alle adenoviralen Konstrukte zu einer erneuten Infektion von 911-Zellen und der Bildung lytischer Plaques.

4.2.4 Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren

Zur Amplifikation der durch Lipofektion synthetisierten Adenoviren wurden 911-Zellen auf 30 T175-Zellkulturflaschen expandiert und mit einem der Adenoviren kodierend für die Plasminogenderivate infiziert. Nach vollständiger Infektion (zytopathischer Effekt bei 80 – 90 % der Zellen) wurden diese geerntet. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung erfolgte über eine doppelte CsCl-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation und anschließende Dialyse gegen PBS.

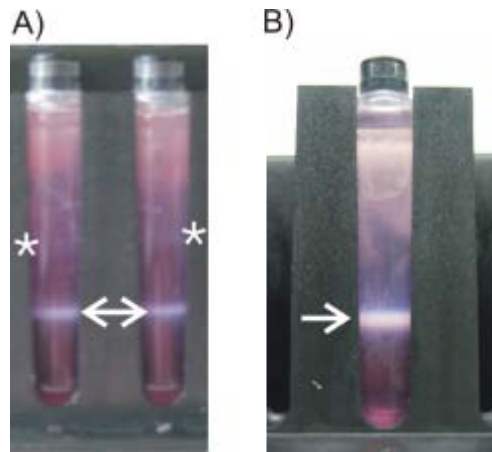


Abbildung 15: Virusbande in einem Zentrifugenröhrchen nach der A) ersten und B) nach der zweiten CsCl-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation. Die durch Lipofektion synthetisierten Adenoviren wurden in 911-Zellen expandiert und durch doppelte CsCl-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation und anschließende Dialyse gegen PBS konzentriert und aufgereinigt. Die zu aspirierende Virusbande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die mit * gekennzeichnete Virusbande stellt defektive, nicht infektiöse Viruspartikel dar.

Nach der ersten Aufreinigung durch CsCl-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation zeigten sich im Zentrifugenröhrchen in der Regel zwei milchig gefärbte Banden, wobei es sich bei der oberen dünnen Bande um defektive, nicht infektiöse Viruspartikel mit geringerer Dichte handelte (Abbildung 15A). Die untere dicke Bande, welche die replikationsdefizienten Viren enthält, wurde aspiriert und erneut zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation war im Zentrifugenröhrchen nur noch eine milchige Bande erkennbar (Abbildung 15 B). Diese wurde erneut aspiriert und über Dialyse aufgereinigt. Nach erfolgter Dialyse konnten im Durchschnitt 2 ml Viruslösung gewonnen werden.

Nach der Aufreinigung wurden für die jeweiligen Viren die Gesamtheit der Viruspartikel (opu/ml) und die Anzahl tatsächlich infektiöser Partikel (pfu/ml) über photometrische Messung und Plaque Assay bestimmt.

Die Gesamtheit der Viruspartikel schwankte zwischen 1×10^{12} und 8×10^{12} opu/ml.

Im Mittel lagen die durch Plaque Assay ermittelten Virustiter um bis zu einer Zehnerpotenz unter den Werten der opu-Bestimmung. Die Virustiter lagen im Bereich von 1×10^{11} bis 4×10^{12} pfu/ml.

Tabelle 3: Übersicht über opu/ml und pfu/ml der einzelnen Viruskonstrukte:

Viruskonstrukt	opu/ml	pfu/ml
AdlacZ	$2,13 \times 10^{12}$	$8,0 \times 10^{11}$
AdwthPIg	$7,83 \times 10^{12}$	$3,58 \times 10^{12}$
AdrhPIgK1-4	$1,18 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{11}$
AdrhPIgK1-5	$1,38 \times 10^{12}$	$1,24 \times 10^{11}$
AdmuthPIgK4	$1,21 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{11}$
AdmuthPIgK5	$1,35 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^{11}$

Es konnten ausreichende Mengen Virus in entsprechend hohen Titerstufen für *in vitro* und *in vivo* Versuche hergestellt werden.

4.2.5 Nachweis der Replikationsdefizienz

Zum Nachweis der Replikationsdefizienz der synthetisierten Adenoviren wurden A549-Zellen mit den verschiedenen Viruskonstrukten in verschiedenen hohen Konzentrationen infiziert und für mehrere Tage inkubiert. Die Bildung lytischer Plaques in diesen Zellen zeigte dabei eine Kontamination mit Wildtypvirus an.

Jedes der adenoviral vorliegenden Plasminogenderivate wies keine erkennbare Wildtypkontamination auf. Nach achttägiger Inkubationszeit waren alle Zellkulturschalen frei von lytischen Plaques.

4.2.6 Nachweis des Transgens im Virus

Nach der Herstellung der rekombinanten Adenoviren wurde aus SN von infizierten 911-Zellen Virus-DNA isoliert, um diese auf das Transgen zu untersuchen. Dazu wurde der Virus aus dem SN durch eine Ultrazentrifugation pelletiert und anschließend mit Proteinase K verdaut. Danach wurde die Virus-DNA mittels Ethanolfällung präzipitiert und in einer PCR mit spezifischen Primern für die entsprechenden Transgene eingesetzt. Nach erfolgter PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente sequenziert.

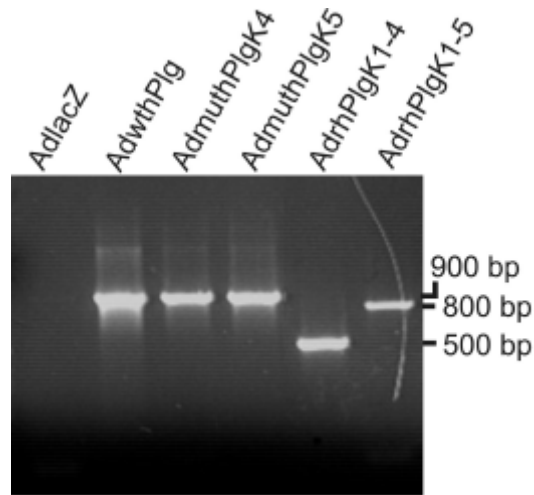


Abbildung 16: Agarose-Gel (1,2 %) der PCR aus Virus-DNA mit spezifischen Primern für Plasminogen. DNA wurde aus Virus-haltigem SN durch Verdau mit Proteinase K und anschließender Phenol-Chloroform- und Ethanol-Fällung isoliert. Die verschiedenen Plasminogenderivate wurden durch PCR mit spezifischen Primern (PlgSeq als forward Primer, PlgK1-4rev als reverse Primer für AdrhPlgK1-4, PlgK1-5rev als reverse Primer für AdrhPlgK1-5 und K5rev als reverse Primer für AdwthPlg, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5) amplifiziert. Zur Kontrolle wurde die PCR mit DNA aus AdlacZ durchgeführt (mit den Primern PlgSeq und K5rev).

DNA aus AdlacZ zeigte, wie erwartet, keine Bande im Agarose-Gel. DNA aus AdwthPlg, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 wies jeweils eine Bande, entsprechend dem jeweiligen Transgen, auf der Höhe von 900 bp auf. DNA aus AdrhPlgK1-4 zeigte passend zu rhPlgk1-4 eine Bande auf der Höhe von 500 bp, und DNA aus AdrhPlgK1-5 passend zu rhPlgk1-5 auf der Höhe von 800 bp.

Die erwarteten Fragmentgrößen lagen für AdwthPlg, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 bei 954 bp, für AdrhPlgK1-4 bei 504 bp und für AdrhPlgK1-5 bei 822 bp. Für AdlacZ wurde keine Bande erwartet.

Durch die PCR der Virus-DNA (Abbildung 16) konnte gezeigt werden, daß alle Adenoviren ihr spezifisches Transgen enthalten.

Darüber hinaus wurde die Virus-DNA vollständig sequenziert, um Mutationen im Transgen auszuschließen.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte aus der Virus-DNA Isolierung zeigte keine Mutationen in den einzelnen Transgenen. Alle Mutationsstellen wurden korrekt inseriert. Spontane Mutationen in den nicht veränderten cDNA-Abschnitten konnten nicht nachgewiesen werden.

4.3 Nachweis der Genexpression *in vitro*

Der Nachweis der Transgenexpression nach Infektion mit den adenoviralen Vektoren wurde mittels RT-PCR aus infizierten A549-Zellen durchgeführt. Dazu wurde RNA aus A549-Zellen isoliert, welche mit den verschiedenen Adenoviren kodierend für die Plasminogenderivate infiziert worden waren. Die isolierte RNA wurde revers transkribiert und in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für Plasminogen eingesetzt. Als Kontrollprimer dienten Primer für humanes β -Actin.

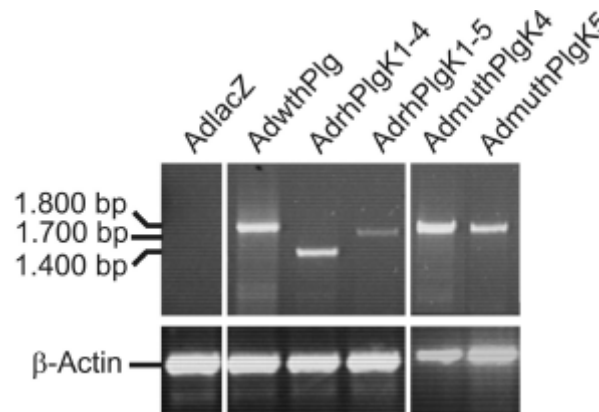


Abbildung 17: Agarose-Gel (1 %) der PCR aus cDNA von A549-Zellen transduziert mit AdlacZ (Kontrolle) AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4, AdmuthPlgK5. 5×10^5 A549-Zellen wurden mit 500 MOI der verschiedenen Adenoviren kodierend für die Plasminogenderivate transduziert. 48h später wurde aus den Zellen RNA isoliert, revers transkribiert und in einer PCR eingesetzt. Als forward Primer wurde für alle Proben Signal I eingesetzt, als reverse Primer PlgK1-4rev (für rhPlgK1-4), PlgK1-5rev (für rhPlgK1-5) und K5rev (für lacZ, wthPlg, muthPlgK4 und muthPlgK5). Primer für humanes β -Actin wurden als Positivkontrolle auf die erfolgreiche RT-Reaktion eingesetzt.

Für alle untersuchten cDNAs aus den mit den verschiedenen Adenoviren transduzierten Zellen konnte im Agarose-Gel eine Bande für β -Actin nachgewiesen werden. Mit spezifischen Primern für Plasminogen zeigte cDNA aus AdlacZ-transduzierten Zellen im Agarose-Gel erwartungsgemäß keine Bande. cDNA aus Zellen transduziert mit AdwthPlg zeigte mit Primern für Plasminogen eine Bande in der Höhe von 1.800 bp, was dem Transgen entsprach. Eine Bande auf gleicher Höhe zeigten auch entsprechend der Transgene cDNA aus AdmuthPlgK4- und AdmuthPlgK5-transduzierten Zellen. cDNA aus Zellen transduziert mit AdrhPlgK1-4 zeigte mit Plasminogen-spezifischen Primern passend zu rhPlgK1-4 eine Bande auf der Höhe von 1.400 bp, cDNA aus AdrhPlgK1-5-transduzierten Zellen auf der Höhe von 1.700 bp (Abbildung 17).

Die erwarteten Fragmentgrößen lagen für AdwthPIg, AdmuthPIgK4 und AdmuthPIgK5 bei 1806 bp. Für AdrhPIgK1-4 und AdrhPIgK1-5 lagen sie bei 1356 bp, bzw. 1654 bp. Für AdlacZ ist keine Bande zu erwarten.

Durch die Isolierung von RNA und anschließende RT-PCR aus transduzierten A549-Zellen konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Plasminogenderivate *in vitro* exprimiert werden.

4.4 *in vitro* Experimente

Die Auswirkungen der synthetisierten Plasminogenderivate auf Endothelzellen und Tumorzellen wurden zuerst *in vitro* anhand verschiedener funktioneller Assays untersucht.

4.4.1 Tube Formation Assay

Die Auswirkungen der Plasminogen-Derivate auf die Bildung von interzellulären Verbindungen von Endothelzellen wurde im Matrigel-Assay untersucht. Dazu wurden HUVE-Zellen auf Matrigel ausgesät und mit konditioniertem SN von mit AdlacZ, AdwthPIg, AdrhPIgK1-4, AdrhPIgK1-5, AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 infizierten Zellen inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen endothelähnlicher Strukturen im Durchlichtmikroskop (400fache Vergrößerung). Diese kennzeichneten sich dadurch, daß die Endothelzellen ringförmige, geschlossene Strukturen, sog. „tube-like structures“, ausbildeten.

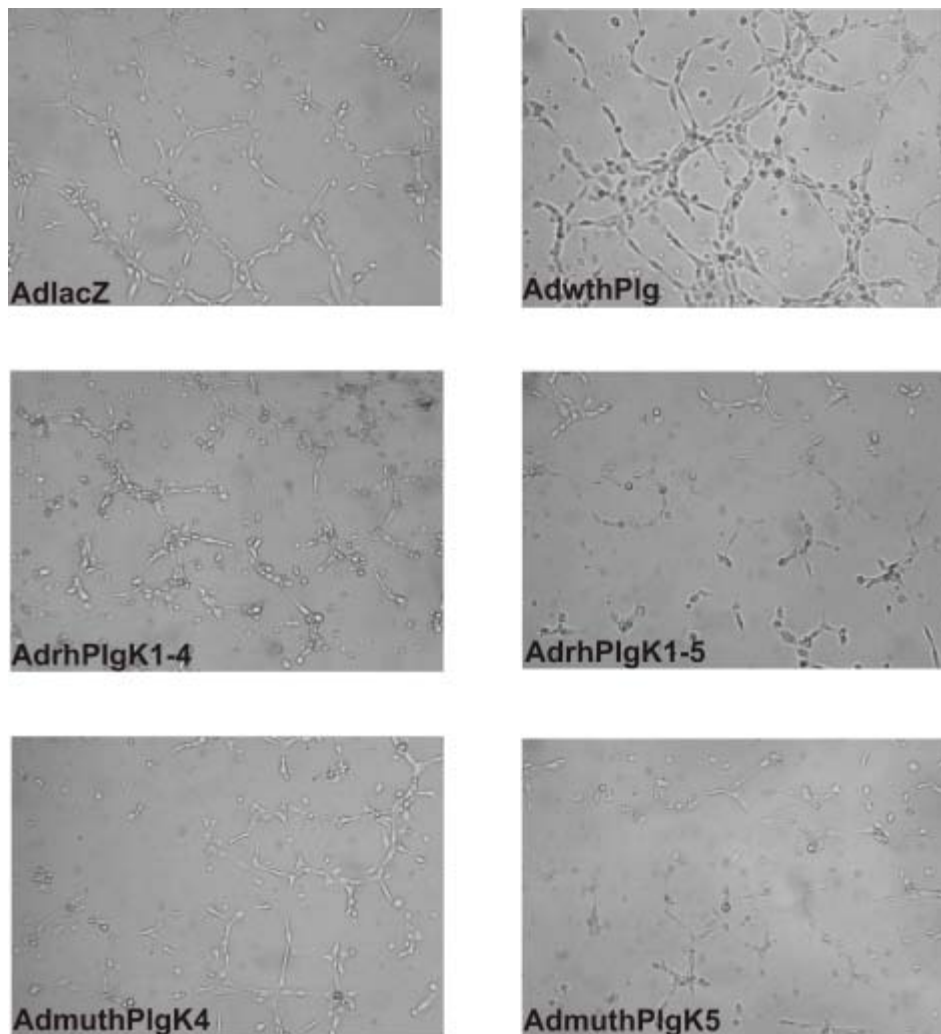


Abbildung 18: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 400fach) von HUVE-Zellen auf Matrigel. $2,5 \times 10^4$ HUVE-Zellen wurden auf Matrigel (versetzt mit 10 ng/ml VEGF) ausgesät und für 4 h mit konditioniertem SN (von Zellen infiziert mit AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 und -K5,) inkubiert. Die Bildung ringförmiger, geschlossener Strukturen (tubes) wurde unter dem Lichtmikroskop quantifiziert.

Abbildung 18 zeigt HUVE-Zellen, welche mit Überstand von mit Adenoviren kodierend für die verschiedenen Plasminogenderivate infizierten Zellen inkubiert worden sind. Deutlich waren für HUVE-Zellen, die mit SN von Adlacz und AdwthPlg infizierten A549-Zellen inkubiert wurden, ringförmige Strukturen erkennbar, die durch interzelluläre Verbindungen der HUVE-Zellen zustande kamen. Bei HUVE-Zellen, die mit SN von AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 infizierten Zellen inkubiert worden sind, waren deutlich weniger ringförmige Strukturen erkennbar. SN von Zellen, welche mit AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 infiziert worden sind, führte bei HUVE-Zellen ebenfalls zu einer Reduktion der interzellulären Verbindungen.

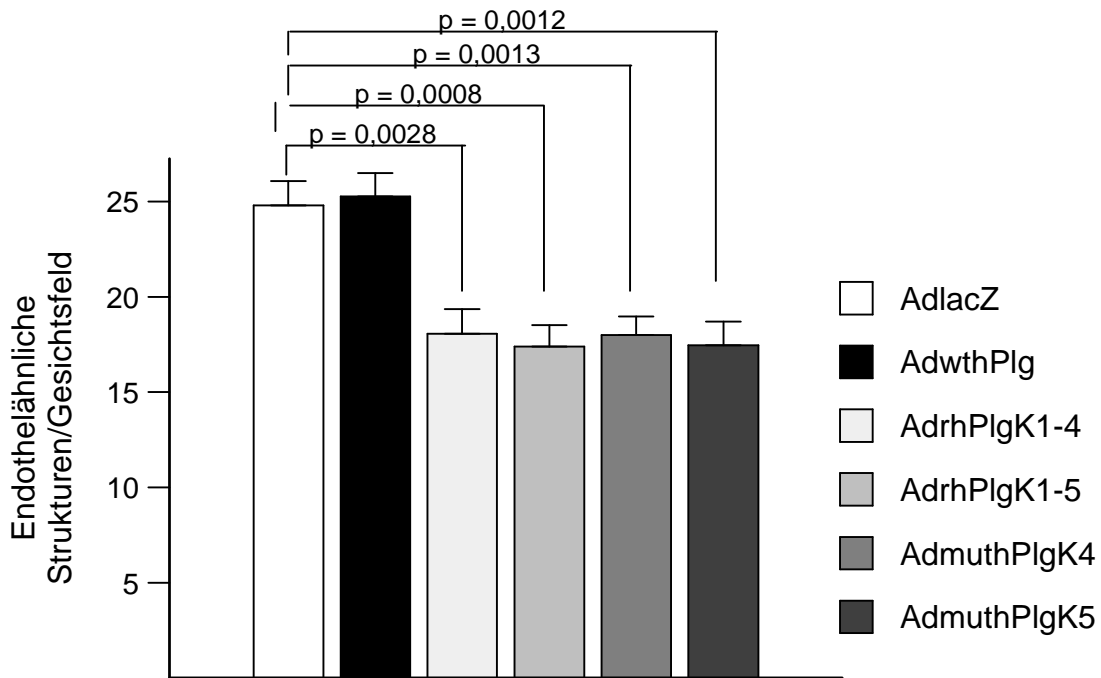
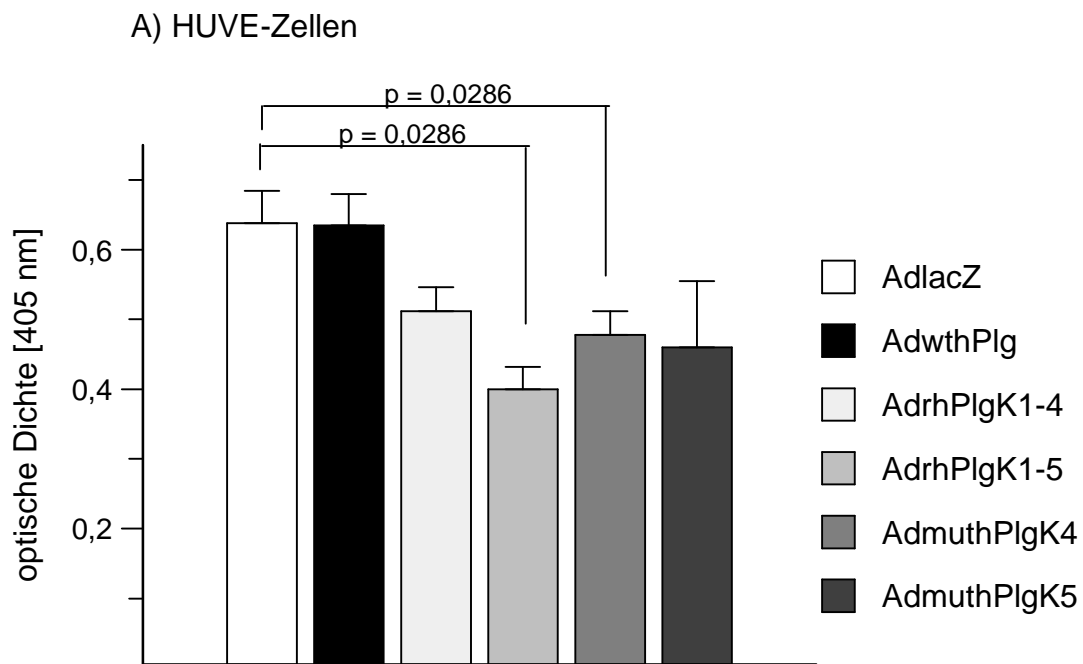


Abbildung 19: Ausgezählte ringförmige Strukturen im Matrigel-Assay nach Inkubation mit konditioniertem SN (A549-Zellen infiziert mit AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4, oder AdmuthPlgK5). Das Assay wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und je 5 Gesichtsfelder ausgezählt ($n = 15$). Dargestellt ist die gemittelte Zahl endothelähnlicher Gefäße/Gesichtsfeld + SEM.

HUVE-Zellen, welche mit SN von AdlacZ infizierten Zellen inkubiert wurden, wiesen im Mittel 24,8 endothelähnliche Strukturen/Gesichtsfeld auf. HUVE-Zellen inkubiert mit Überstand von AdwthPlg infizierten Zellen wiesen im Mittel 25,3 endothelähnliche Strukturen/Gesichtsfeld auf. HUVE-Zellen, welche mit Überstand von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 infizierten Zellen inkubiert wurden, wiesen weniger interzelluläre Verbindungen auf als die Kontrolle AdlacZ (18,1 endothelähnliche Strukturen/Gesichtsfeld für AdrhPlgK1-4 und 17,4 für AdrhPlgK1-5). Inkubation von HUVE-Zellen mit SN von AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 reduzierte ebenfalls die Anzahl endothelähnlicher Strukturen verglichen mit der Kontrolle (18 Verbindungen/Gesichtsfeld für AdmuthPlgK4 und 17,5 Verbindungen/Gesichtsfeld für AdmuthPlgK5). Die Gabe von AdrhPlgK1-4 inhibierte die Bildung endothelähnlicher Strukturen um 27 %, AdrhPlgK1-5 um 30 %. AdmuthPlgK4 inhibierte die Bildung endothelähnlicher Strukturen um 28 % und AdmuthPlgK5 um 29 % ($p < 0,002$). AdwthPlg inhibierte nicht die Bildung endothelähnlicher Strukturen. Hier ist die Zahl endothelähnlicher Strukturen im Vergleich zur Kontrolle um 2 % erhöht (Abbildung 19).

4.4.2 Proliferationsassay

Die angiostatische Wirksamkeit der verschiedenen Plasminogenderivate kann Einfluß auf die Proliferationsrate von Endothelzellen und/oder Tumorzellen haben. Zu diesem Zweck wurde ein BrdU-Proliferationsassay durchgeführt, um Effekte der sezernierten Plasminogenderivate auf die Zellproliferation zu untersuchen. Dafür wurden HUVE-, Hepa129- und LLC1-Zellen ausgesät und mit konditioniertem SN inkubiert. Auswirkungen auf die Zellproliferation wurden mittels BrdU-Assay nach Angaben des Herstellers untersucht.



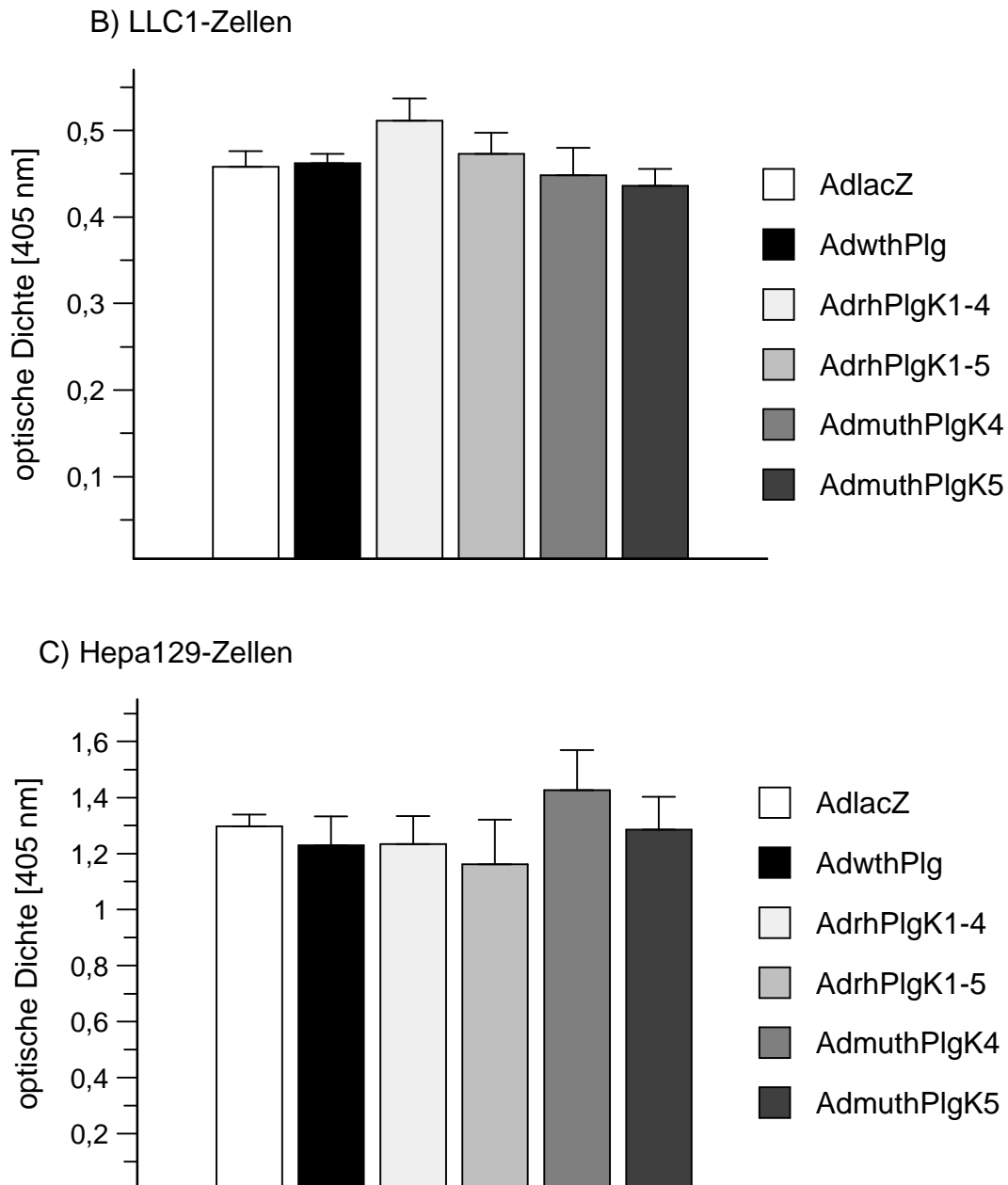


Abbildung 20: Grafische Darstellung des BrdU-Proliferations-Assays. A) mit HUVE-Zellen, B) mit LLC1-Zellen, C) mit Hepa129-Zellen. 1×10^4 Zellen wurden insgesamt 50 h mit SN von Zellen inkubiert, die mit AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 oder -K5 transduziert worden sind. Anschließend wurde für 4 h BrdU zu den Zellen gegeben und anschließend die Inkorporation von BrdU bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Dargestellt ist die optische Dichte (bei 405 nm gemessen) + SEM.

Die Proliferationsrate von Endothelzellen nahm durch die Gabe von konditioniertem SN (von Zellen infiziert mit AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4, AdmuthPlgK5) ab. Für AdrhPlgK1-4 reduzierte sich die Proliferationsrate um 20 % verglichen mit der Kontrolle AdlacZ (100 %). Konditionierter SN von AdrhPlgK1-5 infizierten Zellen führte

zu einer signifikanten Inhibition der Proliferationsrate um 37 % ($p < 0,03$). AdmuthPlgK4 führte ebenfalls zu einer signifikanten Inhibition (25 %) der Proliferation ($p < 0,03$). Für AdmuthPlgK5 reduzierte sich die Proliferationsrate um 18 %. SN von Zellen infiziert mit AdwthPlg führte nicht zu einer Inhibition der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ (Abbildung 20 A).

Die Hemmung der Plasminogenderivate war endothelzellspezifisch, da sich die Proliferationsrate von Tumorzellen (LLC1- und Hepa129) nicht durch konditionierten SN von infizierten Zellen beeinflussen läßt:

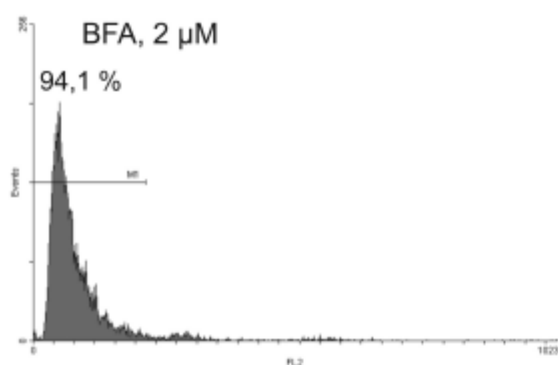
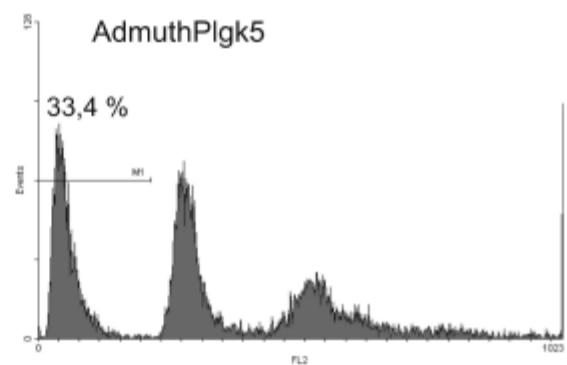
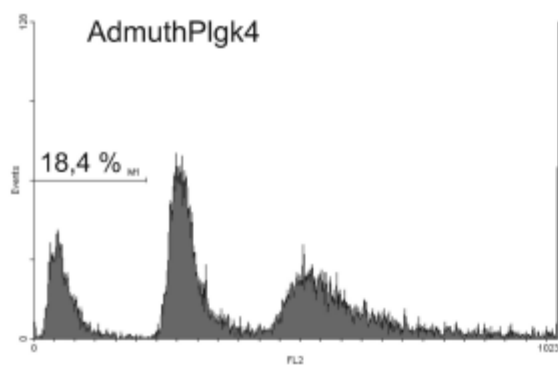
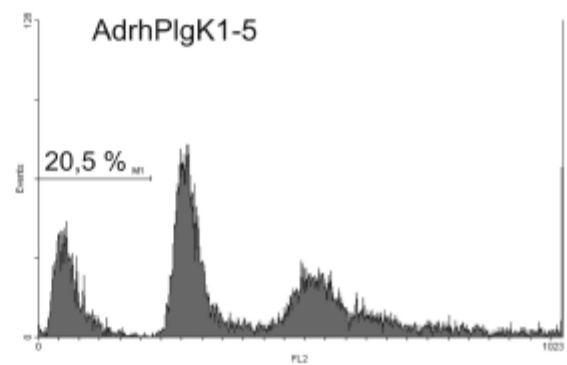
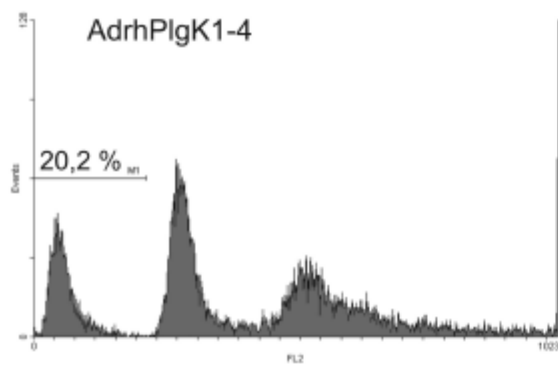
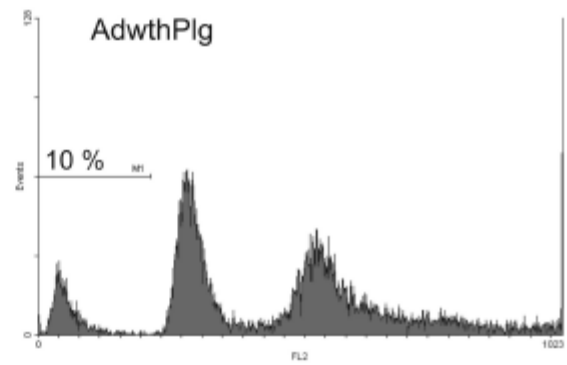
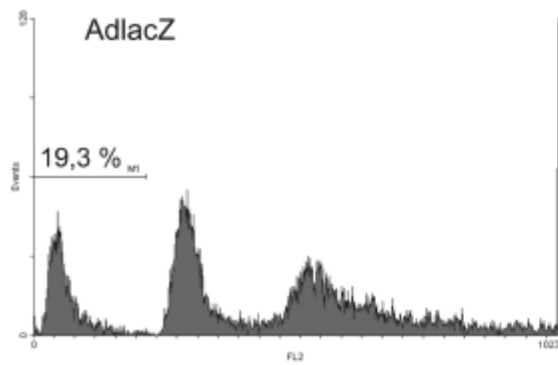
Im Vergleich zu Überstand von AdlacZ infizierten LLC1-Zellen (100 %) stieg die Proliferationsrate für AdwthPlg um 1 %, für AdrhPlgK1-4 um 12 % und für AdrhPlgK1-5 um 3 %. Bei LLC1-Zellen, die mit Überstand von AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 infizierten Zellen inkubiert wurden, reduzierte sich die Proliferationsrate um 2 %, bzw. um 5 % (Abbildung 20 B).

SN von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 infizierten Zellen inhibierte bei Hepa129-Zellen die Proliferation um 5 %, bzw. um 10 % im Vergleich zur AdlacZ-Kontrolle (100 %). AdmuthPlgK4 führte zu einer Steigerung der Proliferation um 10 %, AdmuthPlgK5 hingegen führte zu einer Reduktion der Proliferationsrate um 1 %. Überstand von AdwthPlg infizierten Zellen inhibierte bei Hepa129-Zellen die Proliferation um 5 % (Abbildung 20 C).

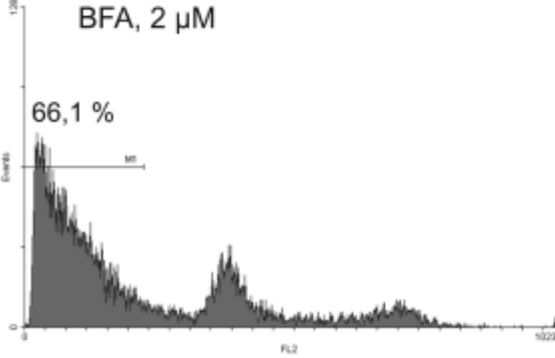
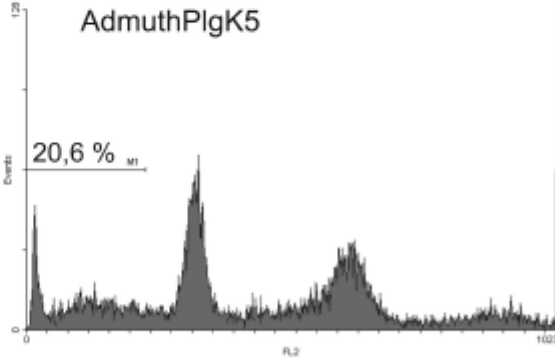
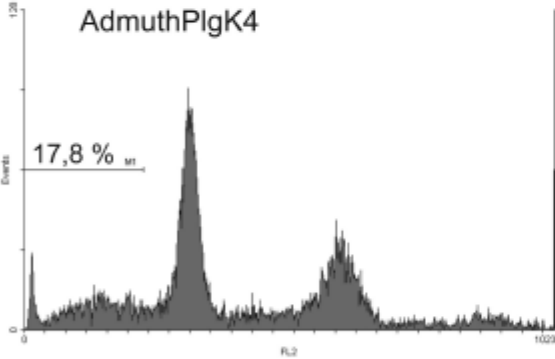
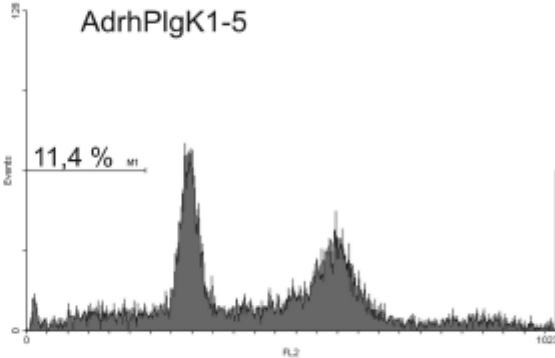
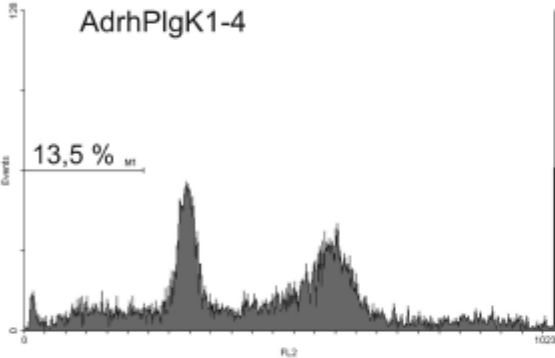
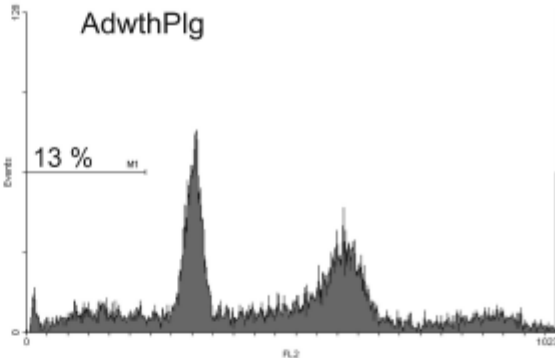
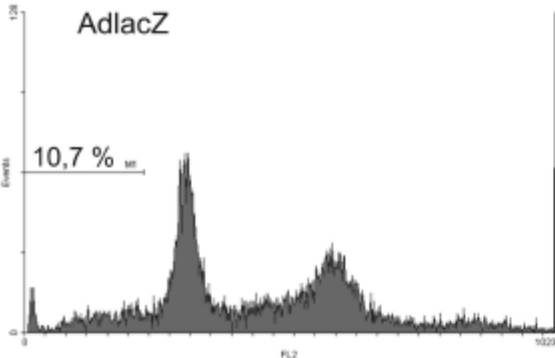
4.4.3 Apoptose-Assay

Inwieweit die verschiedenen Plasminogenderivate pro-apoptotisch auf Endothel- oder Tumorzellen (LLC1, Hepa129) wirken, wurde anhand der SubG₁-Fraktion untersucht. Dazu wurden HUVE-, LLC1- und Hepa129-Zellen mit SN von Zellen, die mit den Adenoviren kodierend für die verschiedenen Plasminogenderivate infiziert worden sind, inkubiert. Die Zellen wurden mit PI angefärbt und die SubG₁-Fraktion durchflußzytometrisch durch Messung des DNA-Gehalts bestimmt.

A) HUVE-Zellen



B) LLC1-Zellen



C) Hepa129-Zellen

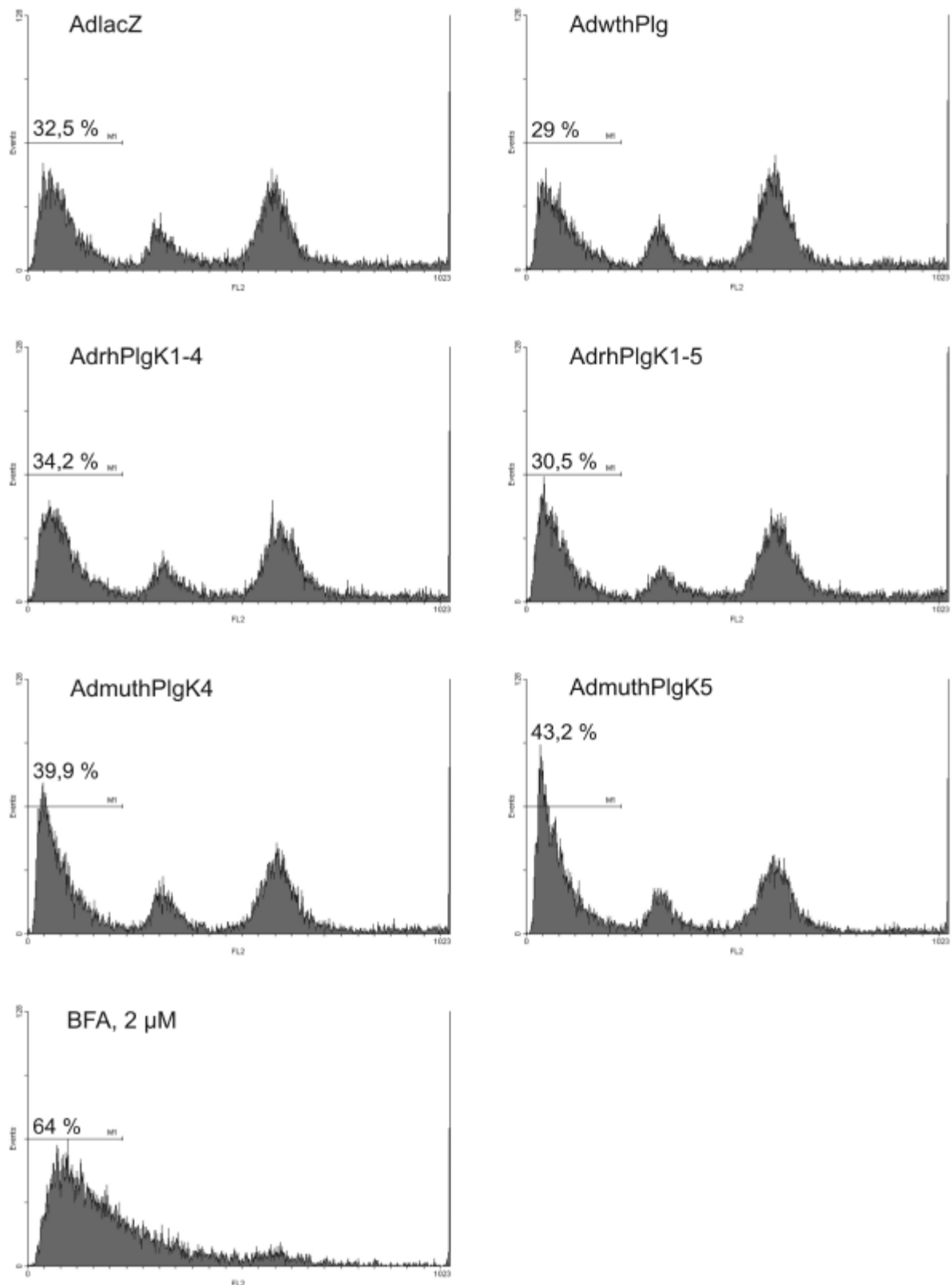


Abbildung 21: Durchflußzytometrische Bestimmung der SubG₁-Fraktion. 1×10^6 HUVE-, LLC1- und Hepa129-Zellen wurden mit konditioniertem SN (A549-Zellen infiziert mit AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 und -K5) und 2

μ MBFA als Positivkontrolle inkubiert und nach 72 h die Zellen geerntet. Die Zellen wurden 24 h mit 70 % Ethanol fixiert und 50 μ g/ml PI gefärbt. Zum Abbau der RNA wurden die Zellen abschließend mit RNase A (10 mg/ml) verdaut. Anschließend wurde im FACS der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Fluoreszenzkanal 2. A) Bestimmung der SubG₁-Fraktion bei HUVE-Zellen, welche mit SN von transduzierten Zellen inkubiert wurden. B) Auswertung der SubG₁-Fraktion bei LLC-1-Zellen, inkubiert mit SN von AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 und -K5 transduzierten Zellen. C) SubG₁-Fraktion bei Hepa129-Zellen, welche mit SN von AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 und -K5 transduzierten Zellen inkubiert wurden.

Die Untersuchung der SubG₁-Fraktion bei HUVE-Zellen, welche mit SN von AdlacZ inkubiert wurden zeigte eine SubG₁-Fraktion von 19,3 % bezogen auf die Gesamtzellpopulation auf. Durch Inkubation mit SN von AdwthPlg infizierten Zellen reduzierte sich die SubG₁-Fraktion um nahezu 50 % auf 10 %. Zellüberstand von Zellen, welche mit AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5 oder AdmuthPlgK4 inkubiert wurden, führte bei HUVE-Zellen zu einem Anteil der SubG₁-Fraktion von 20,2 %, 20,5 %, bzw. 18,4 %. Inkubation mit SN von AdmuthPlgK5 infizierten Zellen führte bei HUVE-Zellen zu einer SubG₁-Fraktion von 33,4 %. Mit 2 μ M BFA inkubierte HUVE-Zellen (Positivkontrolle) wiesen eine SubG₁-Fraktion von 94,1 % auf.

LLC1-Zellen, welche mit SN von AdlacZ transduzierten Zellen inkubiert wurden, wiesen eine SubG₁-Fraktion von 10,7 % auf (bezogen auf die gemessene Gesamtzellzahl). Zellüberstand von AdwthPlg transduzierten Zellen führte zu einer SubG₁-Fraktion von 13 %. Die Inkubation mit SN von AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 führte bei LLC1-Zellen zu einer SubG₁-Fraktion von 13,5 %, bzw. von 11,4 %. LLC1-Zellen, die mit SN von AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 transduzierten Zellen inkubiert wurden, wiesen eine SubG₁-Fraktion von 17,8 %, bzw. von 20,6 % auf. Die Gabe von 2 μ M BFA führte zu einem Anteil der SubG₁-Fraktion von 66,1 %.

Der Anteil der SubG₁-Fraktion bei Hepa129-Zellen, die mit SN von AdlacZ oder AdwthPlg transduzierten Zellen inkubiert wurden, betrug für AdlacZ 32,5 % und für AdwthPlg 29 %. Zellüberstand von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 transduzierten Zellen führte bei Hepa129-Zellen zu einer SubG₁-Fraktion von 34,2 %, bzw. 30,5 %. Hepa129-Zellen, die mit SN von Zellen inkubiert wurden, die mit AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 transduziert wurden, wiesen eine SubG₁-Fraktion von 39,9 % für AdmuthPlgK4 und 43,2 % für AdmuthPlgK5 auf. Hepa129-Zellen, die mit 2 μ M BFA inkubiert wurden, wiesen eine SubG₁-Fraktion von 64 % auf.

4.5 *in vivo* Experimente

4.5.1 Nachweis der Genexpression *in vivo*

Die Vektorfunktion wurde *in vivo* mittels RT-PCR bestätigt. Dazu wurden Mäuse mit den verschiedenen adenoviralen Konstrukten transduziert und drei Tage später die Leber explantiert. RNA wurde aus Lebergewebe isoliert und revers transkribiert. Der Nachweis der Genexpression wurde durch PCR mit Primern für Plasminogen durchgeführt.

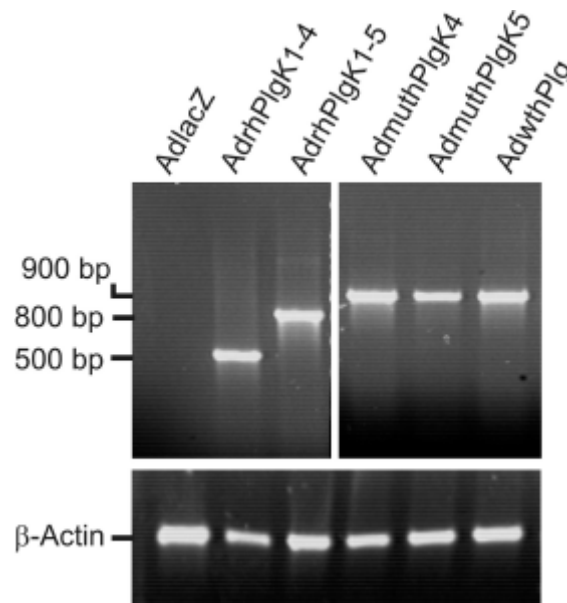


Abbildung 22: Agarose-Gel (1,2 %) der RT-PCR aus Lebergewebe. Balb/c-Mäuse wurden intravenös mit den Adenoviren kodierend für die verschiedenen Plasminogenderivate injiziert (5×10^9 pfu/Maus, $n = 1$). Als Kontrollvektor diente AdlacZ. Drei Tage später wurden die Tiere getötet und die Leber explantiert. Aus Lebergewebe wurde RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA in einer PCR mit spezifischen Primern für Plasminogen (forward Primer: PlgSeq, reverse Primer: K5rev, K1-4rev, K1-5rev) eingesetzt. Als Kontrolle auf die erfolgreiche RT-Reaktion wurden Primer für murines β -Actin eingesetzt.

cDNA aus Lebergewebe einer AdlacZ-infizierten Maus wies nach PCR mit Plasminogen-spezifischen Primern erwartungsgemäß keine Bande auf. Für die Gabe von AdwthPlg konnte, dem Transgen entsprechend, nach PCR eine Bande auf der Höhe von 900 bp nachgewiesen werden. Gleiches galt für die intravenöse Gabe von AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5. Für beide Adenoviren konnte nach RT-PCR eine Bande auf der Höhe von 900 bp nachgewiesen werden. cDNA aus Lebergewebe einer Maus, die AdrhPlgK1-4 erhalten hatte, zeigte passend zu rhPlgk1-4 im Agarose-Gel eine Bande auf der Höhe von 500 bp. Die Injektion von AdrhPlgK1-5 zeigte nach RT-

PCR eine Bande auf der Höhe von 800 bp, was dem Transgen entsprach (Abbildung 22).

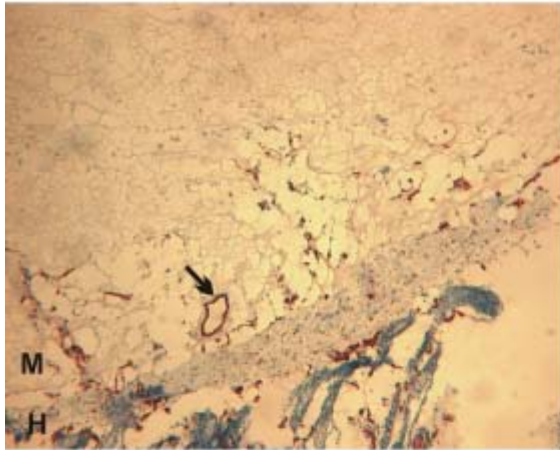
Die für alle sechs cDNA-Proben durchgeführte Kontroll-PCR mit murinem β -Actin war für alle positiv.

Die erwarteten Fragmentgrößen lagen für AdwthPIg, AdmuthPIgK4 und AdmuthPIgK5 bei 954 bp, für AdrhPIgK1-4 bei 504 bp und für AdrhPIgK1-5 bei 822 bp.

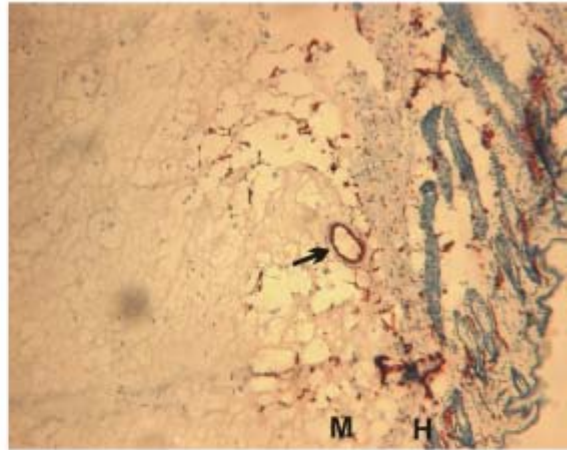
4.5.2 Matrigel-Assay *in vivo*

Inwieweit die Plasminogenderivate angiostatisch wirksam sind und die Endothelzell-Einsprossung inhibieren, wurde in einem *in vivo* Matrigel-Assay untersucht. Matrigel wurde implantiert und einen Tag später die Mäuse intravenös mit den adenoviralen Konstrukten behandelt. Acht Tage später wurde das Matrigelkissen inklusive Peritoneum und Haut explantiert und schockgefroren. Daraus wurden Cryoschnitte angefertigt und diese gegen CD31 gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der endothelähnlichen Strukturen am Durchlichtmikroskop.

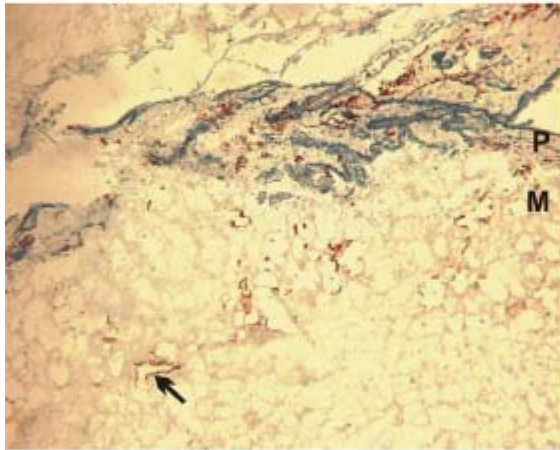
AdlacZ



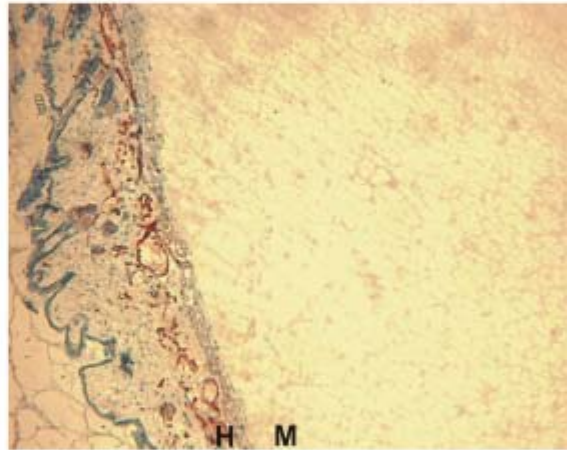
AdwthPlg



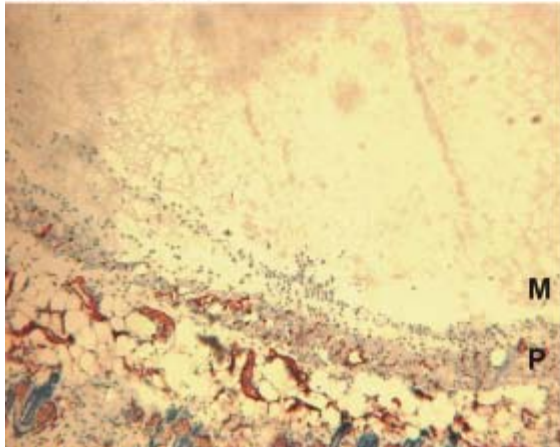
AdrhPlgK1-4



AdrhPlgK1-5



AdmuthPlgK4



AdmuthPlgK5

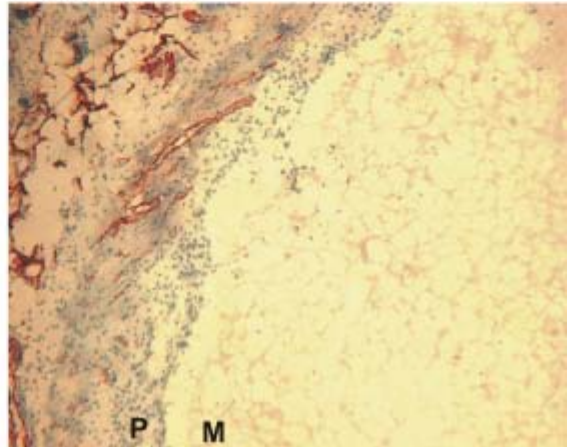


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Cryoschnitte nach immunhistochemischer Färbung mit CD31 (Vergrößerung 100fach, M = Matrigel, P = Peritoneum, H = Haut). In Balb/c-Mäuse wurden zwei Matrigeldepots implantiert und 24 h später AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 intravenös appliziert (n = 1). Sieben Tage später wurden die Matrigeldepots inklusive dem umgebenden Peritoneum und der Haut explantiert,

schockgefroren und immunhistochemisch gegen Maus CD31 gefärbt (rot-braune Färbung, schwarzer Pfeil). Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaun gefärbt (blaue Färbung).

Die Auszählung der Endothelgefäße in den explantierten und immunhistochemisch aufbereiteten Matrigeldepots zeigte eine deutliche Inhibition der Endothelzelleinsprossung für Tiere, welche AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 erhalten hatten. Während in diesen Depots nur vereinzelt Endothelgefäße zu finden waren, waren Matrigel-Depots aus Tieren, welche AdlacZ oder AdwthPlg erhalten hatten, mit Endothelgefäßen durchzogen (Abbildung 23).

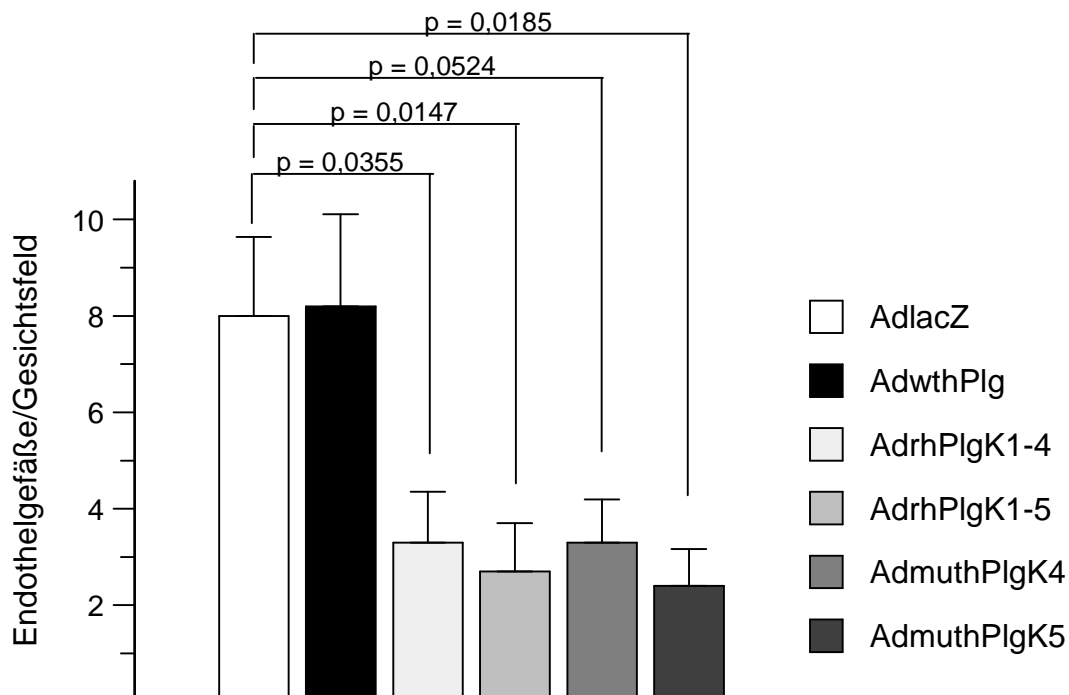


Abbildung 24: Anzahl der Endothelgefäße im Matrigelkissen (n = 2) pro Gesichtsfeld (n = 5). Die wie vorbeschrieben behandelten und gefärbten Matrigeldepots wurden auf die Anzahl der eingewanderten Endothelgefäße hin untersucht. Quantifiziert wurden vollständige Gefäße und einzelne Endothelzellen. Dargestellt ist die gemittelte Zahl der Endothelgefäße/Gesichtsfeld (n = 10) + SEM.

Die Einsprossung von Endothelzellen in die Matrigeldepots reduzierte sich durch die Gabe von AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 um 58 % (3,3 Gefäße/Gesichtsfeld), bzw. um 66 % (2,7 Gefäße/Gesichtsfeld) verglichen mit der AdlacZ-Kontrolle (8 Gefäße/Gesichtsfeld, $p < 0,04$). Die Gabe von AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 führte im Vergleich zu AdlacZ zu einer Inhibition der Endothelzelleinsprossung um 58 % (3,3 Gefäße/Gesichtsfeld) für AdmuthPlgK4 und um 70 % (2,4 Gefäße/Gesichtsfeld) für

AdmuthPlgK5 ($p < 0,04$). Die Gabe von AdwthPlg (8,2 GefäÙe/Gesichtsfeld) führte nicht zu einer Inhibition der Endothelzelleinsprossung im Vergleich zu AdlacZ (Abbildung 24).

4.5.3 Systemische Therapie subkutaner LLC-Tumoren

Das LLC-Modell diente als Referenz-Modell für die Untersuchung der angiostatischen Wirksamkeit der verschiedenen Plasminogenderivate (wthPlg, rhPlgK1-4, rhPlgK1-5, muthPlgK4, muthPlgK5). Dazu wurden Zellen der Lungenkarzinomzelllinie LLC1 in syngene C57/bl6 Mäuse sc. implantiert und nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 50 mm^3 die Therapie durch intraperitoneale Injektion der adenoviralen Vektoren (5×10^9 pfu/Maus) eingeleitet. Die Tumoren wurden alle zwei Tage vermessen, um das Tumolvolumen zu bestimmen.

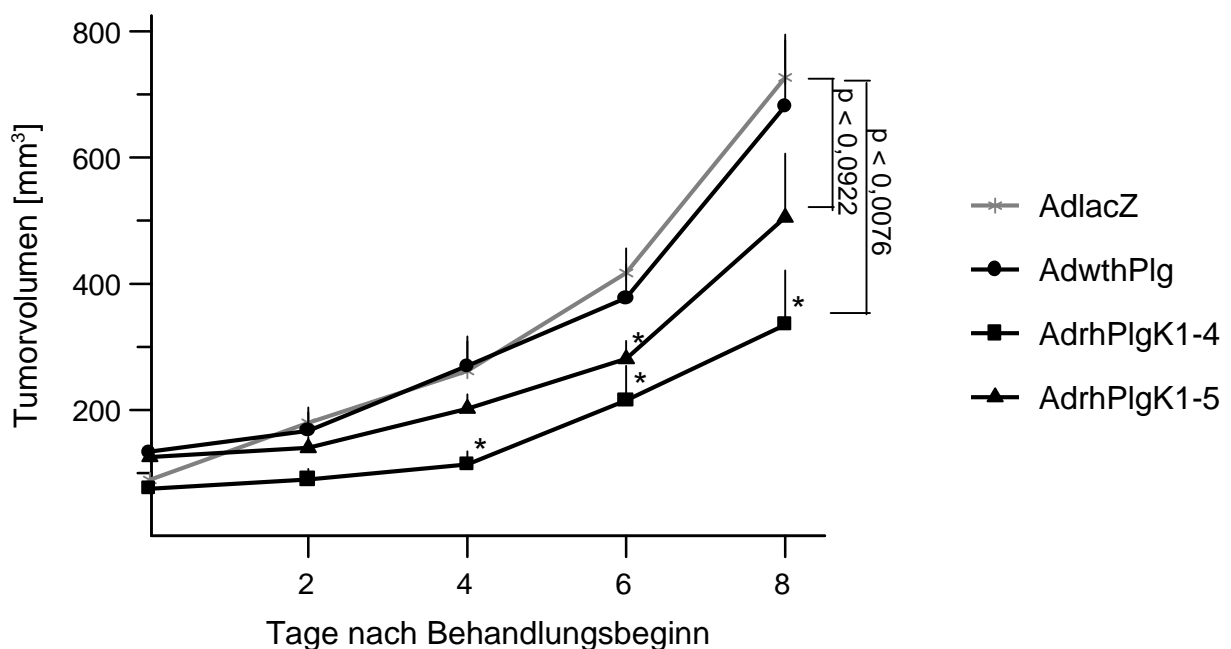


Abbildung 25: Wachstumskurve sc. LLC-Tumoren. 1×10^6 LLC-Zellen wurden in C57/bl6-Mäuse dorsoventral implantiert und nach Erreichen eines mittleren Tumolvolumens von ca. 100 mm^3 durch intraperitoneale Injektion mit Adenoviren kodierend für wthPlg ($n = 9$), rhPlgK1-4 ($n = 8$) und rhPlgK1-5 ($n = 10$) behandelt. Als Kontrolle wurde AdlacZ ($n = 10$) eingesetzt. Das Tumolvolumen wurde alle zwei Tage bestimmt. Dargestellt ist das mittlere Tumolvolumen +SEM (* $p < 0,05$).

Nach der intraperitonealen Injektion von AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdwthPlg oder AdlacZ zeigte sich eine Inhibition des Tumorwachstums durch die Gabe von AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 (Abbildung 25). Diese lag an Tag vier bei 57 % für AdrhPlgK1-4 ($p < 0,02$) und 23 % für AdrhPlgK1-5 im Vergleich zur Kontrolle. An Tag sechs betrug die Inhibition des Tumorwachstums für AdrhPlgK1-4 48 % und 33 % für AdrhPlgK1-5 ($p <$

0,02). Eine signifikante Reduktion des Tumorumfangs um 54 % zeigte sich auch an Tag acht nach Behandlungsbeginn mit AdrhPlgK1-4 im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ ($p < 0,003$). Die Gabe von AdrhPlgK1-5 führte an Tag acht zu einer Verminderung des Tumorumfangs um 30,5 % verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Gabe von AdwthPlg hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Tumorumfangs (Verminderung um 10 % an Tag sechs und 6 % an Tag acht). Aus technischen Gründen wurde das tumorbedingte Überleben in diesem Versuch nicht verfolgt (vgl. bitte Überlebenskurve im HCC-Tumormodell nach Injektion mit AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5, Abbildung 29).

Die an Tag 13 entnommenen Tumorknoten von Tieren aus allen vier Therapiegruppen wurden histologisch aufbereitet und immunhistochemisch mit Maus anti-CD31 gefärbt.

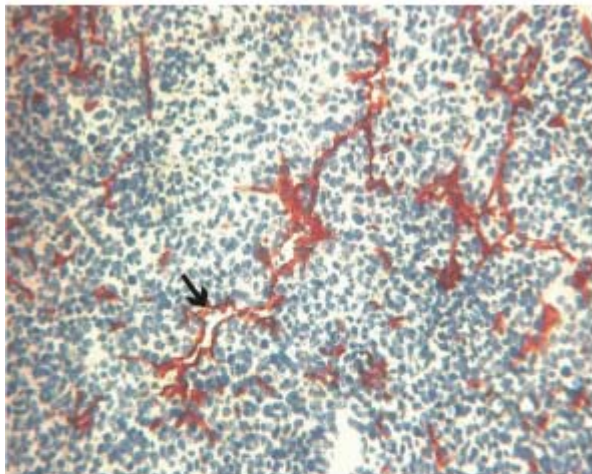
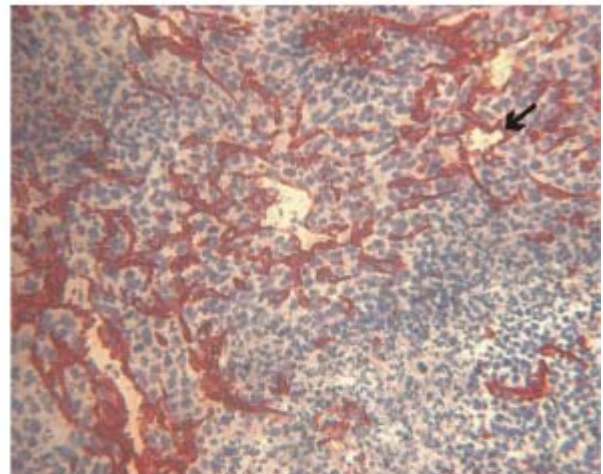
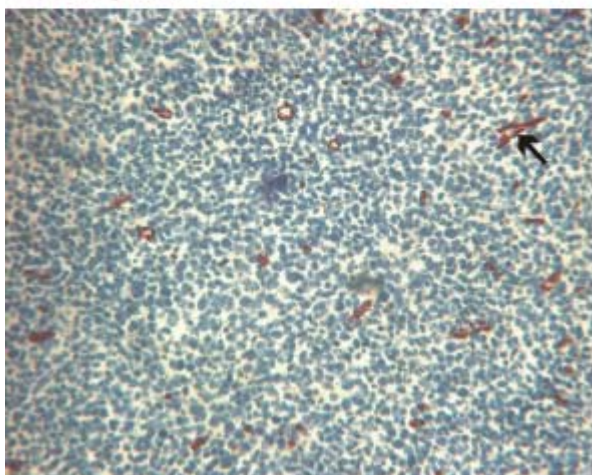
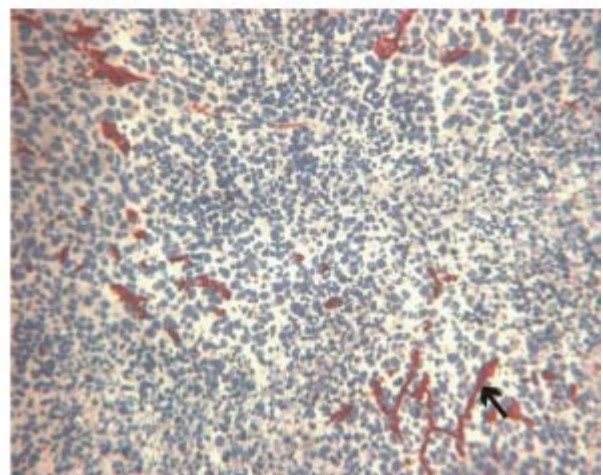
AdlacZ**AdwthPlg****AdrhPlgK1-4****AdrhPlgK1-5**

Abbildung 26: Exemplarische mikroskopische Darstellung der Gefäße nach CD31-Färbung von LLC-Tumoren. (Vergrößerung 400fach). In C57/bl6-Mäuse wurden dorsoventral 1×10^6 LLC1-Zellen sc. implantiert. Bei Erreichen eines mittleren Tumorumfangs von 100mm^3 wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit

5×10^9 pfu/Maus AdlacZ, AdwthPlgAdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 behandelt. Bei Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Tumore explantiert. Diese wurden schockgefroren und anschließend mit anti Maus CD31 immunhistochemisch gefärbt. Endothelgefäße sind durch eine rot-braune Färbung gekennzeichnet (schwarzer Pfeil).

Die in Abbildung 26 dargestellten exemplarischen mikroskopischen Aufnahmen der CD31-gefärbten Tumore zeigten für AdlacZ und AdwthPlg eine deutliche Anfärbung endothelialer Strukturen. Die Endothelgefäße waren sehr zahlreich und stark verzweigt. Im Gegensatz dazu waren Tumore, welche AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 erhalten hatten, durch eine wesentlich geringere Anzahl endothelialer Gefäße gekennzeichnet. Darüber hinaus waren diese Gefäße auch nicht verzweigt und wesentlich kleiner als die Gefäße von AdlacZ und AdwthPlg behandelten Tieren.

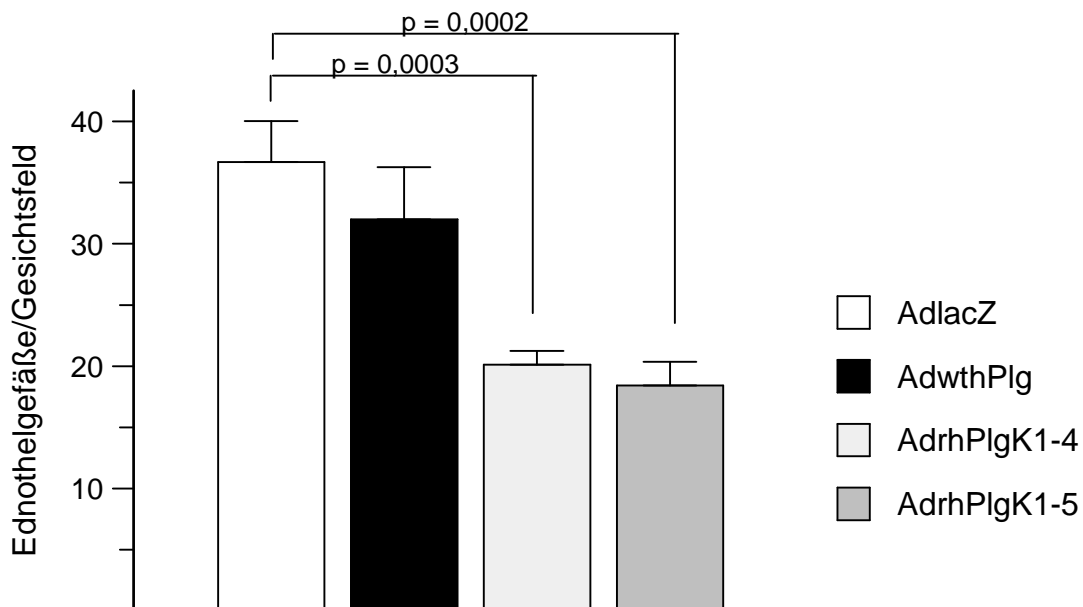


Abbildung 27: Anzahl der Endothelgefäße in Cryoschnitten von LLC-Tumoren. Nach systemischer Gabe von AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 (n = 9) wurden am Todestag Tumoren explantiert, histologisch aufbereitet und gegen CD31 gefärbt. Dargestellt ist die gemittelte Zahl der Endothelgefäße/Gesichtsfeld + SEM.

Nur AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 führten nach immunhistologischer Färbung des Tumorgewebes zu einer Reduktion der Gefäßdichte um 43,7 % für AdrhPlgK1-4 (20,6 Gefäße/Gesichtsfeld) und 49,7 % für AdrhPlg K1-5 (18,4 Gefäße/Gesichtsfeld) im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ (36,7 Gefäße/Gesichtsfeld, 100 %). Die Gabe von AdwthPlg führte zu einer Reduktion der Gefäßdichte um 12,6 % (32 Gefäße/Gesichtsfeld). Während die Reduktion der Gefäßdichte für AdwthPlg im

Vergleich zu AdlacZ nicht signifikant ausfiel, war die Reduktion durch die Gabe von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 mit $p = 0,0003$, bzw. $p = 0,0002$ signifikant.

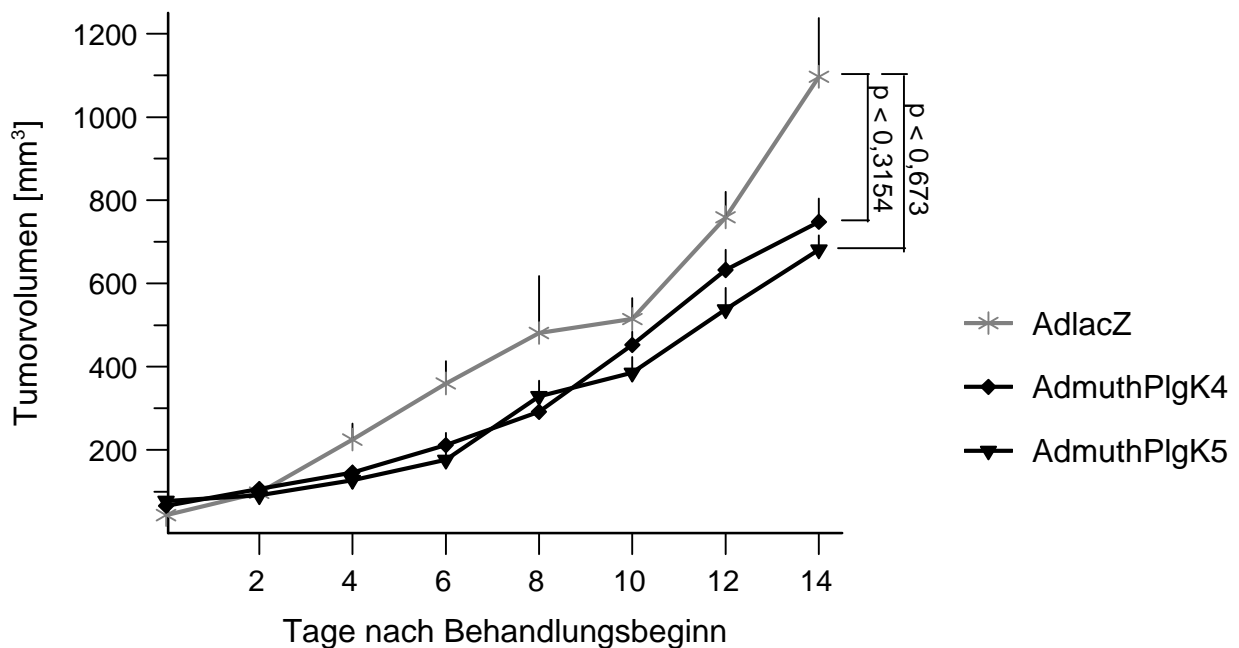


Abbildung 28: Wachstum sc. LLC-Tumoren nach intraperitonealer Injektion von AdlacZ, AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5. Dargestellt ist das mittlere Tumolvolumen + SEM (* $p < 0,05$).

Die intraperitoneale Injektion von 5×10^9 pfu/Tier AdmuthPlgK4 ($n = 10$) oder AdmuthPlgK5 ($n = 10$) führte im LLC-Referenzmodell zu einer Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ ($n = 9$, Abbildung 28). Durch die Gabe von AdmuthPlgK4 zeigte sich bereits an Tag vier eine Inhibition des Tumorwachstums um 35,4 %. Ähnliches zeigte sich für AdmuthPlgK5 (43,3 %). An Tag sechs war die Inhibition des Tumorwachstums für beide Therapiegruppen (41,1 % für AdmuthPlgK4, 50,9 % für AdmuthPlgK5) verglichen mit der Kontrolle signifikant ($p < 0,04$). Zwischen Tag zehn und 12 nahm das Tumorwachstum leicht zu. In diesem Zeitraum war nur eine geringe Inhibition des Tumorwachstums zu verzeichnen. An Tag 14 reduzierte sich das Tumolvolumen wiederum signifikant um 41 % für AdmuthPlgK4 und um 31 % für AdmuthPlgK5 ($p < 0,04$).

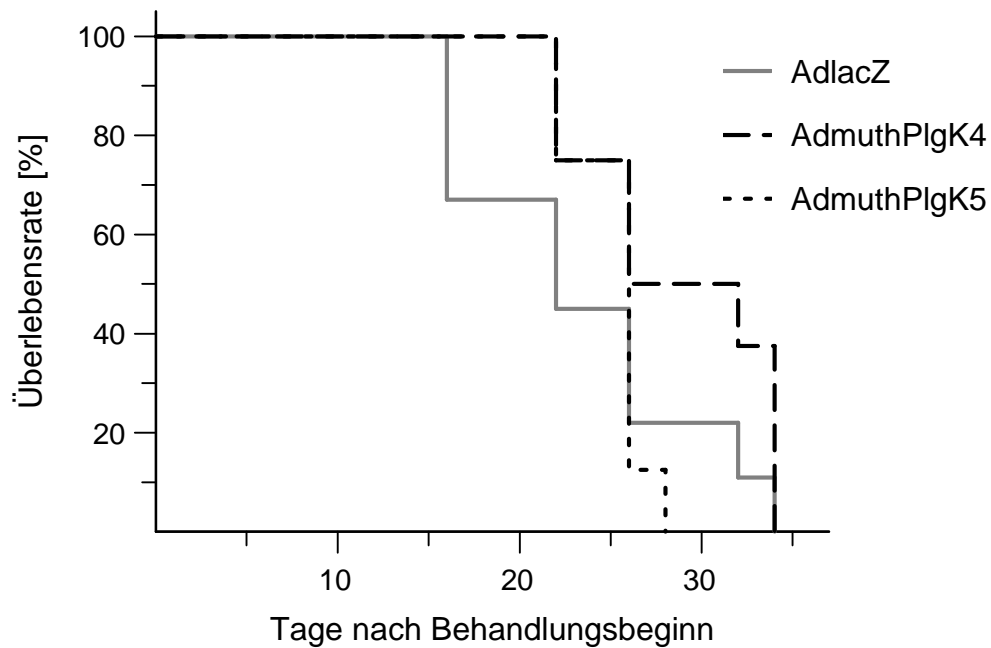


Abbildung 29: Überlebenskurve (nach Kaplan-Mayer) von Tieren mit sc. LLC-Tumoren nach intraperitonealer Gabe von AdlacZ, AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5. Die Tumore wurden wie vorbeschrieben implantiert und behandelt. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und dieser Tag als Todeszeitpunkt definiert (* $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant).

Die Überlebenszeit nach der Gabe von AdlacZ lag im Mittel bei 23,3 Tagen. Mit AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 behandelte Tiere hingegen wiesen ein verlängertes Überleben von 28,8 Tagen für AdmuthPIgK4 und 25,3 Tagen für AdmuthPIgK5 auf.

Die am Todestag entnommenen Tumoren wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und mit anti Maus CD31 immunhistochemisch gefärbt.

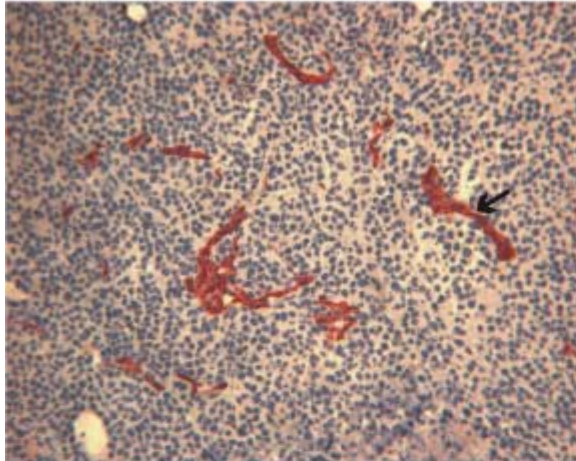
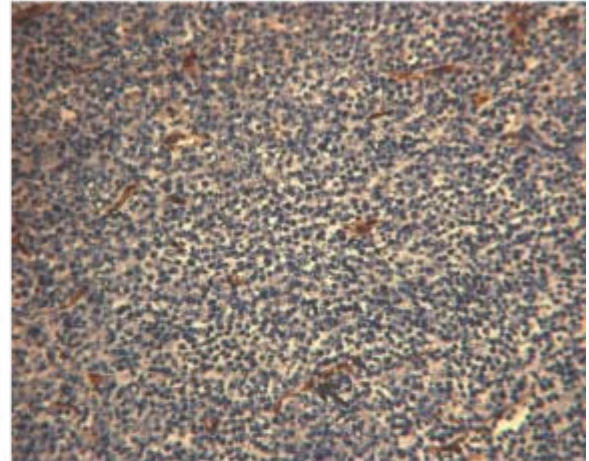
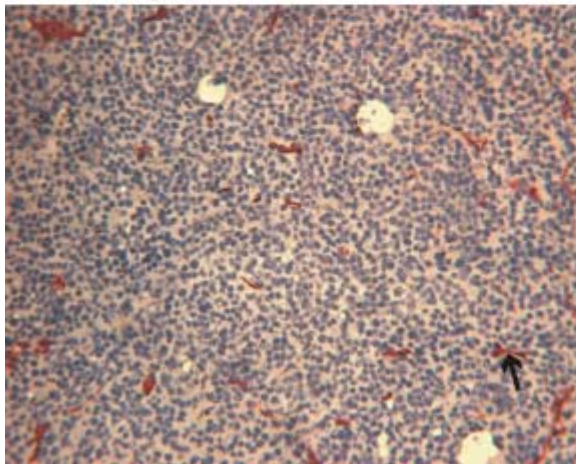
AdlacZ**AdmuthPlgK4****AdmuthPlgK5**

Abbildung 30: Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung von Tumorgewebe aus LLC1-Tumoren (400fache Vergrößerung). Die Tumore wurde wie vorbeschrieben implantiert und behandelt. Nach Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Tumoren wie oben beschrieben explantiert, und gegen CD31 gefärbt. Endothelgefäße sind durch eine rotbraune Färbung gekennzeichnet (schwarzer Pfeil).

Die Bildung endothelialer Gefäße in sc. LLC1-Tumoren wurde durch die Gabe von AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 signifikant inhibiert (Abbildung 30). Nicht nur die Anzahl der Endothelgefäße war reduziert, sondern auch die Komplexität der Gefäße. Während die Gabe von AdlacZ zu einem verzweigten Netz endothelialer Gefäße führte, war dieses durch die Therapie mit AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 nicht ausgebildet. Endothelgefäße waren nur in einfachen Strukturen zu finden.

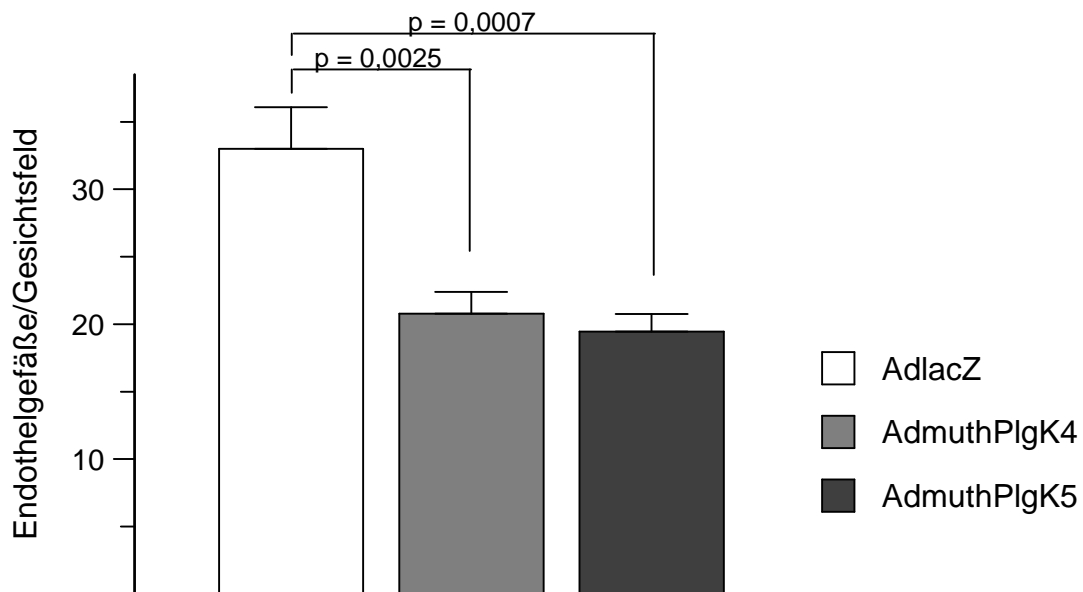


Abbildung 31: Anzahl der EndothelgefäÙe nach anti Maus CD31-Färbung von sc. LLC-Tumoren. Die Tumore von AdlacZ (n =9), AdmuthPIgK4 (n = 9) und AdmuthPIgK5 (n = 9) behandelten Tieren wurden am Todestag explantiert, schockgefroren und gegen CD31 gefärbt. Dargestellt ist die mittlere Zahl endothelialer GefäÙe/Gesichtsfeld + SEM. Die immunhistochemische Färbung der EndothelgefäÙe zeigte für mit AdmuthPIgK4 behandelte Tumoren eine Reduktion der GefäÙdichte um 37 % (20,8 GefäÙe/Gesichtsfeld) verglichen mit der Kontrolle (33 GefäÙe/Gesichtsfeld). Die Gabe von AdmuthPIgK5 führte zu einer Verminderung der GefäÙdichte um 41 % (19,4 GefäÙe/Gesichtsfeld) im Vergleich zu AdlacZ (n = 9, $p < 0,003$, Abbildung 31).

4.5.4 Lokale Therapie subkutaner HCC-Tumoren

Die antitumorale Wirksamkeit der adenoviralen Plasminogenderivate wurde weiter in einem sc. HCC Modell untersucht. Dazu wurden Hepa129 Zellen in syngene C3H MäÙe dorsoventral implantiert. Bei Erreichen eines mittleren Tumolvolumens von ca. 150 mm^3 wurde die Therapie durch intratumorale Injektion der adenoviralen Vektoren begonnen und im weiteren das Tumolvolumen alle zwei Tage ermittelt.

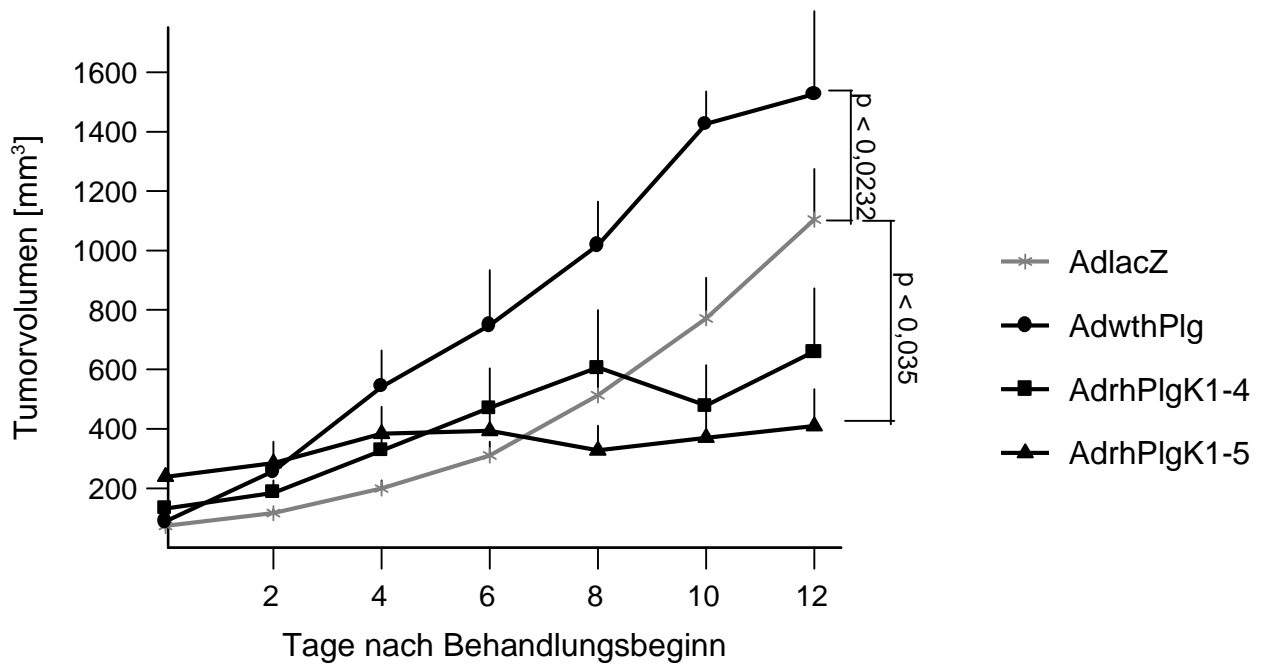


Abbildung 32: Wachstumskurve sc. Hepa129 HCC-Tumoren. In C3H-Mäuse wurden dorsoventral 1×10^6 Hepa129-Zellen sc. implantiert. Bei Erreichen eines mittleren Tumolvolumens von 100 mm^3 wurden die Tiere mit 5×10^9 pfu/Maus AdlacZ ($n = 10$), AdwthPlg ($n = 10$), AdrhPlgK1-4 ($n = 10$) oder AdrhPlgK1-5 ($n = 9$) durch intratumorale Injektion behandelt. Das Tumolvolumen wurde alle zwei Tage dokumentiert. Dargestellt ist das mittlere Tumolvolumen + SEM (* $p < 0,05$).

Nach lokaler Gabe von AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 waren nur schwache Therapieerfolge erkennbar (Abbildung 32). Die Injektion von AdrhPlgK1-4 führte erst ab Tag 10 zu einer Reduktion des Tumolvolumens um 38 % im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen Tag 2 und Tag 8 war das Tumolvolumen um durchschnittlich 48 % gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Ähnliches galt für die Gruppe, welche AdrhPlgK1-5 erhalten hatte. Hier trat eine Reduktion des Tumolvolumens ab Tag 8 ein. Dies führte an Tag 12 zu einer signifikanten Inhibition des Tumolvolumens um 67 %. Bis Tag 6 lag das Tumolvolumen um durchschnittlich 88 % über dem der Kontrolltiere. Durch die Applikation von AdwthPlg zeigte sich bereits ab Tag zwei ein erhöhtes Tumorstadium um 121 %. Im weiteren Verlauf (bis Tag zehn) lag das Tumolvolumen für diese Gruppe mit durchschnittlich 125 % über dem Tumolvolumen der Kontrollgruppe AdlacZ ($p < 0,003$). Erst an Tag 12 näherte sich das Tumolvolumen der Kontrollgruppe an das der Gruppe, die AdwthPlg erhalten hatte, an.

Darüber hinaus führte die Gabe von AdrhPlgK1-4 bei einem Tier zu einem vollständigen Tumorregress. Dieses Tier war seit Tag 20 tumorfrei. Dies zeigte sich auch in der Gruppe, welche AdrhPlgK1-5 erhalten hatte. Hier zeigten 50 % der Tiere eine

vollständige Elimination des Tumors. Fünf Tiere aus dieser Gruppe waren seit Tag 18 tumorfrei.

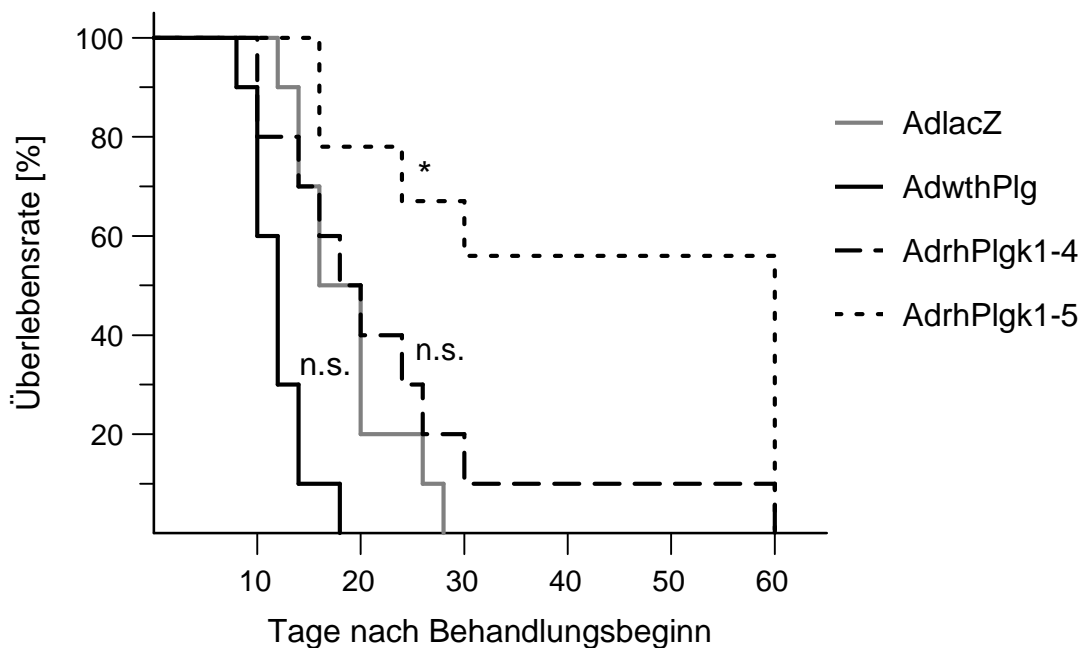


Abbildung 33: Überlebenskurve (nach Kaplan-Mayer) von Tieren mit Hepa129-Tumoren nach intratumoraler Gabe von AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 (n = 10). Die Tumore wurden wie vorbeschrieben implantiert und behandelt. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und dieser Tag als Todeszeitpunkt definiert (*p < 0,05, n.s. = nicht signifikant).

Die Gabe von AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe und AdwthPlg-Gruppe zu einem deutlichen Überlebensvorteil (Abbildung 33). Während Tiere, welche AdwthPlg erhalten hatten, bereits alle nach Tag 18 verstorben waren und das mittlere Überleben bei 12 Tagen lag, wiesen Tiere, welche AdrhPlgK1-4 erhalten hatten, ein mittleres Überleben von 20,8 Tagen und Tiere, welche AdrhPlgK1-5 erhalten hatten, ein mittleres Überleben von 31,8 Tagen auf. Ein Tier aus der AdrhPlgK1-4 und fünf Tiere aus der AdrhPlgK1-5-Gruppe lebten noch am Versuchsende (Tag 60), der für diese Tiere als Todestag definiert wurde. Die Gabe von AdlacZ führte zu einer mittleren Überlebensrate von 18,6 Tagen. Hier starb das letzte Tier an Tag 28.

Die am Todestag entnommenen Tumorproben wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und immunhistochemisch gegen anti Maus CD31 gefärbt.

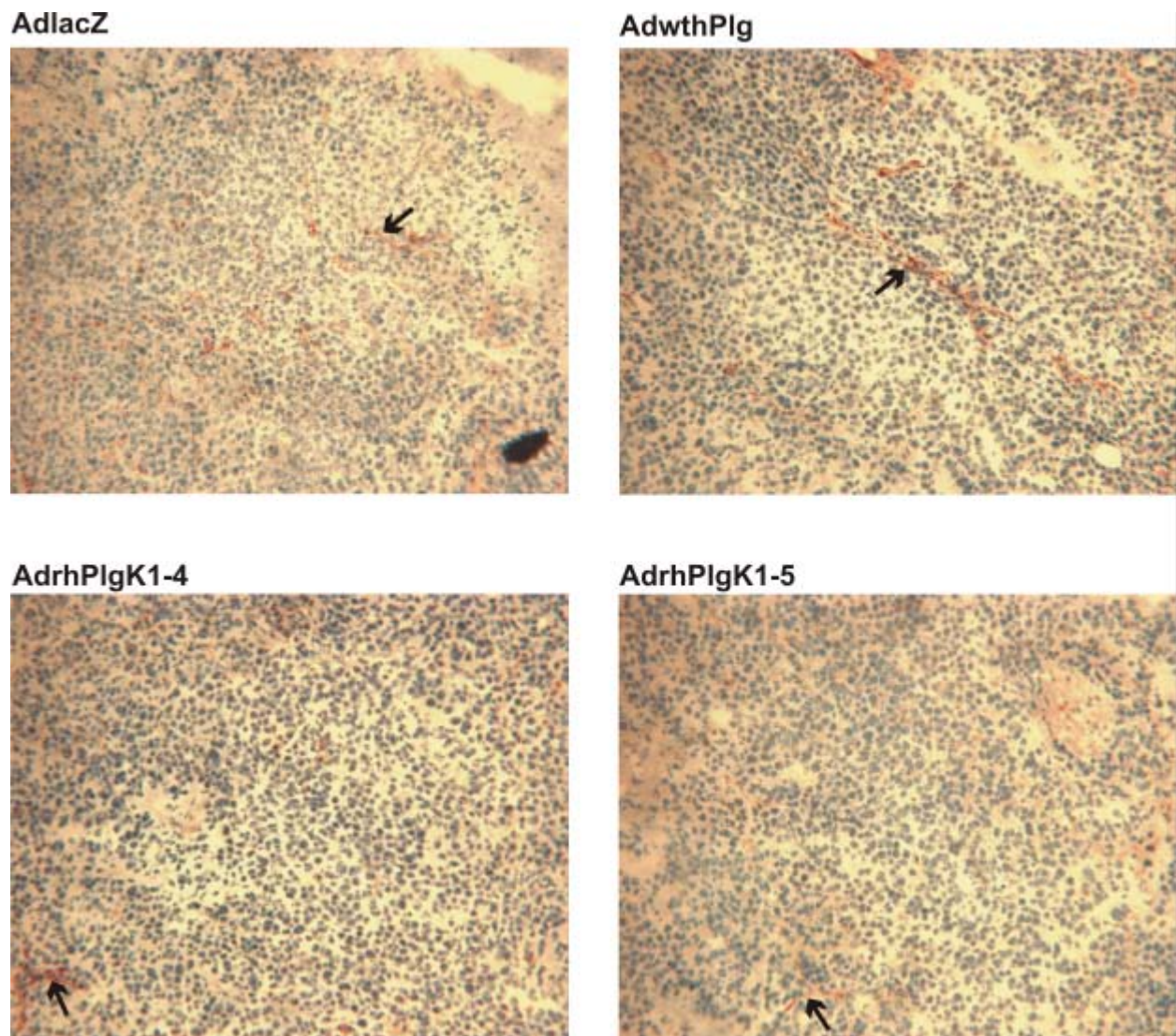


Abbildung 34: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 400fach) von Hepa129-Tumorproben, welche gegen Maus CD31 gefärbt worden sind. In C3H-Mäuse wurden dorsoventral 1×10^6 Hepa129-Zellen sc. implantiert. Bei Erreichen eines mittleren Tumolvolumens von 100 mm^3 wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion mit 5×10^9 pfu/Maus AdlacZ, AdwthPlg, AdrhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 behandelt ($n = 10$). Bei Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Tumore explantiert. Diese wurden in flüssigem N_2 schockgefroren und Cryo-Gewebeschnitte hergestellt. Diese wurden anschließend mit anti Maus CD31 immunhistochemisch gefärbt. Endothelgefäße sind durch eine rot-braune Färbung gekennzeichnet (schwarzer Pfeil).

Die Gabe von AdwthPlg führte in sc.en HCC-Tumoren im Vergleich zur AdlacZ-Kontrolle zu einer komplexeren Bildung endothelialer Strukturen. Während diese in der AdlacZ-Gruppe nicht deutlich ausgeprägt waren, war bei Tumoren, welche mit AdwthPlg behandelt worden sind, stark verzweigte Strukturen erkennbar. Die Gabe von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 führte nicht zu einer komplexen Struktur endothelialer

Gefäße. Auch die Anzahl der Gefäße war im Vergleich zur AdlacZ-Kontrolle reduziert (Abbildung 34).

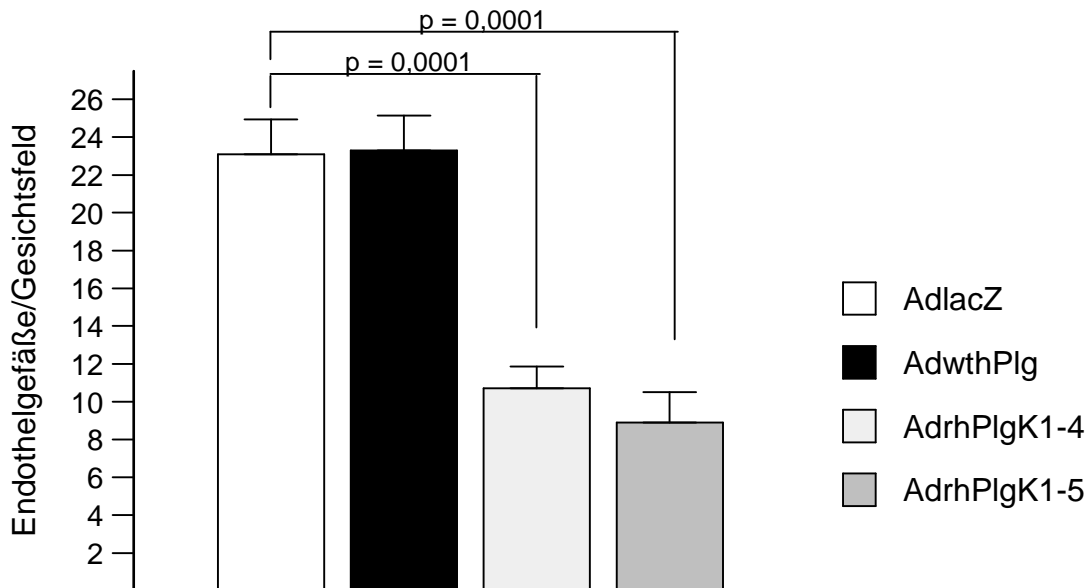


Abbildung 35: Anzahl der Endothelgefäße in sc. HCC-Tumoren. Nach intratumoraler Therapie mit AdlacZ (n = 10), AdwthPlg (n = 10), AdrhPlgK1-4 (n = 10) und AdrhPlgK1-5 (n = 10) wurden am Todestag Tumore entnommen, in flüssigem N₂ schockgefroren und Cryo-Gewebeschnitte hergestellt. Diese wurden gegen Maus CD31 immunhistochemisch gefärbt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Endothelgefäße/Gesichtsfeld + SEM.

Die am jeweiligen Todestag entnommenen Tumorproben von Tieren aus allen vier Therapiegruppen wurden histologisch aufbereitet und immunhistochemisch mit anti-Maus CD31 gefärbt. Die lokale Injektion von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 führte nach immunhistologischer Färbung des Tumorgewebes zu einer Reduktion der Gefäßdichte um 53,7 % für AdrhPlgK1-4 (10,7 Gefäße/Gesichtsfeld) und 61,5 % für AdrhPlg K1-5 (8,9 Gefäße/Gesichtsfeld) im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ (23,1 Gefäße/Gesichtsfeld). Die Gabe von AdwthPlg (23,3 Gefäße/Gesichtsfeld) führte nicht zu einer Reduktion der Gefäßdichte. Die Reduktion der Gefäßdichte durch die Gabe von AdrhPlgK1-4 oder AdrhPlgK1-5 war mit *p < 0,0001 im Vergleich zur AdlacZ Kontrolle signifikant (Abbildung 35).

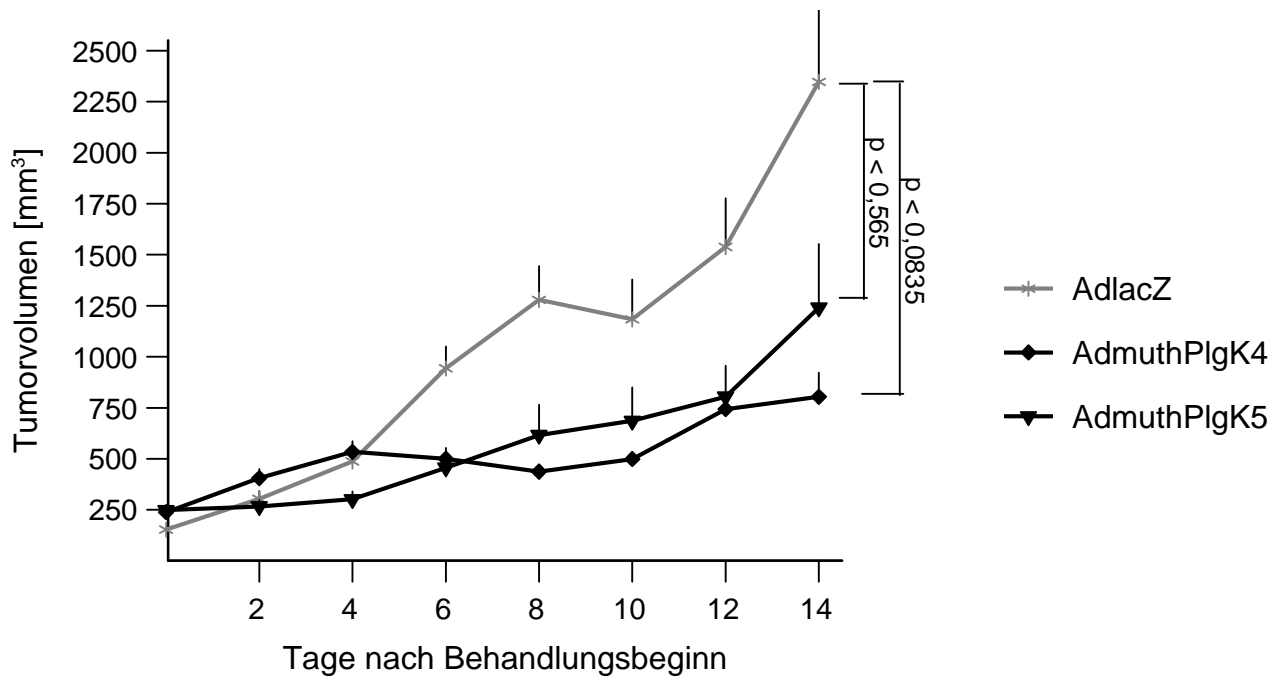


Abbildung 36: Wachstumskurve sc. Hepa129 HCC-Tumoren nach intratumoraler Gabe von AdlacZ (n = 9), AdmuthPlgK4 (n = 9), oder AdmuthPlgK5 (n = 9). Die Tumore wurden wie vorbeschrieben implantiert und behandelt. Dargestellt ist das gemittelte Tumolvolumen + SEM (*p < 0,05).

Bereits an Tag sechs zeichnete sich ein Vorteil für die mit AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 behandelten Tiere mit einer Reduktion des Tumolvolumens um 47 % für AdmuthPlgK4 und 51 % für AdmuthPlgK5. An Tag acht zeigte sich für AdmuthPlgK4 eine Inhibition des Tumorwachstums um 66 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Gabe von AdmuthPlgK5 inhibierte das Tumorwachstum um 52 % verglichen mit der Kontrollgruppe. An Tag 10 betrug die Verminderung des Tumorwachstums für AdmuthPlgK4 58 % und für AdmuthPlgK5 42 % verglichen mit AdlacZ. Nach 12 Tagen war das Tumolvolumen für AdmuthPlgK4 um 52 % und für AdmuthPlgK5 um 48 % reduziert. Vierzehn Tage nach Therapiebeginn war das Tumorwachstum in der Gruppe, die AdmuthPlgK4 erhalten hat, um 66 % und in der Gruppe, die AdmuthPlgK5 erhalten hatte, um 37 % reduziert (verglichen mit der Kontrolle). Die Inhibition des Tumorwachstums war ab Tag sechs für beide Plasminogenderivate signifikant (p < 0,03).

Darüber hinaus zeigte sich sowohl für AdmuthPlgK4, wie auch AdmuthPlgK5 in einigen Tieren vollständiger Tumorregress (ein Tier nach Behandlung mit AdmuthPlgK5 und zwei Tiere nach Behandlung mit AdmuthPlgK4). Während das mit AdmuthPlgK5 behandelte Tier bereits ab Tag acht vollständig tumorfrei war, zeigten die mit

AdmuthPIgK4 behandelten Tiere erst nach Tag 20, bzw. Tag 22 eine vollständige Elimination des Tumors.

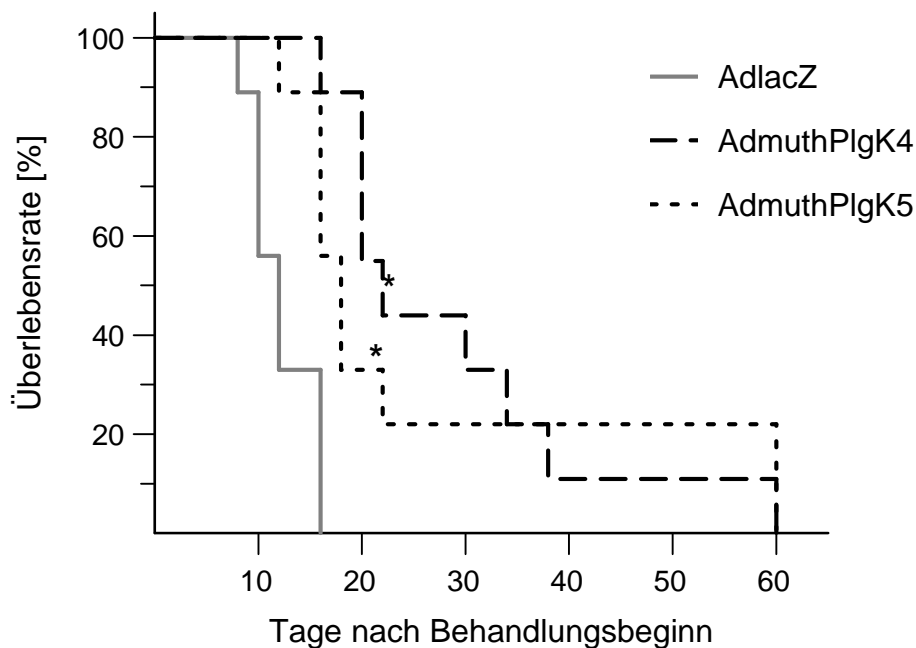


Abbildung 37: Überlebenskurve (nach Kaplan-Mayer) von Tieren mit Hepa129-Tumoren nach intratumoraler Gabe von AdlacZ, AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5. Die Tumore wurden wie vorherbeschrieben implantiert und behandelt. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 15 mm wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und dieser Tag als Todeszeitpunkt definiert (* $p < 0,05$).

Neben einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums war auch das Langzeitüberleben der Tiere, welche AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 erhalten hatten, erhöht. Das durchschnittliche Überleben lag für AdlacZ behandelte Tiere bei 12,2 Tagen. Tiere, welche AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 erhalten hatten überlebten durchschnittlich 26,4 Tage, bzw. 22 Tage.

Die am jeweiligen Todestag entnommenen Tumorproben von Tieren aus allen drei Therapiegruppen wurden histologisch aufbereitet und immunhistochemisch mit mouse anti-CD31 gefärbt.

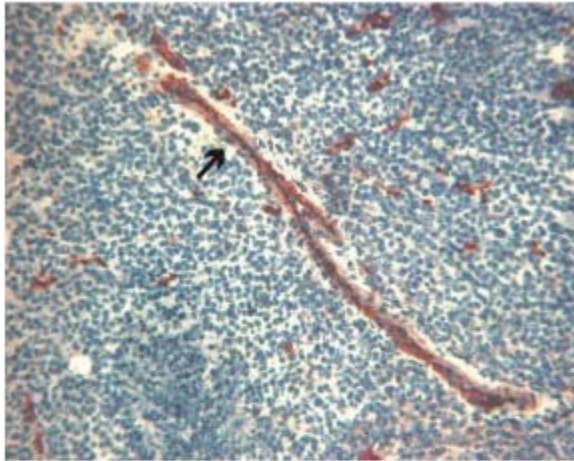
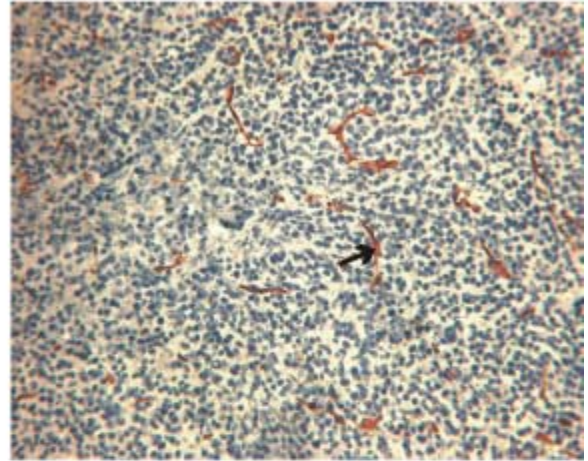
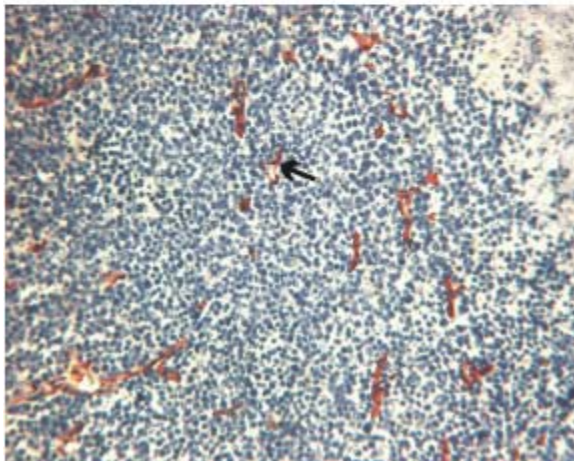
AdlacZ**AdmuthPIgK4****AdmuthPIgK5**

Abbildung 38: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme von HCC-Tumoren, welche mit AdlacZ, AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 behandelt wurden (Vergrößerung 400fach). Die Tumore wurden wie oben beschrieben explantiert, histologisch aufbereitet und gegen anti Maus CD31 immunhistochemisch gefärbt. Endothelgefäße sind durch eine rot-braune Färbung gekennzeichnet (schwarzer Pfeil).

In der Histologie der HCC-Tumore zeigte sich, daß die Gabe von AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 zu einer Reduktion der Gefäßdichte und zu einer verminderten Komplexität der Gefäße führte (Abbildung 38). Während in der Gruppe, welche AdlacZ erhalten hatte, große und komplexe Gefäßstrukturen erkennbar waren, zeigten Tumore aus den anderen beiden Gruppen eine weit weniger verzweigte Ausbildung endothelialer Strukturen.

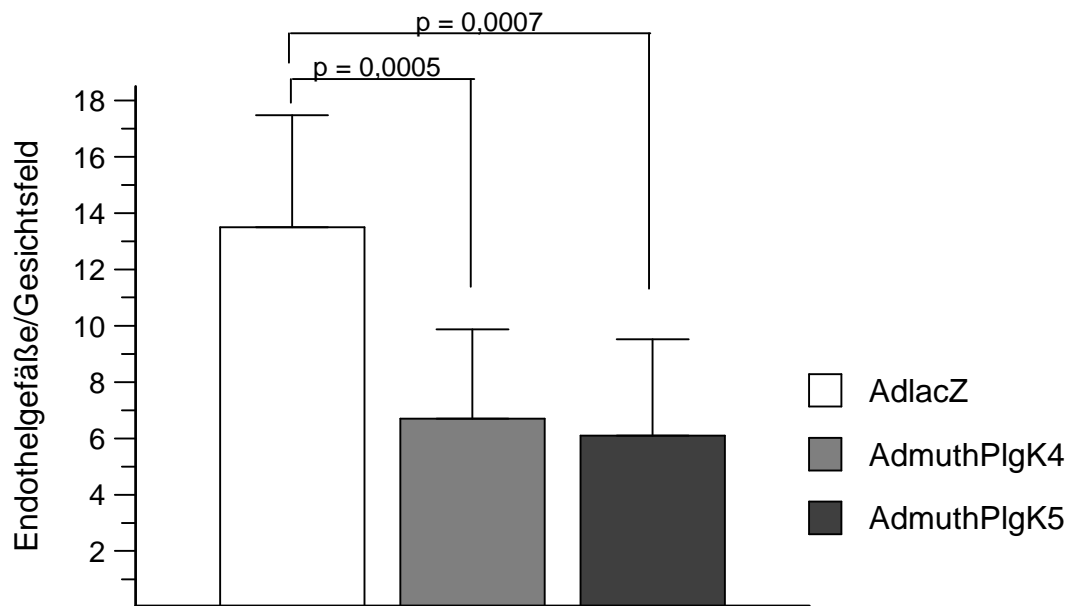


Abbildung 39: Anzahl der EndothelgefäÙe nach CD31-Färbung von HCC-Tumoren nach lokaler Therapie mit AdlacZ, AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 (n = 10). Nach der Tumorzellimplantation und Behandlung wurden am Todestag die Tumore explantiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und Cryo-Gewebeschnitte hergestellt. Diese wurden anschließend gegen Maus CD31 gefärbt. Dargestellt ist die mittlere Anzahl endothelialer GefäÙe/Gesichtsfeld + SEM.

Die lokale Gabe von AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 führte nach immun-histochemischer Färbung des Tumorgewebes zu einer Reduktion der GefäÙdichte um 52,6 % für AdmuthPIgK4 (6,4 GefäÙe/Gesichtsfeld) und 54,8 % für AdmuthPIgK5 (6,1 GefäÙe/Gesichtsfeld) im Vergleich zur Kontrolle AdlacZ (13,5 GefäÙe/Gesichtsfeld). Die Reduktion der GefäÙdichte durch die Gabe von AdmuthPIgK4 oder AdmuthPIgK5 war mit $p < 0,001$ signifikant.

5 Diskussion

Das Hepatozelluläre Karzinom ist auch heutzutage eine Malignomerkrankung mit schlechter Prognose. Nach Diagnosestellung beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit ca. 6 – 12 Monate. Für fortgeschrittene Tumorstadien stehen lediglich palliative Behandlungen zur Verfügung (Hillert et al., 2000; Lau, 2000; Okuda, 2000; Di Maio et al., 2002; Carr, 2004). Um neue Therapieoptionen zu etablieren, sind daher neue, experimentelle Strategien erforderlich. Das HCC ist als hypervaskularisierter und überwiegend arteriell perfundierter Tumor insbesondere für eine angiostatische (Gen-) Therapie geeignet, die über eine Hemmung der Tumorangio-genese die Tumorbio-logie beeinflussen soll. Tumorangio-genese, die Einsprossung neuer Blutgefäße in den Tumor, ist mittlerweile als eine bedeutende Voraussetzung für fortschreitendes Tumorzunahme bekannt. Ab einer Größe von ca. 2-3 mm³ müssen Tumoren ihren Metabolismus durch Vaskularisierung sicherstellen und verbessern (Hanahan & Folkman, 1996; Carmeliet & Jain, 2000; Hanahan & Weinberg, 2000; Folkman, 2002; Kerbel & Folkman, 2002).

Angiostatisch wirkende antitumorale Behandlungen greifen durch Hemmung der Gefäßversorgung des Tumors in die Tumorbio-logie ein. Zu den namhaften angiostatischen Faktoren zählen u.a. Endostatin, Angiostatin, oder Angiostatin-ähnliche Moleküle (O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1996; Cao et al., 1997; O'Reilly et al., 1997; Cao et al., 1999). Diese angiostatisch wirksamen Proteine können zum einen als (rekombinantes) Protein verabreicht werden, alternativ kann das angiostatisch wirksame Protein auch nach Gentransfer von der korrespondierenden cDNA exprimiert und sezerniert werden. Als effiziente Möglichkeit des Gentransfers haben sich rekombinante Adenoviren erwiesen. So konnten mehrere Arbeitsgruppen mittels adenoviralen Gentransfers der für Angiostatin und Angiostatin-ähnliche Moleküle kodierenden cDNA teils deutliche angiostatische und antitumorale Effekte nachweisen (Hajitou et al., 2002; Schmitz et al., 2002; Schmitz et al., 2004; Galaup et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit hatte die Etablierung einer experimentellen angiostatischen Therapie des HCC im Mausmodell am Beispiel angiostatisch wirksamer Plasminogenderivate zum Ziel. Dafür wurden aus humanem Gesamtplasminogen Derivate generiert, die für verschiedene interne Kringle-Regionen von Plasminogen (rhPlgK1-4, rhPlgK1-5) kodieren. Da Proteinexpression und -prozessierung möglichst

physiologisch erfolgen sollten, wurden rekombinante adenovirale Vektoren der ersten Generation generiert, die die korrespondierenden cDNA Abschnitte der genannten Kringle-Regionen tragen. Zusätzlich wurde die physiologisch vorkommende proteolytische Abspaltung angiostatischer Plasminogenderivate durch Einbringen spezifischer proteolytischer Restriktionserkennungsstellen für die Endoprotease Furin strangabwärts von K4 oder K5 nachgeahmt, um auf diesem Wege die enzymatische Abspaltung angiostatischer Kringle-Regionen auf Proteinebene zu ermöglichen. Dieser Ansatz kann so prinzipiell physiologisch vorhandene Pfade der Proteinexpression und –prozessierung nutzen, letztlich mit dem Ziel einer stabilen bzw. verbesserten Proteinaktivität.

Die konstruierten rekombinanten adenoviralen Vektoren, AdrhPIgK1-4, AdrhPIgK1-5, AdmuthPIgK4, AdmuthPIgK5 und AdwthPIg wurden auf ihre Funktion und Aktivität hin mittels RT-PCR *in vitro* und *in vivo* überprüft. Ihre angiostatische Wirksamkeit konnte *in vitro* anhand des Matrigel-Assays, eines Proliferationsassays und im Apoptose-Assay bestätigt werden. Angiostatische *in vivo* Effekte konnten in einem Matrigel-Assay in Mäusen belegt werden. Die Relevanz dieser Effekte für das Tumorstadium wurde in zwei unterschiedlichen Tumormodellen, einem LLC- und einem HCC-Modell untersucht. Hier wurden als wichtige Verlaufparameter Tumorphänotyp, die Überlebensrate und die Gefäßversorgung der Tumoren erfaßt.

5.1 Synthese der Plasminogenderivate

Angiostatin, neben Endostatin eines der ersten physiologischen Proteine, denen eine angiostatische und antitumorale Wirkung zugesprochen wurde, wird in der Regel über Proteolyse von Gesamtplasminogen generiert. Dies geschieht durch Verdauung mit Matrix-Metalloproteinasen, Elastase, uPa, oder tPa (O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1996; Gately et al., 1997; Cornelius et al., 1998). Die Proteolyse resultiert in der Freisetzung der ersten vier Kringle-Regionen von Plasminogen. Mittlerweile ist bekannt, daß auch die fünfte Kringle-Region von Plasminogen starke angiostatische und antitumorale Effekte aufweist. K5 wird durch Elastase-Verdauung freigesetzt und zeigt eine deutlich stärkere inhibitorische Wirkung auf BAE-Zellen als Angiostatin (Cao et al., 1997). Nicht nur einzeln, sondern auch als vollständiges Molekül mit Angiostatin (K1-5) wurden starke angiostatische Effekte, die die von Angiostatin übertreffen sollen, nachgewiesen. Dieses aus allen fünf Kringle-Regionen bestehende Fragment wurde durch Verdauung mit uPa generiert und wies in verschiedenen Untersuchungen stärkere angiostatische und

antitumorale Effekte als Angiostatin selbst auf (Cao et al., 1999; Soff, 2000; Hanford et al., 2003; Veitonmaki et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden zur Expression der internen Kringle-Regionen zwei Ansätze verfolgt: zum einen die Synthese von cDNA aus Gesamtplasminogen, welche für die Kringle-Regionen 1-4 (rhPlgK1-4, entspricht Angiostatin) und 1-5 (rhPlgK1-5) kodiert, zum anderen die Synthese von cDNA, welche strangabwärts von K4 (muthPlgK4) und K5 (muthPlgK5) eine Restriktionserkennungsstelle für die Endoprotease Furin enthält. Gerade die Insertion der Furin-Erkennungsstelle stellt einen neuen Ansatz dar, angiostatisch wirksame Proteine aus einem neu generierten Vorläuferprotein auf möglichst physiologische Weise zu spalten und damit die angiostatische Wirkung der Kringle-Regionen freizusetzen. Daß die proteolytische Spaltung durch Furin nach Insertion einer künstlichen Furin-Erkennungsstelle in einem Vorläuferprotein grundsätzlich möglich ist, konnte bereits 1997 anhand der Spaltung von Pro-Insulin in Insulin nachgewiesen werden (Gros et al., 1997; Gros et al., 1999). Darauf aufbauend konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, daß die Insertion einer Furin-Erkennungsstelle strangabwärts von Kringle 3 von Plasminogen eine quasi-physiologische Proteolyse von Plasminogen und somit Freisetzung der angiostatisch wirksamen Kringle-Regionen 1-3 ermöglicht (Schmitz et al., 2002).

In dieser Arbeit gelang sowohl die Generierung der cDNA-Fragmente rhPlgK1-4 und rhPlgK1-5, sowie die Insertion von Furin-Erkennungsstellen strangabwärts von Kringle 4 (muthPlgK4) und 5 (muthPlgK5) durch gezielte Mutagenese. Die angiostatische Wirksamkeit dieser Plasminogenderivate sollte dann im weiteren durch adenoviralen Gentransfer der korrespondierenden cDNA Abschnitte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

5.2 Synthese der adenoviralen Vektoren und Genexpression *in vitro*

Bisher gestaltet sich die Synthese ausreichender Mengen therapeutisch wirksamer Proteinmengen als schwierig. Durch den physiologischen Abbau dieser Proteine im Organismus ist auch eine kontinuierliche Applikation dieser Proteine wünschenswert (Brower, 1999; Soff, 2000; Westphal et al., 2000). Durch adenoviralen Gentransfer lassen sich therapeutisch wirksame Gene in die (Tumor-) Zelle einbringen, können dort exprimiert werden und ihre therapeutische (angiostatische) Wirkung entfalten. Gerade dieser physiologische Weg begünstigt auch den Gentransfer eines Vorläuferproteins, welches nach Transduktion der Zielzelle exprimiert und quasi-physiologisch in das

aktive Protein gespalten wird. Da Adenoviren nicht in das Genom integrieren und durch ihren natürlichen Hepatropismus sowie ihre dosisabhängige geringe systemische Toxizität eignen sie sich prinzipiell besonders für lokale, aber mit Einschränkung auch für systemische Therapien (Harui et al., 1999; Nakatani et al., 2000; Kay et al., 2001; Roy-Chowdhury et al., 2002).

Zur Herstellung der rekombinanten Adenoviren AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4, AdmuthPlgK5 und AdwthPlg wurde in diesem Projekt das von He et al. entwickelte System eingesetzt (He et al., 1998). Ursprünglich wurden adenovirale Vektoren synthetisiert, in dem das Transgen in einen transienten Expressionsvektor (pMV100) unter Kontrolle des CMV-Promotors inkloniert wurde. Transgen und Promotor wurden durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid ausgeschnitten und in einen adenoviralen Transfervektor (z. B. pMV60) inkloniert. Dieses wurde mit einem adenoviralen Konstruktionsvektor Vektor (z. B. pJM17) über Co-Transfektion in die Verpackungszelllinien (911- oder HEK293-Zellen) eingebracht. So entstandene rekombinante Adenoviren konnten anschließend aus einzelnen Plaques isoliert und weiter amplifiziert werden (Qian et al., 1995). In allen Klonierungsschritten wurde die korrekte DNA-Sequenz der Plasminogenderivate (wthPlg, rhPlgK1-4, rhPlgK1-5, muthPlgK4 und muthPlgK5) mittels Sequenzierung verifiziert. Entsprechend wurde auch die korrekte DNA-Sequenz der rekombinanten Adenoviren nach einem modifizierten Protokoll von Elsom bestätigt (Elsom, 1997).

Vor dem *in vitro* und *in vivo* Einsatz der Vektoren ist eine weitere Amplifikation und Aufreinigung erforderlich, die nach einer seit 30 Jahren bewährten Methode durch CsCl-Ultrazentrifugation erfolgte. Durch diese Methode können replikationsdefiziente Adenoviren sicher von Zelltrümmern und defektiven Viren getrennt werden (Green & Pina, 1964; Graham, 1991). Eine anschließende Dialyse mit PBS entfernt das CsCl aus der Viruslösung, so daß diese im folgenden nach Titerbestimmung für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eingesetzt werden können. Virustiter werden häufig durch Bestimmung der Gesamtheit aller vorhandenen Viruspartikel mittels Messung der optical particle units (Lawrence, 1967) und biologisch im sogenannten Plaque Assay (Green & Wold, 1979) bestimmt. Bei letzterem werden die biologisch tatsächlich infektiösen Partikel quantifiziert. Da das Verhältnis aus opu und pfu ein Qualitätsindikator für die gesamte Virusproduktion darstellt, wurde in dieser Arbeit sowohl eine physikalische Messung (Bestimmung der opu), als auch eine biologische Messung der aktiven adenoviralen Partikel durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die

Anzahl der tatsächlich infektiösen Partikel (pfu) im Schnitt um den Faktor 10 bis 50 unter der Gesamtzahl der viralen Partikel (opu) lag. Die so ermittelten Faktoren korrespondieren zu anderen Arbeiten, in denen vergleichbare Werte beschrieben wurden (Mittereder et al., 1996; Raskopf et al., 2005). Die Genexpression der generierten Vektoren wurde *in vitro* beispielhaft an A549-Zellen gezeigt. Als humane Lungenkarzinom-Zelllinie exprimieren A549-Zellen kein Plasminogen und eignen sich neben ihrer guten Transduzierbarkeit daher für den Transgennachweis. In Übereinstimmung mit andere Veröffentlichungen fanden sich in dieser Arbeit bei 500 MOI Transduktionsraten von ca. bei 80 – 90 % (Qian et al., 1995).

5.3 Funktionelle *in vitro* Untersuchungen

Die angiostatische Wirksamkeit bisher untersuchter Plasminogenderivate erstreckt sich auf die Inhibition der Ausbildung endothelialer Strukturen im Matrigel, auf die Inhibition der Proliferation und die Förderung der Apoptose in Endothelzellen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß diese Effekte endothelzellspezifisch sind. Daher wurden diese Aspekte auch in dieser Arbeit an Endothel- und Tumorzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß konditionierter Zellüberstand von Zellen, die mit den Adenoviren kodierend für die Plasminogenderivate transduziert wurden, die Bildung endothelähnlicher Strukturen im Matrigel inhibierte. Auch die Proliferation von Endothelzellen (aber nicht von Tumorzellen) wurde mit konditioniertem Zellüberstand inhibiert, so daß die *in vitro* Effekte der generierten Konstrukte ebenfalls auf eine endothelzellspezifische Wirkung hinweisen. Die Apoptoserate hingegen wurde in dem von uns gewählten experimentellen Ansatz weder bei Endothel- noch bei Tumorzellen beeinflußt.

Die Inhibition endothelähnlicher Strukturen im Matrigel durch die in dieser Arbeit verwendeten Plasminogenderivate steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen. Cornelius et al. konnten in einer Studie zeigen, daß Angiostatin die Bildung endothelähnlicher Strukturen im Tube Formation Assay um über 50 % im Vergleich zur Kontrolle inhibiert (Cornelius et al., 1998). Adenoviraler Gentransfer für strangabwärts von K3 mutiertes Plasminogen (AdmuthPIgK3) führte im gleichen Assay zu einer Inhibition der Ausbildung endothelialer Strukturen um 30 % im Vergleich zur Kontrolle (Schmitz et al., 2002). Die in der Literatur beschriebenen Endothelzellassays sind sehr unterschiedlich, so daß die dokumentierten Ergebnisse oft schwer vergleichbar sind. Zusammenfassend kann jedoch eine deutliche Tendenz zu

der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen Plasminogenderivate, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gezeigt werden. Die Endothelzellspezifität der Plasminogenderivate konnte weiterführend in einem Proliferationsassay bestätigt werden. Keinen Einfluß hatten die Plasminogenderivate hingegen auf die Proliferationsrate der LLC1- und Hepa129-Tumorzellen. Dieser endothelzell-spezifische, antiproliferative Effekt der Plasminogenderivate wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Die Gabe von rekombinantem K1-4-Protein inhibierte die Proliferationsrate bei Endothelzellen um 44 % im Vergleich zur Kontrolle. Für humane Fibroblasten konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Cornelius et al., 1998). Auch die Gabe von K1-5-Protein hemmte in anderen Studien die Proliferation von Endothelzellen um 50 % (Cao et al., 1996; Cao et al., 1999). Adenoviraler Gentransfer für muthPIgK3 führte bei Endothelzellen zu einer Inhibition der Proliferation um 29 %. AdK1-3 reduzierte in der gleichen Studie die Proliferationsrate um 39 %. Eine inhibierende Wirkung auf Tumorzellen konnte auch hier nicht nachgewiesen werden (Schmitz et al., 2002).

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen im Apoptose-Assay konnten andere Arbeitsgruppen für verschiedene Plasminogenderivate pro-apoptotische Wirkungen nachweisen. So konnte durch Annexin V und TUNEL Assay demonstriert werden, daß K1-3-, K1-4- und Angiostatin_{4,5}-Protein in Endothelzellen Apoptose induziert (Lucas et al., 1998). Annexin V Labeling und Analyse der SubG₁-Fraktion zeigte in einer anderen Studie mit Angiostatin_{4,5}-Protein Stadien der frühen und späten Apoptose in BAE- und HUVE-Zellen, aber nicht in LLC1- und PC3-Zellen. Darüber hinaus wurden die Caspasen 3, 8 und 9 in BAE- und HUVE-Zellen durch Angiostatin_{4,5}-Protein aktiviert, was auch zur Freisetzung von Cytochrom c und damit zur Apoptose führte (Hanford et al., 2003). Durch adenoviralen Gentransfer konnte vor kurzem gezeigt werden, daß durch K1-3 (AdK1-3) und K1-5 (AdK1-5) die Caspasen 3, 8 und 9 in HUVE-Zellen aktiviert werden und dadurch Apoptose induziert werden kann (Galaup et al., 2005). In dem von uns gewählten, etwas divergenten Ansatz, konnten pro-apoptotische Effekte für die hier hergestellten Konstrukte nicht bestätigt werden.

5.4 Funktionelle in vivo Untersuchungen

Nach Bestätigung der angiostatistischen Wirkung der Plasminogenderivate *in vitro* sollte deren angiostatistische Wirksamkeit *in vivo* bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde die Gefäßeinsprossung in extrazelluläre Matrixsubstanz im sogenannten Matrigel Assay *in*

vivo untersucht. Die systemische Gabe der adenoviralen Vektoren kodierend für die Plasminogenderivate reduzierte die Infiltration von Endothelzellen und die Bildung von Endothelgefäßen im Matrigel signifikant. Bereits frühere Untersuchungen hatten vergleichbare Effekte gezeigt. So vermochte K1-5-Protein in einem sog. CAM (Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane) Assay die Bildung neuer embryonaler Blutgefäße zu hemmen und reduzierte *in vivo* im Mouse Corneal Micropocket Assay die FGF-induzierte Neovaskularisierung in der Kornea von Mäusen um 80 % (Cao et al., 1999). In anderen vorangegangenen Untersuchungen hatten sich AdK1-3 und AdmuthPlgK3 im gleichen Assay als angiostatisch wirksam herausgestellt. Darin verringerte AdK1-3 die Endothelzellinfiltration um 51 % und AdmuthPlgK3 um 43% (Schmitz et al., 2002). Die hier dargestellten Daten bestätigen die vorhergehenden *in vitro* Ergebnisse und demonstrieren die *in vivo* Wirksamkeit der eingesetzten Plasminogenderivate nach systemischer Applikation.

5.5 Systemische Therapie subkutaner LLC-Tumoren

Der Nachweis antitumoraler Effekte durch Angiostatin gelang erstmals 1994 in einem Lungenkarzinom (LLC)-Modell (O'Reilly et al., 1994). O'Reilly und Arbeitsgruppe konnten damals zeigen, daß die Gabe von Angiostatin-Protein nach der Explantation des Primärtumors das Metastasenwachstum und die Tumorangiogenese reduzierte. Im gleichen Tumormodell sollte zunächst untersucht werden, ob der adenovirale Gentransfer für die generierten Plasminogenderivate ebenfalls das Tumorstadium verzögert. In den hier vorgenommenen Untersuchungen erwies sich die Gabe von AdrhPlgK1-4 wirksamer als die Injektion von AdrhPlgK1-5. In einem anderen Tumormodell (B16-Melanomzellinvasion in die Lunge) bewirkte die systemische Gabe von AdK1-5 eine signifikante Inhibition der Tumorzellinvasion um 87 % (Galaup et al., 2005). Deutliche antitumorale Effekte konnten auch durch die systemische Gabe von AdK1-3 nachgewiesen werden. Dies führte in einem Gliom-Modell in der Ratte zu einer deutlichen Inhibition des Tumorstadiums um 80 % (Griscelli et al., 1998).

Ebenfalls im LLC-Modell konnte nach systemischer Gabe von AdK1-3 und AdmuthPlgK3 gezeigt werden, daß das Tumorstadium bereits ab Tag 4 nach Behandlungsbeginn signifikant um 55 % für AdK1-3 und um 65 % für AdmuthPlgK3 verringert war (Schmitz et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit die Gabe von AdmuthPlgK4 oder AdmuthPlgK5 das Wachstum sc.er LLC-Tumore nicht signifikant beeinflussen. Erstmals wurde in dieser Arbeit als Kontrollkonstrukt auch die

Wildtypform von Plasminogen eingesetzt. Mit AdwthPlg behandelte Mäuse zeigten allerdings das gleiche progressive Wachstumsverhalten der Tumore wie mit Kontrollvektor AdlacZ behandelte Tiere. Die antitumorale Wirkung von ArhPlgK1-4 und AdrhPlgK1-5 im sc. LLC-Modell nach systemischer Applikation ließ sich teilweise auf angiostatische Effekte zurückführen, da die intratumorale Gefäßdichte in den Behandlungsgruppen im Vergleich zu beiden Kontrollen erniedrigt war. Entsprechend dazu wurde in einer vorangegangenen Studie für die systemische Gabe von AdK1-3 und AdmuthPlgK3 im LLC-Modell in der athymischen Maus eine signifikante Reduktion der intratumoralen Gefäßdichte um 59 % für AdK1-3 bzw. 61 % für AdmuthPlgK3 behandelte Tiere im Vergleich zur Kontrolle gefunden (Schmitz et al., 2002). Erwartungsgemäß war die systemische Applikation von AdwthPlg unwirksam.

5.6 Lokale Therapie subkutaner HCC-Tumoren

Als hypervaskularisierter Tumor ist das HCC für eine angiostatisch ausgerichtete Behandlung grundsätzlich geeignet. Deshalb wurde der hier gewählte angiostatische Therapieansatz in ein HCC Tumormodell transferiert. Dabei konnte mittels adenoviralem Gentransfer für die generierten Plasminogenderivate eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums erreicht werden. Vergleichbare antitumorale Effekte hatten andere Arbeitsgruppen in allerdings unterschiedlichen Tumormodellen gezeigt. Die intratumorale Applikation von AdK1-3 führte in einem Gliom-Modell der Ratte zu einer deutlichen Inhibition des Tumorwachstums um 80 %, die ebenfalls mit einer verringerten Gefäßdichte einherging. Ähnlich wirksam war auch die lokale Injektion von AdK1-3 in einem humanen Brustkrebs-Modell in der athymischen Maus (Griscelli et al., 1998). Ein vergleichbares Konstrukt verlangsamte in einem humanen HCC-Modell in der immundefizienten Maus das Tumorwachstum signifikant (Schmitz et al., 2002). Für AdK1-4 konnte in einem Metastasen Brustkrebs-Modell eine Verringerung der Anzahl und Größe von Lungenmetastasen demonstriert werden (Gyorffy et al., 2001). Antitumorale Effekte durch adenoviralen Gentransfer von K1-3 und K1-5 wurden vor kurzem in einem humanen Brustkrebs-Modell in der Maus demonstriert. Die intratumorale Gabe von AdK1-5 resultierte dabei in einer 90 %igen Reduktion des Tumorwachstums. Bei 40 % aller Tiere kam es sogar zur Tumorelimination (Galaup et al., 2005).

In der Literatur gibt es bislang für die hier eingesetzten neuen Konstrukte AdwthPlg, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 gar keine Daten. Plasminogen selbst wurde von zwei

anderen Arbeitsgruppen aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften eine protumorale Wirkung zugesprochen, die in dem hier untersuchten HCC-Modell bestätigt werden konnte (Schmitt et al., 1997; Andreasen et al., 2000). Das HCC-Tumorwachstum war im Vergleich zur AdlacZ Kontrolle signifikant beschleunigt. Diese Beobachtung konnte im vorbeschriebenen LLC-Modell nicht gemacht werden.

Auch im HCC-Modell konnte die antitumorale Wirksamkeit zumindest teilweise auf eine verminderte intratumorale Gefäßdichte zurückgeführt werden. Bereits Griscelli et al. wiesen eine um 65 % verminderte intratumorale Gefäßdichte nach lokaler Applikation von AdK1-3 in einem Gliom-Modell nach. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, daß die intratumorale Apoptoserate in der AdK1-3 Behandlungsgruppe deutlich erhöht war (Griscelli et al., 1998). Ob auch in der hier dargestellten Untersuchung neben angiostatischen Effekten pro-apoptische Effekte zur antitumoralen Wirkung beitragen, muß noch weiter untersucht werden.

Angiostatische Behandlungsansätze zeigten häufig eine Verlangsamung des Tumorwachstums, bestenfalls einen Wachstumsarrest. Interessanterweise fand sich in dem hier eingesetzten HCC-Modell nach lokaler Behandlung mit AdrhPIgK1-5 bei 50 % der behandelten Tiere ein Langzeitüberleben (> 3 Monate) mit vollständiger Tumorelimination. Hier bestätigte sich die vorbeschriebene stärkere angiostatische und antitumorale Wirksamkeit von K1-5 (Galaup et al., 2005) für das HCC.

Im Querschnitt der hier vorliegenden antitumoralen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der publizierten Daten zu K1-5, stellt sich AdK1-5 unter den hier untersuchten Konstrukten zur Behandlung des HCC am vielversprechendsten dar.

5.7 Ausblick

Eine weitere Verbesserung der Wirksamkeit der beschriebenen angiostatischen Therapieformen könnte durch eine verlängerte Transgenexpression erreicht werden, denn für Adenoviren der ersten Generation ist eine nur transient verlaufende Expression bekannt. Dafür kommen Adeno-assoziierte Viren oder gutless Adenoviren in Frage, da diese keine relevante Immunantwort des Wirtsorganismus auslösen. Allerdings ist die Herstellung und Aufreinigung der Vektoren aufwendiger als bei Adenoviren der ersten Generation, so daß insbesondere die *in vivo* Anwendung limitiert ist. In weiterführenden Untersuchungen soll die Langzeitexpression von K1-5 in einem leberspezifischen Adeno-assoziierten Konstrukt zur Therapie des HCC verfolgt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist es, adenovirale Gentherapien mit konventionellen Therapien, wie z.B. Bestrahlung oder anderen antitumoral wirksamen Substanzen zu kombinieren. Damit wurden in ersten experimentellen Studien verbesserte Ergebnisse verglichen mit der Einzeltherapie erzielt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß angiostatisch wirksame Faktoren erfolgreich zur Behandlung des experimentellen HCC eingesetzt werden können. Abschließende Daten zur Übertragung und Anwendung einer angiostatischen Therapie des HCC im Menschen stehen allerdings noch aus.

6 Literaturverzeichnis

- Andreasen, P. A., Egelund, R. and Petersen, H. H. (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." Cell Mol Life Sci **57**(1): 25-40.
- Avantaggiati, M. L., Natoli, G., Balsano, C., Chirillo, P., Artini, M., De Marzio, E., Collepardo, D. and Levrero, M. (1993). "The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements." Oncogene **8**(6): 1567-74.
- Bailey, E. A., Iyer, R. S., Stone, M. P., Harris, T. M. and Essigmann, J. M. (1996). "Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1535-9.
- Barajas, M., Mazzolini, G., Genove, G., Bilbao, R., Narvaiza, I., Schmitz, V., Sangro, B., Melero, I., Qian, C. and Prieto, J. (2001). "Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12." Hepatology **33**(1): 52-61.
- Bhushan, M., Young, H. S., Brenchley, P. E. and Griffiths, C. E. (2002). "Recent advances in cutaneous angiogenesis." Br J Dermatol **147**(3): 418-25.
- Bosch, F. X., Ribes, J. and Borrás, J. (1999). "Epidemiology of primary liver cancer." Semin Liver Dis **19**(3): 271-85.
- Brower, V. (1999). "Tumor angiogenesis--new drugs on the block." Nat Biotechnol **17**(10): 963-8.
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M. and Llovet, J. M. (2004). "Focus on hepatocellular carcinoma." Cancer Cell **5**(3): 215-9.
- Buendia, M. A. (2000). "Genetics of hepatocellular carcinoma." Semin Cancer Biol **10**(3): 185-200.
- Cao, G., Kuriyama, S., Du, P., Sakamoto, T., Kong, X., Masui, K. and Qi, Z. (1997). "Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by in vivo tumor necrosis factor alpha gene transfer." Gastroenterology **112**(2): 501-10.
- Cao, R., Wu, H. L., Veitonmaki, N., Linden, P., Farnebo, J., Shi, G. Y. and Cao, Y. (1999). "Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5

- generated by plasmin-mediated proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5728-33.
- Cao, Y., Chen, A., An, S. S., Ji, R. W., Davidson, D. and Llinas, M. (1997). "Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth." J Biol Chem **272**(36): 22924-8.
- Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S. G., O'Reilly, M. S., Llinas, M. and Folkman, J. (1996). "Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells." J Biol Chem **271**(46): 29461-7.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Carr, B. I. (2004). "Hepatocellular carcinoma: current management and future trends." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S218-24.
- Caselmann, W. H. (1998). "Pathogenesis of hepatocellular carcinoma." Digestion **59** Suppl 2: 60-3.
- Caselmann, W. H., Blum, H. E., Fleig, W. E., Huppert, P. E., Ramadori, G., Schirmacher, P. and Sauerbruch, T. (1999). "Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankheiten zur Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms." Z Gastroenterol **37**: 353-65.
- Cech, T. R. (2002). "Ribozymes, the first 20 years." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1162-6.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A. and Shapiro, S. D. (1998). "Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization." J Immunol **161**(12): 6845-52.
- Davidoff, A. M., Nathwani, A. C., Spurbeck, W. W., Ng, C. Y., Zhou, J. and Vanin, E. F. (2002). "rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice." Cancer Res **62**(11): 3077-83.
- De Mitri, M. S., Poussin, K., Baccharini, P., Pontisso, P., D'Errico, A., Simon, N., Grigioni, W., Alberti, A., Beaugrand, M., Pisi, E. and et al. (1995). "HCV-associated liver cancer without cirrhosis." Lancet **345**(8947): 413-5.

- Di Maio, M., De Maio, E., Perrone, F., Pignata, S. and Daniele, B. (2002). "Hepatocellular carcinoma: systemic treatments." J Clin Gastroenterol **35**(5 Suppl 2): S109-14.
- Distler, O., Neidhart, M., Gay, R. E. and Gay, S. (2002). "The molecular control of angiogenesis." Int Rev Immunol **21**(1): 33-49.
- Dragan, Y. P. and Pitot, H. C. (1992). "The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat." Carcinogenesis **13**(5): 739-50.
- Durr, R. and Caselmann, W. H. (2000). "Carcinogenesis of primary liver malignancies." Langenbecks Arch Surg **385**(3): 154-61.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Eliceiri, B. P. (2001). "Integrin and growth factor receptor crosstalk." Circ Res **89**(12): 1104-10.
- Eliceiri, B. P. and Cheresh, D. A. (2001). "Adhesion events in angiogenesis." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 563-8.
- Ellis, L. M., Liu, W., Ahmad, S. A., Fan, F., Jung, Y. D., Shaheen, R. M. and Reinmuth, N. (2001). "Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy." Semin Oncol **28**(5 Suppl 16): 94-104.
- Elsom, B. L., Herzog, N. K. (1997). "Rapid Method for preparing Adenovirus DNA." Biotechniques **22**(5): 868-870.
- Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R. C. and Van Der Eb, A. J. (1996). "Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors." Hum Gene Ther **7**(2): 215-22.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. and Donato, F. (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S35-50.
- Ferrara, N. (1999). "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor." J Mol Med **77**(7): 527-43.

- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-8.
- Galaup, A., Magnon, C., Rouffiac, V., Opolon, P., Opolon, D., Lassau, N., Tursz, T., Perricaudet, M. and Griscelli, F. (2005). "Full kringle of plasminogen (aa 1-566) mediate complete regression of human MDA-MB-231 breast tumor xenografted in nude mice." Gene Ther **12**(10): 831-42.
- Gasparini, G. (1999). "The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia." Drugs **58**(1): 17-38.
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Cundiff, D. L., Grella, D., Castellino, F. J., Enghild, J., Kwaan, H. C., Lee, F., Kramer, R. A., Volpert, O., Bouck, N. and Soff, G. A. (1997). "The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10868-72.
- Ghebranious, N. and Sell, S. (1998). "Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin, and p53 expression each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice." Hepatology **27**(2): 383-91.
- Graham, F. L., Prevec, L. (1991). Manipulation of adenovirus vectors. Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols. E. J. Murray. Clifton, NJ, The Humana Press: 109-128.
- Green, M. and Pina, M. (1964). "Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication, Vi. Properties of Highly Purified Tumorigenic Human Adenoviruses and Their DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 1251-9.
- Green, M. and Wold, W. S. (1979). "Human adenoviruses: growth, purification, and transfection assay." Methods Enzymol **58**: 425-35.
- Griscelli, F., Li, H., Bennaceur-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P. and Lu, H. (1998). "Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6367-72.

- Griscelli, F., Li, H., Cheong, C., Opolon, P., Bennaceur-Griscelli, A., Vassal, G., Soria, J., Soria, C., Lu, H., Perricaudet, M. and Yeh, P. (2000). "Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6698-703.
- Gros, L., Montoliu, L., Riu, E., Lebrigand, L. and Bosch, F. (1997). "Regulated production of mature insulin by non-beta-cells." Hum Gene Ther **8**(18): 2249-59.
- Gros, L., Riu, E., Montoliu, L., Ontiveros, M., Lebrigand, L. and Bosch, F. (1999). "Insulin production by engineered muscle cells." Hum Gene Ther **10**(7): 1207-17.
- Guo, J. T., Zhou, H., Liu, C., Aldrich, C., Saputelli, J., Whitaker, T., Barrasa, M. I., Mason, W. S. and Seeger, C. (2000). "Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections." J Virol **74**(3): 1495-505.
- Gyorffy, S., Palmer, K. and Gauldie, J. (2001). "Adenoviral vector expressing murine angiostatin inhibits a model of breast cancer metastatic growth in the lungs of mice." Am J Pathol **159**(3): 1137-47.
- Hajitou, A., Grignet, C., Devy, L., Berndt, S., Blacher, S., Deroanne, C. F., Bajou, K., Fong, T., Chiang, Y., Foidart, J. M. and Noel, A. (2002). "The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells." Faseb J **16**(13): 1802-4.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanford, H. A., Wong, C. A., Kassan, H., Cundiff, D. L., Chandel, N., Underwood, S., Mitchell, C. A. and Soff, G. A. (2003). "Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells." Cancer Res **63**(14): 4275-80.
- Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S. and Mitani, K. (1999). "Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors." J Virol **73**(7): 6141-6.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2509-14.

- Hillert, C. and Rogiers, X. (2000). "[Curative therapy of hepatocellular carcinoma (HCC). Resection or transplantation?]." Internist (Berl) **41**(2 Pt 2): 191-7.
- Ishikawa, H., Nakao, K., Matsumoto, K., Ichikawa, T., Hamasaki, K., Nakata, K. and Eguchi, K. (2003). "Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene." Hepatology **37**(3): 696-704.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-93.
- Ji, W. R., Castellino, F. J., Chang, Y., Deford, M. E., Gray, H., Villarreal, X., Kondri, M. E., Marti, D. N., Llinas, M., Schaller, J., Kramer, R. A. and Trail, P. A. (1998). "Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis." Faseb J **12**(15): 1731-8.
- Johnson, R. C. (1997). "Hepatocellular carcinoma." Hepatogastroenterology **44**(13): 307-12.
- Jones, A., Fujiyama, C., Blanche, C., Moore, J. W., Fuggle, S., Cranston, D., Bicknell, R. and Harris, A. L. (2001). "Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in human bladder tumors and cell lines." Clin Cancer Res **7**(5): 1263-72.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C. and Naldini, L. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Kerbel, R. and Folkman, J. (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." Nat Rev Cancer **2**(10): 727-39.
- Kountouras, J. and Lygidakis, N. J. (2000). "New epidemiological data on liver oncogenesis." Hepatogastroenterology **47**(33): 855-61.
- Kubicka, S., Rudolph, K. L., Hanke, M., Tietze, M. K., Tillmann, H. L., Trautwein, C. and Manns, M. (2000). "Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area." Liver **20**(4): 312-8.
- Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., von Recum, H. A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D'Amato, R., Folkman, J. and Mulligan, R. C. (2001). "Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4605-10.

- Kurreck, J. (2003). "Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications." Eur J Biochem **270**(8): 1628-44.
- Lau, W. Y. (2000). "Primary liver tumors." Semin Surg Oncol **19**(2): 135-44.
- Lauer, G. M. and Walker, B. D. (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med **345**(1): 41-52.
- Lawrence, W. C., Ginsberg, H. (1967). "Intracellular uncoating of of type 5 adenovirus deoxyribonucleic acid." J Virol **1**: 851-867.
- Liang, T. J. and Heller, T. (2004). "Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S62-71.
- Liang, T. J., Rehermann, B., Seeff, L. B. and Hoofnagle, J. H. (2000). "Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C." Ann Intern Med **132**(4): 296-305.
- Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jimenez, B., Mandriota, S. J., Borlat, F., Sim, B. K., Wu, Z., Grau, G. E., Shing, Y., Soff, G. A., Bouck, N. and Pepper, M. S. (1998). "Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells." Blood **92**(12): 4730-41.
- Ma, H. I., Lin, S. Z., Chiang, Y. H., Li, J., Chen, S. L., Tsao, Y. P. and Xiao, X. (2002). "Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector." Gene Ther **9**(1): 2-11.
- McCormick, F. (2001). "Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?" Nature Rev Cancer **1**(2): 130-41.
- Mittereder, N., March, K. L. and Trapnell, B. C. (1996). "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy." J Virol **70**(11): 7498-509.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2002). Molekulare Virologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Verlag.
- Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F. and Thomas, G. (1999). "Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis." Trends Cell Biol **9**(1): 28-35.
- Nakatani, T., Kuriyama, S., Tominaga, K., Tsujimoto, T., Mitoro, A., Yamazaki, M., Tsujinoue, H., Yoshiji, H., Nagao, S. and Fukui, H. (2000). "Assessment of

- efficiency and safety of adenovirus mediated gene transfer into normal and damaged murine livers." Gut **47**(4): 563-70.
- Nakayama, K. (1997). "Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins." Biochem J **327**(Pt 3): 625-35.
- Nalpas, B., Driss, F., Pol, S., Hamelin, B., Housset, C., Brechot, C. and Berthelot, P. (1991). "Association between HCV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic liver disease." J Hepatol **12**(1): 70-4.
- Novokhatny, V. V., Kudinov, S. A. and Privalov, P. L. (1984). "Domains in human plasminogen." J Mol Biol **179**(2): 215-32.
- Okuda, K. (2000). "Hepatocellular carcinoma." J Hepatol **32**(1): 225-37.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." Cell **88**(2): 277-85.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C. and Folkman, J. (1996). "Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice." Nat Med **2**(6): 689-92.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. and Folkman, J. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell **79**(2): 315-28.
- O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J. and Moses, M. A. (1999). "Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance." J Biol Chem **274**(41): 29568-71.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer **94**(2): 153-6.
- Parkin, D. M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1999). "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990." Int J Cancer **80**(6): 827-41.
- Pepper, M. S. (2001). "Extracellular proteolysis and angiogenesis." Thromb Haemost **86**(1): 346-55.

- Prieto, J., Herraiz, M., Sangro, B., Qian, C., Mazzolini, G., Melero, I. and Ruiz, J. (2003). "The promise of gene therapy in gastrointestinal and liver diseases." Gut **52**(Suppl 2): ii49-54.
- Qian, C., Bilbao, R., Bruna, O. and Prieto, J. (1995). "Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase." Hepatology **22**(1): 118-23.
- Rabe, C. and Caselmann, W. H. (2000). "Interaction of Hepatitis B virus with cellular processes in liver carcinogenesis." Crit Rev Clin Lab Sci **37**(5): 407-29.
- Rabe, C., Cheng, B. and Caselmann, W. H. (2001). "Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer." Dig Dis **19**(4): 279-87.
- Raskopf, E., Dzienisowicz, C., Hilbert, T., Rabe, C., Leifeld, L., Wernert, N., Sauerbruch, T., Prieto, J., Qian, C., Caselmann, W. H. and Schmitz, V. (2005). "Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model." Hepatology **41**(6): 1233-1240.
- Robbins, K. C., Summaria, L., Hsieh, B. and Shah, R. J. (1967). "The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin." J Biol Chem **242**(10): 2333-42.
- Roy-Chowdhury, J. and Horwitz, M. S. (2002). "Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors." Mol Ther **5**(4): 340-4.
- Sacco, M. G., Caniatti, M., Cato, E. M., Frattini, A., Chiesa, G., Ceruti, R., Adorni, F., Zecca, L., Scanziani, E. and Vezzoni, P. (2000). "Liposome-delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastatization in a transgenic model of spontaneous breast cancer." Cancer Res **60**(10): 2660-5.
- Sacco, M. G., Cato, E. M., Ceruti, R., Soldati, S., Indraccolo, S., Caniatti, M., Scanziani, E. and Vezzoni, P. (2001). "Systemic gene therapy with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice." Gene Ther **8**(1): 67-70.
- Sauter, B. V., Martinet, O., Zhang, W. J., Mandeli, J. and Woo, S. L. (2000). "Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4802-7.

- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F. and Graeff, H. (1997). "Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy." Thromb Haemost **78**(1): 285-96.
- Schmitz, V., Kornek, M., Hilbert, T., Dzienisowicz, C., Raskopf, E., Rabe, C., Sauerbruch, T., Qian, C. and Caselmann, W. H. (2005). "Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice." World J Gastroenterol **11**(28): 4332-6.
- Schmitz, V., Tirado-Ledo, L., Tiemann, K., Raskopf, E., Heinicke, T., Ziske, C., Gonzalez-Carmona, M. A., Rabe, C., Wernert, N., Prieto, J., Qian, C., Sauerbruch, T. and Caselmann, W. H. (2004). "Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice." J Hepatol **40**(5): 787-91.
- Schmitz, V., Wang, L., Barajas, M., Gomar, C., Prieto, J. and Qian, C. (2004). "Treatment of colorectal and hepatocellular carcinomas by adenoviral mediated gene transfer of endostatin and angiostatin-like molecule in mice." Gut **53**(4): 561-7.
- Schmitz, V., Wang, L., Barajas, M., Peng, D., Prieto, J. and Qian, C. (2002). "A novel strategy for the generation of angiostatic kringle regions from a precursor derived from plasminogen." Gene Ther **9**(23): 1600-6.
- Schoeffner, D. J., Matheny, S. L., Akahane, T., Factor, V., Berry, A., Merlino, G. and Thorgeirsson, U. P. (2005). "VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms." Lab Invest **85**(5): 608-23.
- Shibuya, M. (2001). "Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis." Cell Struct Funct **26**(1): 25-35.
- Soff, G. A. (2000). "Angiostatin and angiostatin-related proteins." Cancer Metastasis Rev **19**(1-2): 97-107.
- Sun, Y., Peng, D., Lecanda, J., Schmitz, V., Barajas, M., Qian, C. and Prieto, J. (2000). "In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity." Gene Ther **7**(17): 1467-76.

- Tonini, T., Rossi, F. and Claudio, P. P. (2003). "Molecular basis of angiogenesis and cancer." Oncogene **22**(42): 6549-56.
- Veitonmaki, N., Cao, R., Wu, L. H., Moser, T. L., Li, B., Pizzo, S. V., Zhivotovsky, B. and Cao, Y. (2004). "Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis." Cancer Res **64**(10): 3679-86.
- Wang, L., Schmitz, V., Perez-Mediavilla, A., Izal, I., Prieto, J. and Qian, C. (2003). "Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor." Mol Ther **8**(1): 72-9.
- Westphal, J. R., Ruiter, D. J. and De Waal, R. M. (2000). "Anti-angiogenic treatment of human cancer: pitfalls and promises." Int J Cancer **86**(6): 870-3.
- Xu, R., Sun, X., Tse, L. Y., Li, H., Chan, P. C., Xu, S., Xiao, W., Kung, H. F., Krissansen, G. W. and Fan, S. T. (2003). "Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice." Hepatology **37**(6): 1451-60.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. and Holash, J. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.
- Yu, H. K., Ahn, J. H., Lee, H. J., Lee, S. K., Hong, S. W., Yoon, Y. and Kim, J. S. (2005). "Expression of human apolipoprotein(a) kringle in colon cancer cells suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and peritoneal dissemination." J Gene Med **7**(1): 39-49.

7 Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom ist für betroffene Patienten mit einer seit Jahrzehnten fast unverändert schlechten Prognose verbunden. Insbesondere für fortgeschrittene Tumorstadien stehen überwiegend palliative Behandlungen zur Verfügung. In den letzten Jahren wurden verschiedene Therapieansätze zur Maglinombehandlung experimentell untersucht und teils in die klinische Anwendung transferiert, die auf eine Beeinflussung der Tumorbiologie abzielen. Die Hemmung der für ein fortschreitendes Tumorstadium wichtigen Tumorgefäßversorgung stellt prinzipiell einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung des HCC dar. Allgemein hängt ein Tumorprogress von einer ausreichenden Versorgung durch Blutgefäße ab. Die Bildung neuer Blutgefäße kann durch die Gabe angiostatischer Faktoren, wie z.B. Angiostatin, inhibiert und der Tumor dadurch in seinem Wachstum gehemmt werden.

Der adenovirale Gentransfer für angiostatisch wirksame Proteine vereint verschiedene Vorteile. Körpereigene Zellen können nach Transduktion die angiostatisch wirksame Substanz selbst herstellen. Da angiostatische Therapien nicht auf den Tumor selbst, sondern auf die Tumorstadien abzielen, ist eine Transduktion des Tumors selbst nicht unbedingt erforderlich. Als effiziente Möglichkeit des Gentransfers haben sich rekombinante Adenoviren erwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene angiostatisch wirksame adenovirale Vektoren herzustellen und zur Behandlung des experimentellen HCC zu nutzen. Dafür wurden aus humanem Gesamtplasminogen (wthPlg) zwei verschiedene Fragmente, die Kringle-Regionen K1-4 und K1-5, gewonnen. Darüber hinaus wurde strangabwärts von K4 und K5 in Wildtyp Plasminogen eine spezifische Restriktionserkennungsstelle für die Endoprotease Furin eingeführt mit dem Ziel, eine enzymatische Abspaltung der Kringle-Regionen auf Proteinebene zu ermöglichen. Die entsprechenden Plasminogenderivate sowie Wildtyp Plasminogen wurden zur Synthese replikationsdefizienter Adenoviren eingesetzt. Die Vektorfunktion wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Die biologische Aktivität der Konstrukte, AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4, AdmuthPlgK5 und AdwthPlg wurde *in vitro* anhand des Tube Formation Assays, Proliferationsassays sowie durch Untersuchung der Apoptoserate und *in vivo* im Matrigel-Assay charakterisiert. Die antitumorale Wirkung der verschiedenen Plasminogenderivate wurde beispielhaft in einem Lungen- und Leberzellkarzinom Modell untersucht. Im

einzelnen konnte gezeigt werden, daß die Plasminogenderivate im Gegensatz zu Wildtypform die Bildung endothelähnlicher Strukturen um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrolle *in vitro* verringerten. Auch die Proliferationsrate von Endothelzellen wurde für AdrhPlgK1-4 um 20 %, für AdrhPlgK1-5 um 37%, für AdmuthPlgK4 um 25 % und für AdmuthPlgK5 um 18 % reduziert. Erwartungsgemäß wurde die Proliferationsrate in Tumorzellen selbst nicht beeinflusst. Deutliche Pro-apoptotische Effekte fanden sich in dieser Arbeit nicht.

Auch *in vivo* konnten für die adenoviralen Vektoren kodierend für die Plasminogenderivate angiostatische Effekte mit einer Reduktion der Gefäßinfiltration in sc.en Matrigel-Kissen um durchschnittlich 65 % nachgewiesen werden. Die antitumorale Wirksamkeit der Plasminogenderivate wurde in zwei verschiedenen Tumormodellen, einem Lungen- und einem Leberzellkarzinom-Modell, überprüft. Insgesamt war die antitumorale Wirksamkeit von AdrhPlgK1-4, AdrhPlgK1-5, AdmuthPlgK4 und AdmuthPlgK5 im HCC-Modell ausgeprägter als im LLC-Modell. Acht Tage nach Behandlungsbeginn war das Tumorwachstum im LLC-Modell um 54% für AdrhPlgK1-4, um 31 % für AdrhPlgK1-5, um 40 % für AdmuthPlgK4 und um 32 % für AdmuthPlgK5 reduziert. Im HCC Modell war das Tumolvolumen 12 Tage nach Behandlungsbeginn um 38 % für AdrhPlgK1-4, um 67 % für AdrhPlgK1-5, um 52 % für AdmuthPlgK4 und um 48 % für AdmuthPlgK5 reduziert. Die Überlebensrate war nur bei den mit AdrhPlgK1-4, -K1-5, AdmuthPlgK4 und -K5 behandelten HCC tragenden Mäusen verlängert. Sie betrug 20,8 Tage für AdrhPlgK1-4, 31,8 Tage für AdrhPlgK1-5, 26,4 Tage für AdmuthPlgK4 und 22 Tage für AdmuthPlgK5. 50 % der mit AdrhPlgK1-5 behandelten Mäuse waren auch mehr als 3 Monate nach Behandlungsbeginn noch tumorfrei. Die antitumorale Wirksamkeit kann wenigstens teilweise durch die verminderte intratumorale Gefäßdichte erklärt werden. In der Histologie konnte gezeigt werden, daß bei Tieren, die mit den Plasminogenderivaten behandelt wurden, die intratumorale Gefäßdichte im in beiden Tumormodellen signifikant reduziert war.

Die hier dargestellten Daten zeigen, daß der adenovirale Gentransfer der Plasminogenderivate rhPlgK1-4, rhPlgK1-5, muthPlgK4 und muthPlgK5 angiostatische und antitumorale Effekte hervorruft und erfolgreich zur Behandlung des experimentellen HCC eingesetzt werden kann. Möglicherweise eröffnet diese Therapieform auch eine potentielle Therapieoption zur Behandlung des HCC am Menschen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Dissertation selbstständig und nur mit den hier angegebenen Hilfsmitteln verfaßt habe. Von mir verwendete Quellen sind als solche gekennzeichnet.

Bonn, den 13. Januar 2006

Lebenslauf

Esther Raskopf, geb. Feuser

geboren am 04.03.1976 in Bonn

verheiratet mit Jörg Raskopf, kaufm. Angestellter

Eltern: Rolf Feuser, Energieanlagenelektroniker, verheiratet mit Gisela Feuser, geb. Schäfer, Industriekauffrau

Geschwister: ein Bruder, Oliver Feuser

Schul- und Hochschulausbildung:

August 1982 bis Juni 1986	Gemeinschaftsgrundschule Kuchenheim
August 1986 bis Juni 1995	städtisches Gymnasium Marienschule Euskirchen
Oktober 1995 bis November 2000	Studium des Fachs Biologie an der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn
April 1998	Vordiplom abgeschlossen
November 1999	Abschluß des mündlichen Teils der Diplom-Biologen-Hauptprüfung
November 1999 bis November 2000	Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie der Universität Bonn Thema: Spezifische Hemmung der sAPP-Sekretion und ihr Effekt auf die Proliferation von Keratinocyten
Januar 2001	Praktikum im Labor für molekulare Therapie an der Uniklinik Bonn, Medizinische Klinik und Poliklinik I
seit Februar 2001	Promotion im Labor für molekulare Therapie Thema: Untersuchungen zur antiangiogenen Wirkung interner Kringleregionen des Vorläuferproteins Plasminogen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>

Tätigkeiten:

1992, 1993, 1994, 1996	Ehrenamtliche Tätigkeit als Betreuerin der Jugendfreizeit „Stadtranderholung“ des Caritas-Verbands Euskirchen
April 2000 bis Dezember 2000	studentische Hilfskraft am Institut für Zellbiologie an der Universität Bonn

seit Februar 2001

wiss. Angestellte an der Uniklinik Bonn,
Medizinische Klinik und Poliklinik I im Labor für
molekulare Therapie

Fort- und Weiterbildung:

September 2002

Fortbildung zum Projektleiter nach § 15 (2) und (4)
des GenTSV

Veröffentlichungen:

Schmitz, V., Tirado-Ledo, L., Tiemann, K., Raskopf, E., Heinicke, T., Ziske, C., Gonzalez-Carmona, M. A., Rabe, C., Wernert, N., Prieto, J., Qian, C., Sauerbruch, T., Caselmann, W. H. (2004): *Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice*; J Hepatol **40**(5): 787-91.

Schmitz, V., Tirado-Ledo, L., Raskopf, E., Rabe, C., Wernert, N., Wang, L., Prieto, J., Qian, C., Sauerbruch, T., Caselmann, W. H. (2005): *Effective antitumour mono- and combination therapy by gene delivery of angiostatin-like molecule and interleukin-12 in a murine hepatoma model*; Int J Colorectal Dis **30**: 30-37.

Raskopf, E., Dzienisowicz, C., Hilbert, T., Rabe, C., Leifeld, L., Wernert, N., Sauerbruch, T., Prieto, J., Qian, C., Caselmann, W. H., Schmitz, V. (2005): *Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model*; Hepatology **41**(6): 1233-1240.

Schmitz, V., Kornek, M., Hilbert, T., Dzienisowicz, C., Raskopf, E., Rabe, C., Sauerbruch, T., Qian, C., Caselmann, W. H. (2005): *Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice*; World J Gastroenterol **11**(28): 4332-6.

Posterbeiträge:

Schmitz V, Tirado L, Heinicke T, Feuser E, Ziske C, Tieman K, Rabe C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Tumordetektion durch hochauflösende Sonografie in einem orthotopen Mausmodell für das hepatozelluläre Karzinom (HCC). 18. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Leipzig, 25. – 26. Januar. Z Gastroenterol **40**:118 (2002).

Schmitz V, Tirado L, Raskopf E, Prieto J, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Intratumoral co-administration of interleukin-12 and angiostatin-like molecule by adenoviral mediated gene transfer in subcutaneously growing hepatocellular carcinoma (HCC) in mice. EASL 37th Annual Meeting, 18 Apr - 21 Apr, Madrid, Spain. J Hepatol 36 (Suppl 1):157 (2002).

Schmitz V, Tirado-Ledo L, Raskopf E, Rabe C, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Local gene transfer for angiostatin-like molecule inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma in mice. Annual Meeting of the American Association for the study of liver diseases, Boston, MA, USA, 1st – 5th Nov 2002. Hepatology 36:386A (2002)

Schmitz V, Tirado-Ledo L, Raskopf E, Rabe C, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Der kombinierte Gentransfer für Angiostatin-ähnliches Molekül und Interleukin-12 ist der Monotherapie in einem sc.en HCC-Modell überlegen. 19. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Berlin, 24. – 25. Januar. Z Gastroenterol : (2003).

Schmitz V, Tirado L, Raskopf E, Rabe C, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Antitumoral efficacy of adenoviral mediated gene transfer of angiostatin-like molecule in subcutaneously growing Hepa129 hepatomas in mice depends on the application modus. EASL 38th Annual Meeting, 3 – 5 Jul, Geneva, Switzerland. J Hepatol 3 (Suppl):214 (2003).

Schmitz V, Raskopf E, Rabe C, Prieto J, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Endostatin und Angiostatin- ähnliches Molekül zur Behandlung des kolorektalen und hepatozellulären Karzinoms im Tumormodell in der Maus. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten, 17. – 20. Sep. 2003, Nürnberg Z Gastroenterol 41:824 (2003).

Schmitz V, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Increased VEGF serum levels after adenoviral mediated gene transfer for a truncated, soluble dominant negative VEGF (AdsFLK-1) receptor in a colorectal carcinoma tumour model in mice. 11th Meeting of the European Society of Gene Therapy, 2004, Edinburgh, UK, J Gene Med (Suppl): (2003).

Schmitz V, Dzienisowicz C, Hilbert T, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Wachstumshemmung sc.er hepatozellulärer Karzinome

mittels systemischen und lokalen Gentransfers für den VEGF Rezeptor Flk-1 im Mausmodell. 20. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Freiburg, Januar. Z Gastroenterol : (2004).

Schmitz V, Dzienisowicz C, Hilbert T, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Antitumor efficacy of the systemic and intratumoral application of an adenovirus encoding a truncated, soluble dominant negative VEGF receptor (AdsFlk-1) in a hepatocellular carcinoma (HCC) tumor model in mice. IASL Meeting, Bahia, Brazil. (2004)

Schmitz V, Dzienisowicz C, Hilbert T, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Sauerbruch T, Caselmann WH. The systemic blockade of the VEGF receptor Flk-1/KDR by an adenovirus encoding a dominant negative receptor fragment is more effective than the intratumoral vector application in a hepatocellular carcinoma (HCC) tumor model in mice. EASL 39th Annual Meeting, 14 – 18 Apr, Berlin, Germany. J Hepatol 40 (Suppl): 108 (2004).

Strehl J, Raskopf E, Tirado Ledo L, Rabe C, Qian C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I, Caselmann WH, Schmitz V. Partieller Antagonismus angiostatischer und immunmodulatorischer Kombinations-therapien im experimentellen, murinen Tumormodell für das hepatozelluläre Karzinom? 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten, 1.-4. Sep. 2004, Leipzig. Z Gastroenterol 42:890 (2004).

Schmitz V, Kornek M, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Rabe C, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Wachstumshemmung sc.er kolorektaler Karzinome mittels systemischen Gentransfers für den VEGF Rezeptor 1 (Flt1-3) im Mausmodell. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs und Stoffwechselkrankheiten, 1.-4. Sep. 2004, Leipzig. Z Gastroenterol 42:877 (2004).

Raskopf E, Dzienisowicz C, Hilbert C, Leifeld L, Rabe C, Prieto J, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH, Schmitz V. VEGF inhibition retards tumour growth and development of malignant ascites in orthotopic murine hepatocellular carcinomas. EASL 40th Annual Meeting, 13 – 17 Apr, Paris, France. J Hepatol 42 (Suppl 2): 140 (2005).

Schmitz V, Raskopf E, Gonzalez-Carmona MA, Rabe C, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Gene delivery of engineered plasminogen encoding angiostatic

kringles inhibits tumour growth of murine hepatomas. EASL 40th Annual Meeting, 13 – 17 Apr, Paris, France. J Hepatol 42 (Suppl 2): 141 (2005).

Gonzalez-Carmona MA, Timmermann A, Shabani S, Raskopf E, Schneider C, Schmidt-Wolf I, Caselmann WH, Sauerbruch T, Schmitz V. Transduction of dendritic cells with CD40-Ligand recombinant adenovirus enhances the stimulatory capacity of immunologic effector cells against HCC cells in vitro. EASL 40th Annual Meeting, 13 – 17 Apr, Paris, France. J Hepatol 42 (Suppl 2): 138 (2005).

Strehl J, Raskopf E, Rabe C, Qian C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I, Caselmann WH, Schmitz V. Angiostatic and immunomodulatory combination therapy in an experimental murine hepatoma model. EASL 40th Annual Meeting, 13 – 17 Apr, Paris, France. J Hepatol 42 (Suppl 2): 142 (2005).