

**Klonierung, Amplifikation und Charakterisierung eines rekombinanten  
adenoviralen Vektors zur Transduktion muriner dendritischer Zellen für die  
AFP-spezifische Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Carlo Paul Julius Schneider  
aus Neuss

2009

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang H. Caselmann

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.03.2009

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Tilman Sauerbruch

# 1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis .....	3
2.	Abkürzungsverzeichnis .....	5
3.	Einleitung .....	8
3.1.	Das hepatozelluläre Karzinom .....	8
3.1.1	Epidemiologie .....	8
3.1.2	Ätiologie .....	8
3.1.3	Pathogenese .....	9
3.1.4	Therapie und Prognose .....	10
3.2.	Alpha-Fetoprotein .....	11
3.3.	Immunologische Therapieansätze für das HCC .....	13
3.3.1	Unspezifische immunologische Therapieansätze .....	14
3.3.2	Antigenspezifische immunologische Therapieansätze .....	15
3.3.3	AFP-spezifische immunologische Therapieansätze .....	16
3.4.	Dendritische Zellen .....	17
3.5.	Adenovirale Vektoren .....	19
3.5.1	Adenoviren .....	19
3.5.2	Adenovirale Vektoren .....	21
3.5.3	Das AdEasy-System .....	22
3.6.	Zielsetzung .....	24
4.	Material .....	25
4.1.	Plasmide und Vektoren .....	25
4.2.	Eukaryontische Zelllinien .....	27
4.3.	Bakterienstämme .....	28
4.4.	Mausstamm .....	28
4.5.	Oligonukleotide .....	28
4.6.	Proteine .....	29
4.6.1	Enzyme .....	29
4.6.2	Antikörper .....	30
4.6.3	Zytokine .....	31
4.7.	Kits .....	31
4.8.	Reagenzien .....	31
4.8.1	Materialien für die Molekularbiologie .....	31
4.8.2	Materialien für die Proteinbiochemie .....	32
4.8.3	Materialien für die Zellbiologie .....	32
4.8.4	Sonstige Reagenzien .....	33
4.9.	Lösungen, Medien, Puffer und Gele .....	33
4.9.1	Molekularbiologie und Zellkultur .....	33
4.9.2	Proteinbiochemie .....	37
4.9.3	Polyacrylamidgele für die Proteingelektrophorese .....	38
4.10.	Verbrauchsmaterialien .....	39
4.11.	Geräte .....	40
5.	Methoden .....	42
5.1.	Molekularbiologische Methoden .....	42
5.1.1	Allgemeine Methoden .....	42
5.1.2	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation .....	43
5.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterien .....	45
5.1.4	Photometrische Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen .....	47
5.1.5	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	48
5.1.6	Ligation von DNA .....	49

5.1.7	DNA-Sequenzierung .....	52
5.1.8	Homologe Rekombination von Backbone und Transferplasmid in <i>E. Coli</i> .....	52
5.1.9	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	55
5.2.	Proteinbiochemie.....	58
5.2.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung.....	58
5.2.2	Auftrennung von Proteinen und Nachweis von mAFP mittels Western Blot.....	58
5.3.	Zellbiologie .....	60
5.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	60
5.3.2	Transfektion eukaryonter Zellen mittels Lipofektion .....	61
5.3.3	Amplifikation adenoviraler Vektoren .....	62
5.3.4	Aufreinigung adenoviraler Vektoren .....	64
5.3.5	Titration adenoviraler Vektoren .....	65
5.3.6	Transduktion von A549-Zellen mit adenoviralen Vektoren .....	66
5.3.7	Isolation und Ausreifung muriner dendritischer Zellen .....	67
5.3.8	Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren.....	69
5.4.	Durchflußzytometrie .....	70
5.5.	Statistik.....	71
6.	Ergebnisse .....	72
6.1.	Herstellung adenoviraler Vektoren .....	72
6.1.1	Herstellung eines mAFP kodierenden Transfervektors.....	72
6.1.2	Homologe Rekombination von Transfervektoren mit pAdEasy1 .....	76
6.1.3	Transfektion von 911-Zellen mit pAdmAFP und pAdGFP .....	78
6.1.4	Amplifikation und Aufreinigung der adenoviralen Vektoren .....	79
6.2.	Transduktion eukaryontischer Zelllinien mit adenoviralen Vektoren.....	80
6.2.1	Nachweis der mAFP-mRNA in mit AdmAFP transduzierten A549-Zellen.....	81
6.2.2	Nachweis von mAFP in mit AdmAFP transduzierten A549-Zellen.....	82
6.3.	Generierung von murinen dendritischen Zellen.....	83
6.4.	Transduktion muriner dendritischer Zellen mit AdGFP .....	85
6.5.	Transduktion muriner dendritischen Zellen mit AdmAFP.....	88
7.	Diskussion .....	90
7.1.	Herstellung adenoviraler Vektoren .....	91
7.2.	Herstellung muriner dendritischer Zellen .....	94
7.3.	Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren.....	95
7.4.	Immunologische Effekte .....	97
7.4.1	Einfluß adenoviraler Vektoren auf dendritische Zellen .....	97
7.4.2	Einfluß von AdmAFP und AFP auf dendritische Zellen .....	98
7.5.	Ist AFP immunsuppressiv?.....	99
7.6.	Ausblick .....	100
8.	Zusammenfassung.....	101
9.	Literaturverzeichnis.....	103
10.	Danksagungen .....	118

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Ad	adenoviraler Vektor
AFP	Alpha-Fetoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDTA	Cyclohexandiamin-(1,2)-tetraessigsäure
CMV	Cytomegalievirus
DC	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> ) oder <i>detergent compatible</i>
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
FACS	<i>flourescence activatet cell sorting</i> hier i.d.R. synonym für Durchflußzytometrie
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GFP	<i>green flourescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
HBV	<i>Hepatitis B-Virus</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	<i>Hepatitis C-Virus</i>
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>

HS	Pferdeserum ( <i>horse serum</i> )
Il-4	Interleukin 4
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetically activated cell sorting</i>
mAFP	murines Alpha-Fetoprotein
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mGM-CSF	<i>murine granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mIl-4	murines Interleukin 4
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBS++	PBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>
PBST	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PFU	<i>plaque forming unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkriptase
rt-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA

TNF- $\alpha$       Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$   
U              *unit*

## **3. Einleitung**

### **3.1. Das hepatozelluläre Karzinom**

#### **3.1.1 Epidemiologie**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen mit etwa 400 000 Neuerkrankungen und fast ebenso vielen Todesfällen pro Jahr (Kew 2002). Es ist der fünfthäufigste Tumor und die vierthäufigste Krebstodesursache, wobei über die Hälfte der HCC-bezogenen Todesfälle in Ostasien auftreten. Männer sind im Vergleich fast zweieinhalbmal häufiger betroffen als Frauen (Parkin et al. 2005, WHO 2003).

Die Inzidenzen betragen durchschnittlich etwa 4,9 Erkrankungen auf 100 000 Einwohner für Frauen und 14,7 für Männer und differieren regional erheblich, so liegen die Inzidenzen für Männer in Ostasien bei bis zu 49 und in einigen afrikanischen Staaten bei bis zu 38 Fällen auf 100 000 Einwohner (El-Serag und Rudolph 2007). Die hohen Erkrankungsraten in Afrika und Asien korrelieren regional mit den Risikofaktoren der chronischen infektiösen Hepatitis und der Exposition gegenüber Aflatoxinen. In den westlichen Industriestaaten hingegen liegen die Inzidenzen deutlich unter dem weltweiten Durchschnitt, steigen in den letzten Jahrzehnten jedoch an. Diese Entwicklung wird mit der zunehmenden Verbreitung des Hepatitis C-Virus in Europa und Nordamerika in Verbindung gebracht (El-Serag und Rudolph 2007, Jepsen et al. 2007). In Europa werden etwa 30 000 Todesfälle aufgrund eines HCC pro Jahr verzeichnet, wobei zwei Drittel davon auf Männer entfallen (Bray et.al. 2003). In Deutschland lassen sich ausgehend von Daten aus Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen 5,7 Erkrankungsfälle bei Männern und 2 Erkrankungsfälle bei Frauen pro Jahr und 100 000 Einwohner schätzen. Die Erkrankungszahlen haben sich in den letzten 30 Jahren deutlich erhöht, so lag die Inzidenz bei Männern im Jahre 1976 bei nur 3,6 (Schurr et al. 2006).

#### **3.1.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des HCC ist heterogen und umfaßt angeborene und erworbene Hepatopathien. Infektionen, chronische Exposition gegenüber Toxinen, angeborene oder erworbene Stoffwechselerkrankungen und autoimmune Lebererkrankungen können durch das Auftreten eines HCC kompliziert werden. Als Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen und wichtiges pathogenetisches Prinzip in der Entwicklung eines HCC läßt sich die Zirrhose identifizieren.

Etwa 75% aller HCC sind mit einer Zirrhose assoziiert. Diese wird als präkanzeröse Läsion aufgefaßt, wobei die makronodulären Formen besonders häufig mit einem HCC einhergehen (El-Serag und Rudolph 2007, Dürr und Caselmann 2000, Thung und Gerber 1997). Darüber hinaus wird das Risiko der Entstehung eines HCC auf dem Boden einer Zirrhose von deren Ursache maßgeblich beeinflusst. Die chronischen Hepatitis B- und Hepatitis C-Virusinfektion gehen mit einem besonders hohen Risiko einher und sind mit bis zu 75% aller HCC weltweit assoziiert (Sun et al. 2003, Caselmann und Alt 1996, Beasley et al. 1981). Ferner stellen die viralen Hepatitiden einen unabhängigen Risikofaktor dar, da die Zirrhose für die Entstehung des HCC nicht obligat ist und in etwa 25% der Fälle fehlt (El-Refaie et al. 1996, Shiratoti et al. 1995). Co-Infektionen mit HBV und HCV erhöhen das Risiko überadditiv (Shi et al. 2005, Donato et al. 1998). Aufgrund der weiten Verbreitung des Hepatitis B-Virus in Asien führten Impfkampagnen gegen HBV folgerichtig zu deutlichen Rückgängen der dortigen Inzidenzen (Chang et al. 1997). Alkohol ist als hepatotoxische Substanz zirrroseinduzierend und somit ebenfalls verantwortlich für eine große Anzahl von HCC. Einen zirrroseunabhängigen Risikofaktor stellt Alkoholabusus jedoch nicht dar, auch wenn es additiv die HCC-Inzidenz in chronisch HBV- und HCV-infizierten Kohorten erhöht (Fattovich et al. 2004). Die chronische Ingestion von Aflatoxinen durch verschimmelte Nahrungsmittel spielt insbesondere in Afrika und Asien aufgrund der klimatischen Verhältnisse eine Rolle in der Entwicklung von HCC. Zudem scheinen die Aflatoxine als Leberkarzinogen besonders wirksam in HBV-infizierten Menschen zu sein (Henry et al. 2002, Wogan 1997). Prävalenzbedingt sind die Stoffwechselerkrankungen und die autoimmunen Hepatopathien zahlenmäßig von geringerer Bedeutung. Die Hämochromatose und der  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel sind unabhängige Risikofaktoren für ein HCC, ebenso die Primär Biliäre Zirrhose (Fattovich et al. 2004, Deugnier und Turlin 1997). In den letzten Jahren beobachtet man einen Anstieg der auf dem Boden einer Fetthepatitis im Rahmen eines Diabetes Mellitus entstehenden hepatozellulären Karzinome (El-Serag et al. 2006, Regimbeau et al. 2004).

### **3.1.3 Pathogenese**

Die Pathomechanismen der malignen Transformation von Lebergewebe sind heterogen und im Einzelnen nicht umfassend aufgeklärt. Unabhängig von der Ätiologie scheint die chronische Inflammation mit erhöhtem Zellumsatz im Rahmen der Leberzirrhose zu einer Akkumulation von Genmutationen zu führen. In deren Folge kommt es zu Störungen der Differenzierung, der Zellzykluskontrolle, der Wachstumsinhibition und der Apoptoseinduktion (El-Serag und Rudolph 2007). Zusätzlich zur Induktion und

Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktionen tragen Hepatitis B- und C-Viren zusätzlich zur Karzinogenese bei (El-Serag und Rudolph 2007). Das Hepatitis B-Virus verursacht Mutationen durch Insertion seines Genoms in das Wirtsgenom. Zusätzlich aktivieren seine Genprodukte HBx und PreS2 über Signalkaskaden diverse Transkriptionfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 und greifen damit in die Regulation von Zellwachstum und Apoptose ein (Lupberger und Hildt 2007, Caselmann et al. 1990). Das Hepatitis C-Virus integriert nicht in das Wirtsgenom, aber seine Genprodukte werden mit transformierenden Eigenschaften über die Interaktion mit verschiedenen Signalkaskaden sowie mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Levrero 2006, Jüngst et al. 2004).

### 3.1.4 Therapie und Prognose

Die Prognose des hepatozellulären Karzinoms ist schlecht. Unbehandelte Kollektive erzielten in der Vergangenheit mediane Überlebenszeiten von unter 2 Monaten ab Diagnosestellung (Okuda et al. 1985, Primack et al. 1975). Auch heute geht die Diagnose noch mit einer ernsten Prognose einher. Ausgehend von der *Barcelona-Clinic-Liver-Cancer* (BCLC)-Einteilung werden unter Therapie 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 70% im Frühstadium, 3-Jahres-Überlebensraten von bis zu 40% im Zwischen- und fortgeschrittenen Stadium, sowie 1-Jahres-Überlebensraten von 10% im Endstadium unterschieden (Bruix et al. 2005, Rabe et al. 2003, Rabe et al. 2001). Angesichts der in der Regel späten Diagnosestellung liegt heute die Gesamtüberlebensrate trotz Therapie immer noch unter 10% auf fünf Jahre (Llovet et al. 2003).

Die verbesserten Überlebensraten im Frühstadium werden durch die chirurgischen Methoden der Resektion und der Transplantation erreicht. Diese kurativen Ansätze werden durch zugrundeliegende Zirrhosen, multilokuläres Auftreten der Tumore, die schnelle Progression des HCC und nicht zuletzt durch die knappe Organverfügbarkeit in ihrer Anwendbarkeit und ihrem Erfolg eingeschränkt (Trojan et al. 2007). Die Verbesserung der Überlebensrate im fortgeschrittenen Stadium wurden durch lokale ablativ Verfahren wie die Radiofrequenzablation und die perkutane Ethanolinjektion erreicht (Bruix et al. 2005). Als gangbarer Ansatz mit deutlicher Verbesserung der Überlebensrate hat sich die Transarterielle Chemoembolisation (TACE) erwiesen, jedoch limitiert die dafür notwendige Rest-Leberfunktion die Anwendbarkeit auf Patienten mit *Child-Pugh-Stadium A* (Takayasu et al. 2006). Systemische zytostatische Therapien zeigen nur geringe Effekte und sind ebenfalls durch die eingeschränkte Leberfunktion bei zugrundeliegender Zirrhose mit hoher Toxizität belastet (Bruix et al. 2005). In jüngster Zeit wurde eine Verlängerung des progressionsfreien

Überlebens unter Therapie mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib berichtet (Llovet et al. 2008). Sorafenib wirkt angiostatisch und wachstumshemmend. Derartige auf molekulare Zielstrukturen gerichtete Therapieansätze sind vielversprechend, auch wenn bislang nur in wenigen Fällen eine Regression des Tumors beobachtet werden kann.

### **3.2. Alpha-Fetoprotein**

Alpha-Fetoprotein (AFP) wurde erstmals 1956 elektrophoretisch in humanem fetalem Serum nachgewiesen, jedoch blieben Struktur und Funktion zunächst unklar (Bergstrand und Czar 1956). Anfang der sechziger Jahre wurde ein Antigen beschrieben, welches von murinen Lebertumoren sezerniert wurde, in Serum und Gewebe von gesunden Mäusen jedoch nicht vorkam. Zeitgleich wurde im Rahmen von Studien zur murinen embryonalen Leberentwicklung ein Antigen entdeckt, welches in adulten Lebern nicht exprimiert wurde. Schnell zeigte sich, daß beide Antigene identisch waren und in embryonalem Serum, in Gegenwart von Lebertumoren und während der Leberregeneration bei Mäusen nachweisbar waren (Abelev et al. 1963). Im weiteren Verlauf wurde AFP im Serum von HCC-Patienten nachgewiesen und als Tumormarker für das HCC und andere Tumore etabliert.

AFP ist ein Glykoprotein mit einer einzelnen Oligosaccharidgruppe, welche etwa 4% des Molekulargewichts ausmacht. Es besteht aus 590 Aminosäuren und hat ein Gewicht von etwa 69 Kilodalton. AFP ähnelt Serumalbumin in Struktur und Basensequenz und besteht aus einer einzelnen Kette mit drei Domänen. Es zeigt Affinität zu verschiedenen Liganden, insbesondere zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Östrogenen. Eine Transportfunktion erscheint wahrscheinlich (Deutsch 1991). Trotz der Ähnlichkeit zu Serumalbumin zeigen sich für die nativen Proteine keine immunologischen Kreuzreaktionen (Ruoslahti und Seppälä 1979). Das hochkonservierte Gen für AFP liegt beim Menschen auf Chromosom 4 und bei der Maus auf Chromosom 5. Wie Serumalbumin gehört es zur Albumingenfamilie. Es umfaßt etwa 19,5 Kilobasenpaare und verfügt über 15 Exons und 14 Introns. Das AFP-Gen zeigt hohe Sequenzhomologien zum Serumalbumin-Gen. Die c-DNA von AFP ist etwa 2,1 Kilobasenpaare lang (Gibbs et al. 1987, Kioussis et al. 1981).

AFP wird während der Embryonalentwicklung in hohen Konzentrationen im Dottersack exprimiert und bildet die größte Entität der embryonalen Serumproteine. Während der

Fetalentwicklung wird AFP hauptsächlich von der Leber sezerniert, während mit zunehmendem Alter des Fetus der Serumalbumingehalt des Blutes steigt. Im Serum von neugeborenen Mäusen beträgt die AFP-Konzentration noch mehr als 2 mg/ml, beim Menschen hingegen lediglich 0,1 mg/ml. Postnatal fällt die Serumkonzentration bei Mäusen schnell innerhalb weniger Wochen auf die adulten Werte von ungefähr 200 ng/ml. Beim erwachsenen Menschen betragen die basalen AFP-Konzentrationen unter 5 ng/ml, werden aber erst im Laufe von Monaten nach der Geburt erreicht. Anstiege der AFP-Konzentrationen im Serum sind bei der Leberzirrhose und in der Folge von nekrotischem Leberzelluntergang im Rahmen der Leberregeneration zu beobachten (Abelev und Elgort 1982).

Abgesehen von Leberschäden ist eine Reihe von Tumoren mit erhöhten Serumspiegeln von Alpha-Fetoprotein assoziiert. Embryonale Karzinome, Keimzelltumore von Hoden und Ovar, Dottersacktumore, Hepatoblastome und hepatozelluläre Karzinome exprimieren in unterschiedlichen Ausmaßen AFP (Ruoslahti und Seppälä 1979). Für das hepatozelluläre Karzinom werden AFP-Serumspiegel zur Differentialdiagnose bei Leberraumforderungen herangezogen, als Verlaufparameter genutzt und in Risikogruppen zur Früherkennung eingesetzt. Die Sensitivität und Spezifität der AFP-Serumspiegel zur Früherkennung des HCC sind allerdings ohne die Kombination mit bildgebenden Verfahren wie dem Ultraschall zu gering, um als alleinige Screeningmaßnahme empfohlen zu werden (Bruix et al. 2005). Dies ist erklärbar durch die Beobachtung von erhöhten Serumspiegeln von AFP im Rahmen von Zirrhosen, Hepatitiden und anderen benignen Leberschäden sowie aufgrund der Tatsache, daß ein Teil der HCC, z.B. aufgrund geringer Tumorgroße oder geringer Expressionsrate oder gar fehlender Expression, die Serumspiegel von AFP nicht wirksam erhöht (Colombo 1997).

Etwa 70% der hepatozellulären Karzinome gehen mit erhöhten Serumspiegeln von AFP einher, allerdings wird der Anteil histopathologisch AFP-exprimierender Tumore widersprüchlich beurteilt. Während einige Autoren feststellen, daß AFP immunhistochemisch in einer geringen Anzahl von HCC zu beobachten ist und sich dabei eine umgekehrte Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Expression von AFP zeigt (Ma et al 1993, Brumm et al. 1989, Ganjei et al. 1988), kommen andere Autoren zu gegenteiligen immunhistologischen Befunden und erkennen keine Korrelation zwischen Differenzierung und AFP-Nachweis (Yap und Peh 1991, Kojiro et al. 1981). Molekularbiologische Untersuchungen zeigen, daß in einem Großteil der HCC mRNA von AFP detektierbar ist, daß in diesen Fällen die Expression der mRNA von AFP stark erhöht ist im Gegensatz zum

umliegenden Gewebe und daß sich die Expression von AFP auf isolierte Bereiche innerhalb der Tumore beschränkt (Ohguchi et al. 1998, Niwa et al. 1996, Peng et al. 1993). Letzteres könnte die inkonsistenten immunhistochemischen Befunde erklären. Sicher scheint allerdings zu sein, daß AFP in vielen, aber nicht allen HCC detektierbar ist, und daß die Expression von AFP im hepatozellulären Karzinom lokal heterogen verteilt ist.

### **3.3. Immunologische Therapieansätze für das HCC**

Die kurativen Ansätze in der Behandlung des HCC sind die Resektion und die Transplantation. Die Resektion ist auf das Patientenkollektiv beschränkt, welches im Frühstadium der Erkrankung diagnostiziert wird und über eine ausreichende Leberfunktion verfügt, um funktionell resektabel zu sein. Die Transplantation ist durch die Organknappheit limitiert. Der Erfolg beider Behandlungsansätze ist durch lokale oder systemische Rezidive bedroht. Angesichts der ernsten Prognose des HCC sind Therapieansätze notwendig, welche bei geringer systemischer Toxizität adjuvant zum chirurgischen Vorgehen oder zu regional ablativen Verfahren die Rezidivraten senken und das Langzeitüberleben verbessern. Ferner sind selbstverständlich auch Therapien wünschenswert, welche selbst bei hoher oder disseminierter Tumorlast, die sich den chirurgischen Maßnahmen entzieht, eine deutliche Prognoseverbesserung oder gar Heilung herbeiführen könnte.

Ein grundsätzliches Charakteristikum von Tumoren im Allgemeinen und dem HCC im Besonderen ist die Tatsache, daß sie der Detektion durch das Immunsystem entgehen, obwohl sie aufgrund von Mutationen, Re- und Überexpression eine Vielzahl von tumorspezifischen Antigenen tragen. Nicht nur ubiquitäre Escape-Mechanismen scheinen dafür verantwortlich zu sein, wie z.B. die Herunterregulation antigenpräsentierender MHC-Moleküle, die fehlende Expression stimulatorischer Signale oder die parakrine Toleranzinduktion mittels TGF- $\beta$  (Dunn et al. 2004), sondern auch die Besonderheiten des immunologisch privilegierten Lebergewebes, welches in der Lage ist, Toleranz gegenüber Tumorantigenen zu induzieren (Berg et al. 2006, Knolle und Limmer 2003). Trotzdem sind, wie auch für andere Tumore, partielle und komplette Spontanremissionen von hepatozellulären Karzinomen in vielen Fällen beschrieben worden (Lin et al. 2004, Stoelben et al. 1998). Angesichts dieser Berichte scheint die Durchbrechung der Immuntoleranz gegenüber maligne transformierten Hepatozyten spontan vorzukommen und *quoad vitam* erfolgreich zu sein. Die iatrogene

Herbeiführung einer tumorspezifischen Immunabwehr könnte daher eine vielversprechende Therapiestrategie sein. Selbst wenn sie nicht zur Ablation größerer Tumore geeignet sein sollte, so könnte sie doch die Rezidivrate nach Resektionen senken. Vielfältige Anstrengungen in dieser Hinsicht sind daher auch für das HCC in der Vergangenheit unternommen worden.

Unterschiedliche Strategien wurden dazu verfolgt. Es wurden, im weitesten Sinne antigenunspezifische, Manipulationen des Immunsystems versucht, welche zum Ziel hatten, durch eine allgemeine Stimulation des Immunsystems am bzw. im Tumor die Toleranz zu durchbrechen oder die Prozessierung und Präsentation von Antigenen zu erhöhen. In klinischen Studien wurden, zum Teil in Kombination mit Chemotherapie, verschiedene Cytokine (INF- $\gamma$  + IL-2; INF- $\gamma$  + GM-CSF; IL-12; INF- $\alpha$ ) auf unterschiedlichem Wege verabreicht. Einige der Studien zeigten ein teilweises Ansprechen auf die Therapie (Sangro et al. 2004, Reinisch et al. 2002, Stuart et al. 1996, Lygidakis et al. 1995; Lotz et al. 1994). Ferner wurden Lymphozyten aus der Milz, dem peripheren Blut und aus dem Tumor *ex vivo* expandiert und reinfundiert, allerdings mit inkonsistenten Ergebnissen (Shi et al. 2004, Takayama et al. 2000, Wang et al 1997, Kawata et al 1995).

### **3.3.1 Unspezifische immunologische Therapieansätze**

In zwei randomisierten prospektiven Studien wurden Patienten mit HCC nach kurativer Resektion Tumorlysate, welche mit GM-CSF, IL-2 und BCG vermischt waren, intradermal appliziert. Die Behandlung zeigte einen signifikanten Anstieg der CD8-positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut und führte zu deutlichen Verbesserungen der Rezidiv- bzw. Überlebensraten (Peng et al. 2005, Kuang et al. 2004). Da durch die Selektion der Patienten eine Resektion in kurativer Absicht möglich war und die Tumorlast chirurgisch entsprechend reduziert werden konnte, ist ein Vergleich mit anderen Studien schwer. Die Rationale hinter der Gabe von GM-CSF ist die verstärkte Attraktion von antigenpräsentierenden Zellen, welche zu einer Expansion antigenspezifischer, reaktiver T-Zellen führen soll. In verschiedenen Studien war die Gabe von *ex vivo* expandierten dendritischen Zellen überprüft worden, welche auf unterschiedliche Weise behandelt worden waren. Dabei zeigte sich bei 31 Patienten, daß die fünfmalige wöchentliche Gabe von mit Tumorlysat gepulsten dendritischen Zellen das Überleben verlängerte (Lee et al. 2005). Andere Studien zeigten (unter anderen Bedingungen), abgesehen von immunologischen Effekten, keine signifikante Verbesserung der Überlebensraten. Dies war unabhängig davon, ob die dendritischen Zellen mit Tumorlysat gepulst waren (Iwashita et al. 2003), Interleukin-12 exprimierten und intratumoral injiziert

worden waren (Mazzolini et al. 2005) oder adjuvant zu Radio- oder transarterieller Chemotherapie intratumoral appliziert worden waren (Nakamoto et al. 2007, Chi et al. 2005). Diesen auf antigenpräsentierenden Zellen beruhenden Studien war gemein, daß ihnen kein spezifisches Antigen zum Ziel der Präsentation und Toleranzdurchbrechung zu Eigen war.

### **3.3.2 Antigen-spezifische immunologische Therapieansätze**

Antigen-spezifische immuntherapeutische Strategien beim HCC sind bereits seit vielen Jahren beforscht worden. Durch die selektive Durchbrechung der Immuntoleranz gegen einzelne oder eine Gruppe von HCC-spezifischen Antigenen könnte die Effektivität von immuntherapeutischen Strategien erhöht und die Toxizität durch Reduzierung von Autoimmuneffekten gegenüber gesundem Gewebe reduziert werden. Die bisherigen Erfahrungen zeigen zwar grundsätzlich eine geringe Rate von unerwünschten Wirkungen, doch war auch gleichzeitig die Wirkung von z.T. geringem Ausmaß und die Patientenzahlen eher klein. Eine Vielzahl von Antigenen steht dabei grundsätzlich als Kandidat zur Verfügung. Neben AFP kommen auch das HbsAg sowie das karzinoembryonale Antigen, sowie eine Vielzahl von HCC-spezifischen Antigenen in Betracht. In jüngerer Zeit wurde eine Reihe von sogenannten *Cancer/Testis* Antigenen beschrieben, wie etwa NY-ESO und Produkte der MAGE-A Genfamilie (Xiao und Chen 2004). Diesen Antigenen ist gemein, daß sie sich sowohl in Hodengewebe, als auch in maligne transformierten Gewebe nachweisen lassen, so auch im HCC, aber nicht in sonstigem gesundem Gewebe (Zhao et al. 2004). Vielfältige Versuche wurden unternommen, durch monoklonale Antikörper gegen HCC-eigene Antigene tumorspezifische Wirkungen zu erzielen. Antikörpervermittelte Zytotoxizität oder die Kopplung an radioaktive Substanzen und Zytostatika wurden versucht, scheiterten jedoch. Eine mögliche Ursache wird in den hohen Serumspiegeln der Antigene gesehen, welche dazu führten, daß nur geringe Mengen ungebundener Antikörper den Tumor erreichten (Shouval 1997).

Trotz der beobachteten Immuntoleranz lassen sich in HCC-Patienten Tumorantigen-spezifische Effektorzellen nachweisen (Bricard et al. 2005, Hanke et al. 2002b). Dies ist eine grundlegende Bedingung für zellvermittelte antigen-spezifische Strategien. Selbstreaktive Lymphozyten werden im Laufe der Ausreifung in der Regel deletiert. Mittelgradig affine Effektorzellen können jedoch grundsätzlich der Aussonderung entgehen und lediglich in Anergie bzw. Toleranz versetzt werden. Diese lassen sich unter Umständen durch entsprechende Signale reaktivieren und als Effektorzellen gegen das Tumorantigen nutzen (Janeway et al. 2001).

### 3.3.3 AFP-spezifische immunologische Therapieansätze

Auch AFP-spezifische Effektorzellen wurden in Patienten nachgewiesen. Der Nachweis einer humoralen Immunreaktion auf AFP in HCC Patienten wurde durch die Isolierung AFP-spezifischer Immunglobuline erbracht (Bei et al. 1999). Butterfield et al. (1999) identifizierten MHC-restringierte Epitope des AFP welche *in vitro* von T-Zellen erkannt wurden. Unserer Arbeitsgruppe gelang es erstmals, CD4- und CD8-positive AFP-reaktive T-Zellen in HCC-Patienten nachzuweisen (Hanke et. al. 2002b). Diese Daten wurden daraufhin mehrfach reproduziert (Mikuzoshi et al. 2006, Alisa et al. 2005).

Es gelang zwar, bei HCC-Patienten durch Impfungen von mit Adjuvantien versehenen AFP-Peptiden eine erhöhte Frequenz AFP-spezifischer und reaktiver T-Zellen zu erzielen, ein klinischer Effekt blieb jedoch aus (Butterfield et al. 2003). *In vitro* Daten und nicht zuletzt die Studie von Lee et al. (2005 s.o.) suggerierten eine möglicherweise höhere Effektivität durch eine Impfung mit dendritischen Zellen, welche gezielt AFP-Fragmente präsentieren sollten, mit denen sie zuvor gepulst worden waren.

Eine klinische Studie (Phase I/II) mit AFP-Peptid-gepulsten dendritischen Zellen zeigte die gute Verträglichkeit der Anwendung, führte aber nicht zu signifikanten klinischen Verbesserungen (Butterfield et al. 2006). Dies könnte, auch im Gegensatz zu den Daten von Peng et al. (2005 s.o.) und Kuang et al. (2004 s.o.), darin begründet liegen, daß die Tumorlast der fortgeschritten erkrankten und z.T. mehrfach vorbehandelten Patienten sehr groß war. Deutlich wurde allerdings, daß sich die Zahl AFP-spezifischer und reaktiver T-Zellen erhöhte. Um die AFP-spezifische Vakzinierungsstrategie mittels antigenpräsentierender Zellen weiter zu eskalieren, würde als nächster Schritt die Applikation von adenoviral transduzierten dendritischen Zellen folgen. Mehrfach konnte gezeigt werden, daß dendritische Zellen, welche aufgrund von AFP-rekombinanten adenoviralen Vektoren AFP exprimieren, *in vitro* sehr potente Effektoren induzieren (Butterfield 1999). Unserer Arbeitsgruppe gelang dies erstmals mit dendritischen Zellen und Lymphozyten, welche aus HCC-Patienten gewonnen worden waren (González-Carmona et al. 2006).

Im Zusammenhang mit der letzten Studie an HCC-Patienten durch Butterfield et al. (2006) wurden Daten erhoben, welche andeuten, daß die Zahl reaktiver AFP-spezifischer CD4-Zellen in HCC-Patienten reduziert ist. Ferner scheint zwar die Anzahl von AFP-spezifischen CD8-Zellen erhöht zu sein, diese sind aber offenbar anerg (Butterfield et al. 2007). *In vitro* ließen sich die ohnehin reduzierten CD4-Zellen der HCC-Patienten durch gepulste

dendritische Zellen signifikant schlechter stimulieren, als durch die adenoviral transduzierten dendritischen Zellen (Evdokimova et al. 2007).

Auch wenn die klinischen AFP-basierten Studien eine gute Verträglichkeit zeigten, so gibt es doch tierexperimentelle Hinweise auf eine AFP-spezifische Autoimmunhepatitis. Folgerichtig wurde diese Hepatitis nur beobachtet, wenn nach Schädigung der Leber die AFP-Expression anstieg (Geissler et al. 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Beobachtungen jedoch nicht reproduzieren, tumorprotektive AFP-Vakzinierungen zeigten keinen Einfluß auf die Leberregeneration (Hanke et al. 2002a).

### **3.4. Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen (DC) wurden erstmals 1869 von Langerhans in der Haut beschrieben und gerieten dann für lange Zeit in Vergessenheit. Erst in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden sie von Steinmann in lymphatischem Gewebe wiederentdeckt und mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht (Steinman und Cohn 1973). Seitdem wurden sie ausführlichst beforscht. Dendritische Zellen gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Sie filtern Antigene aus ihrer Umgebung, prozessieren diese und sind in der Lage, sie in MHC-Kontext zu präsentieren. Dabei ist es ihnen möglich, durch die Bereitstellung kostimulatorischer Signale in der Interaktion mit CD4- und CD8- positiven T-Zellen eine adaptive Immunantwort zu induzieren (Janeway et al. 2001). Dabei wird zwischen unreifen dendritischen Zellen unterschieden, welche sich bevorzugt in der Körperperipherie aufhalten, und reifen dendritischen Zellen, welche sich in lymphatischen Organen konzentrieren. Unreife DC können hocheffektiv Antigene aufnehmen und auf Gefahrensignale, wie z.B. bakterielle Strukturbestandteile, virale Erbsubstanz oder Zytokine, mit einer Ausreifung reagieren. Diese Signale werden z.T. über Toll-like-Rezeptoren und/oder über eine Anzahl von Chemokinrezeptoren vermittelt. Die Ausreifung ist gekennzeichnet durch ein verändertes Expressionmuster von Oberflächenmarkern. Homingrezeptoren gewährleisten die Wanderung zu lymphatischem Gewebe und MHC I- und II-Moleküle ermöglichen die Präsentation von Antigenen. Kostimulatorische Signale, insbesondere die Marker CD80, CD86 und CD40 sowie die Sekretion von IL-12, aktivieren T-Zellen (Sato und Fujita 2007, Lipscomb und Masten 2002). Durch die Sekretion von Zytokinen sind DC zudem in der Lage, die nicht MHC-restringierte Immunabwehr durch natürliche Killerzellen und

natürliche Killer-T-Zellen zu aktivieren (Kaliniski et al. 2005). Ihr Expressionsmuster dirigiert die Immunabwehr zudem in eine Th1 oder Th2 gewichtete Richtung (Lipscomb und Masten 2002). DC sind zudem in der Lage, in Effektorzellen Toleranz gegen körpereigene Antigene zu induzieren und scheinen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Selbstreaktivität im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zu spielen (Rutella et al. 2006).

Humane dendritische Zellen stammen von CD34-positiven Vorläuferzellen ab und lassen sich in zwei Klassen unterteilen, myeloische und plasmazytoide DC. Diese unterscheiden sich in der Expression von u.a. CD11c, ihrer Verteilung im Gewebe und ihrem Sekretionsmuster. *In vitro* lassen sich aus peripheren Blutmonozyten in Gegenwart von GM-CSF und Il-4 CD11c-positive myeloische dendritische Zellen expandieren (Sallusto und Lanzavecchia 1994).

Für murine dendritische Zellen werden hingegen fünf myeloische und eine plasmazytoide Reihe von dendritischen Zellen unterschieden. Auch in der Maus verteilen sich diese unterschiedlich im Gewebe und zeigen verschiedene Fähigkeiten, so scheinen einige Subspezifitäten eher Toleranz zu induzieren, andere stimulieren die Effektoren hingegen. Wichtigstes Unterscheidungskriterium in der Durchflußzytometrie ist das Expressionmuster von CD4 und CD8 $\alpha$ , im Gegensatz zu humanen DC, die grundsätzlich negativ für diese Marker sind (Sato und Fujita 2007). Die am weitesten verbreitete Methode zur Gewinnung von murinen dendritischen Zellen *in vitro* ist von Inaba et al. (1992) beschrieben worden. In Gegenwart von GM-CSF wird murines Knochenmark, welches von ausdifferenzierten Zellen bereinigt wurde, zu dendritischen Zellen differenziert. Die Addition von Il-4 zu den Kulturen erhöht die stimulatorische Aktivität der so gewonnenen Zellen, welche negativ für CD4 und CD8 $\alpha$  sind (Wells et al. 2005, Lu et al. 1995).

Die grundsätzliche Toleranz des Immunsystems gegenüber Tumoren wurde bereits erwähnt (Siehe: 3.3). Dendritische Zellen könnten einen entscheidenden Anteil an diesem Phänomen haben. Die Notwendigkeit von Gefahrensignalen für die Maturation von dendritischen Zellen, welche im Rahmen von neoplastischen Erkrankungen fehlen können, könnte zur Ausbildung von Anergie gegenüber Tumorantigenen induzierenden DCs führen. Eine direkte inhibitorische Wirkung von Tumoren im Allgemeinen und HCC bzw. AFP im Besonderen auf dendritische Zellen wurde ebenfalls diskutiert (Esche et al. 1999). Immuntherapeutische Strategien beinhalten daher oftmals eine *ex vivo* Beladung und Stimulation von dendritischen Zellen, um einen maturen und Reaktivität induzierenden Phänotyp sicherzustellen. Verschiedene Studien dazu wurden bereits im Menschen durchgeführt. Abgesehen von den bereits diskutierten Untersuchungen zum HCC, existieren eine Reihe von ähnlichen Ansätzen,

welche z.B. das maligne Melanom oder das Nierenzellkarzinom zum Ziel haben. In Übereinstimmung mit den bereits erwähnten Daten scheint die Verträglichkeit DC-basierter Strategien generell sehr gut zu sein, doch mangelt es oftmals an Effektivität (Lipscomb und Masten 2002).

Grundsätzlich ist zu erörtern, auf welche Weise den dendritischen Zellen die zu präsentierenden Antigene verabreicht werden sollen. Definierte Peptidfragmente erlauben zwar die Beladung von MHC I- und II-Molekülen, sind jedoch auf HLA-Typen beschränkt. Zudem werden nicht alle möglichen immunogenen Sequenzen eines Proteins erfaßt. Komplettes, eventuell rekombinantes Protein wird zwar gut endozytiert und prozessiert, jedoch nur im MHC II-Kontext präsentiert. Durch genbasierte Beladung wird erreicht, daß die dendritische Zelle alle MHC-restringierten Epitope selber produziert und im MHC I-Kontext präsentiert. Sezernierte Proteine werden zudem wieder aufgenommen, prozessiert und zusätzlich zu *cross presentation* im MHC II-Kontext präsentiert. Genbasierte Beladung ist zudem kostengünstiger als die Herstellung von Peptiden und Protein. mRNA oder Expressionsvektoren müssen jedoch zunächst in die dendritische Zelle verbracht werden, wofür sich adenovirale Vektoren bewährt haben. Die Transduktion mittels adenoviraler Vektoren hat sich als weitaus effektiver erwiesen als die Lipofektion oder Elektroporation von anderen Expressionsvektoren (Arthur et al. 1997). Zudem führt die adenovirale Transduktion, vermutlich durch adenovirale Peptide und DNA bei humanen DC zu einer verstärkten Ausreifung und Stimulation von Effektorzellen (Schumacher et al. 2004, Korst et al. 2002). Unglücklicherweise exprimieren dendritische Zellen nicht den für die Transduktion notwendigen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, weshalb große Virusmengen zur effizienten Transduktion benötigt werden. Verschiedene Strategien zur Verbesserung der Transduktionraten wurden bislang vorgeschlagen, so lassen sich sowohl durch Zentrifugation höhere Transgenexpressionen erzielen als auch durch Stimulation mit LPS oder TNF- $\alpha$  (Miller et al. 2003, Nishimura 2001).

### **3.5. Adenovirale Vektoren**

#### **3.5.1 Adenoviren**

Adenovirale Vektoren leiten sich, wie der Name bereits sagt, von Adenoviren her. Adenoviren wurden erstmals 1953 aus lymphatischem Gewebe des Waldeyerschen Rachenrings isoliert, von dem sie ihren Namen („Adenoide“) erhalten haben.

Humanpathogene Adenoviren gehören taxonomisch zur Familie der Adenoviridae und lassen sich serologisch in 51 Typen einteilen. Sie sind typabhängig für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich, so verursachen sie Infektionen des Respirationstraktes, Pharyngitiden, Keratokonjunktivitiden, Urogenitalinfektionen und Gastroenteritiden (Falke 2001). Adenoviren sind unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser zwischen 70 und 100 nm. Ihre Dichte beträgt 1,33 g/ml. Das Kapsid ist ikosaedrisch und besteht aus 252 Untereinheiten, davon sind 240 sechseckig und 12 fünfeckig. Letztere, Pentone genannt, tragen antennenartige Fortsätze („Fiber“) und enthalten das typisierende Antigen. Das Genom besteht aus linearer Doppelstrang-DNA von 35-38 Kilobasenpaaren und liegt im Inneren des Kapsids. Sie kodiert in offenen Leserahmen für 11 Strukturproteine und eine Reihe von regulatorischen Proteinen (Shenk 2001).

Das Fiberprotein interagiert hochaffin mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), einem Bestandteil der Tight junctions, und die Pentone können an Proteine der Integrinfamilie binden (Cohen et al. 2001, Shenk 2001). Es folgt daraufhin die endozytotische Internalisierung des Virus, die Auflösung des Endosoms und Verbringung des Virusgenoms in den Zellkern. Dabei wird das Kapsid des Virus schrittweise degradiert. Die Virus-DNA integriert nicht in das Genom. Im Zellkern erfolgt die Transkription der viralen Gene und die Replikation des Virusgenoms. Das Assembly der viralen Partikel erfolgt im Zellkern, die Freisetzung durch Lyse, welcher eine Degradation der Zellstrukturproteine vorausgeht.

Der lytische Zyklus ist mit mehr als 10 000 Kopien pro Zelle effizient und innerhalb von 36 Stunden abgeschlossen (Shenk 2001).

Man unterscheidet früh, intermediär und spät exprimierte adenovirale Gene. Während die späten Gene die Strukturproteine kodieren, sind die Genprodukte der frühen und intermediären Gene als Transaktivatoren tätig, für den *host-shut-off* verantwortlich und unterdrücken die Expression von Interferonen und MHC I-Molekülen.

Als erstes beginnt die Transkription des E1a-Gens (E für *early*), welches transaktivierend auf die Expression der anderen frühen Gene E1b, E2, E3 und E4 und einige Wirtsgene wirkt. Die E1a- und E1b-kodierten Proteine immortalisieren die Zelle durch Interaktion mit p53 und anderen apoptoseinduzierenden Proteinen. Die E1-Region des Genoms ist außerdem für die Replikation essentiell. Die E2-Genprodukte steuern die Replikation der viralen DNA, deren Faltung und verhindern die Degradation durch Nukleasen. Die E3-Region ist nicht essentiell für die Replikation, schützt aber die infizierte Zelle vor dem Immunsystem. Ihre Genprodukte

verhindern die Externalisierung der MHC I-Moleküle, Desensibilisieren die Zelle gegen TNF- $\alpha$ - und Fas-vermittelte Lyse und aktivieren die Zellproliferation durch EGF-Rezeptor-induzierte Stimulation. Die E4-Region kodiert für Proteinkinasen und Produkte, welche durch Hemmung des Transports von Wirts-mRNA zum *host-shut-off* führt (Shenk 2001).

Adenoviren kommen ubiquitär vor und hinterlassen eine langanhaltende Immunität, welche über neutralisierende Antikörper gegen die Fiberproteine vermittelt wird. Antikörper lassen sich bei nahezu jedem Menschen spätestens mit dem 15. Lebensjahr nachweisen. Die Viruselimination während einer Infektion erfolgt über zytotoxische T-Zellen (Horwitz 2001).

### 3.5.2 Adenovirale Vektoren

Bereits in den 1950er Jahren wurden replikationsdefiziente Adenoviren eingesetzt. Seitdem wurden zahlreiche adenovirale Vektoren entwickelt. Am häufigsten kommen Varianten des Adenovirus Typ 5 zum Einsatz. Dieser kann DNA bis zu einer Länge von 105% seines Wildtypgenoms in sein Kapsid aufnehmen. Dies bedeutet bei einer Größe von 36 kbp eine mögliche Nutzlast von fast 2 kbp Fremd-DNA (Bett et al. 1993). Bei Deletionen im Wildtypgenom lassen sich die Größen der Transgene entsprechend vergrößern. Grob werden die zur Verfügung stehenden adenoviralen Vektorsysteme nach dem Umfang der Deletionen klassifiziert. Man unterscheidet drei Generationen. Die 1. Generation von adenoviralen Vektoren ist durch den Wegfall der E1 und der E3-Region gekennzeichnet. Die E1-Region ist für die Replikation essentiell und muß daher *in trans* von einer Verpackungszelllinie bereitgestellt werden. Die Deletion erlaubt bis zu 3,2 kbp große Insertionen. Stabil mit der E1-Region transfizierte Zelllinien sind kommerziell erhältlich, so zum Beispiel die HEK-Zelllinie 293 oder die Zelllinie 911, welche auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand (Danthinne und Imperiale 2000, He et al. 1998). Die E3-Region ist für die Replikation nicht relevant, und ihre Deletion gestattet Insertionen bis zu 3,1 kbp, was zu einer maximalen Größe des Transgens von 8,2 kbp summiert. Einzelne Genprodukte der E3-Region sind jedoch für bestimmte Anwendungen interessant, so z.B. zur Reduktion von zytolytischen T-Zell-Angriffen gegen die Wirtszelle, wodurch sich die Transgenexpression *in vivo* erhöhen läßt. Verschiedene selektive Deletionen wurden daher beschrieben. Bei der 2. Generation von adenoviralen Vektoren erhöht der Wegfall der E2- oder E4-Regionen die Nutzlast um weitere 6 kbp. *In vivo* ist eine deutlich verlängerte Transgenexpression zu beobachten. Allerdings resultiert eine reduzierte Replikationseffizienz in den Verpackungszelllinien, welche die essentiellen E2- und E4- Gene zusätzlich zur E1-Region bereitstellen muß. Adenovirale

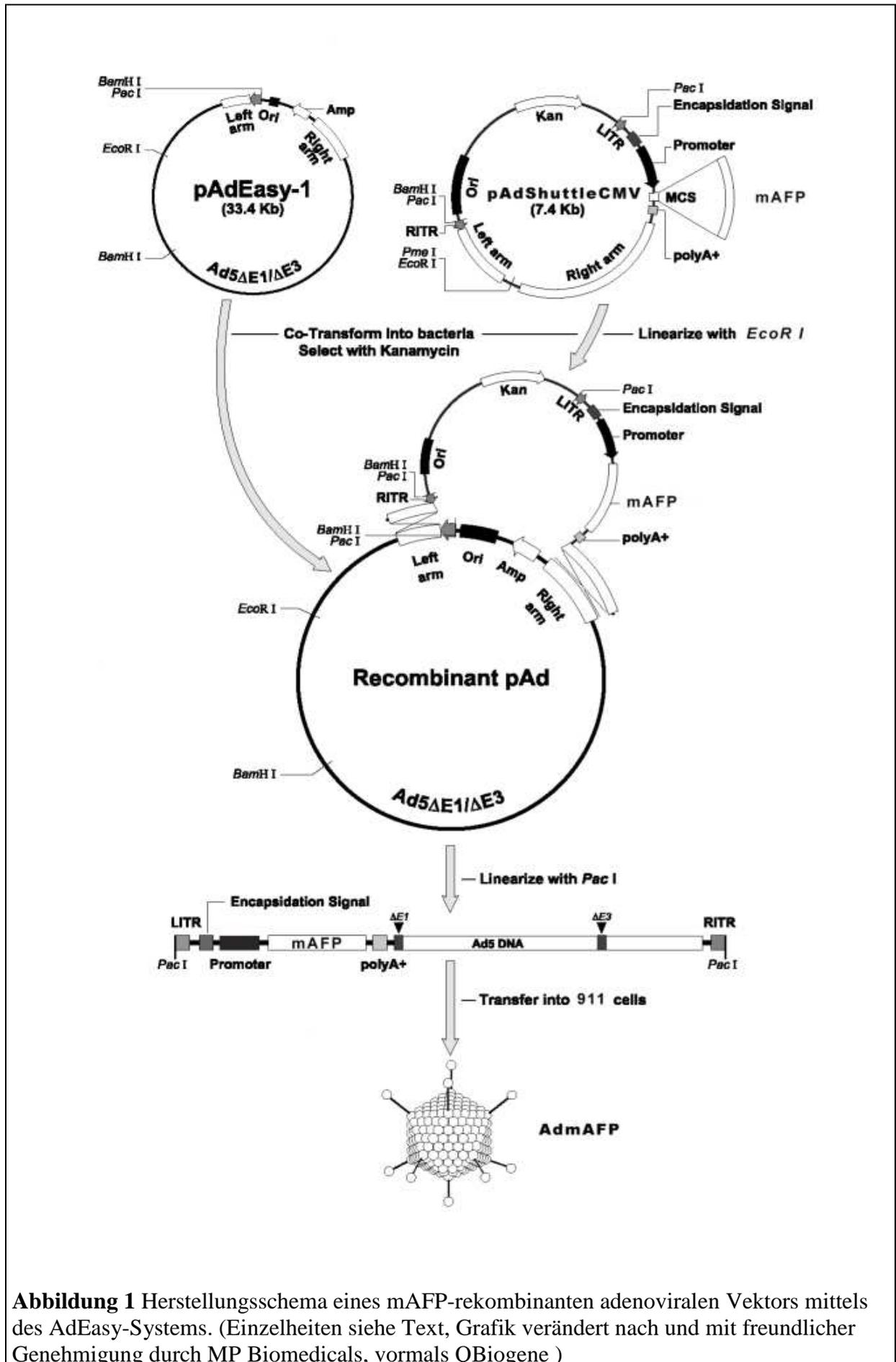
Vektoren der 3. Generation werden auch „*gutless*“ genannt, da das Virusgenom nur noch aus einem Rumpf besteht, der sich aus den inverted terminal repeats und dem Verpackungssignal zusammensetzt. Ein solcher Vektor kann bis zu 37 kbp große Transgene aufnehmen und ruft zudem praktisch keinerlei Immunreaktion hervor. Somit sind einerseits lange Transgenexpressionen und andererseits die wiederholte Gabe des Vektors *in vivo* möglich. Die Herstellung ist jedoch aufwendig und von Helferviren abhängig, welche die Vektoren regelmäßig kontaminieren (Danthinne und Imperiale 2000).

Für die Transduktion von dendritischen Zellen *ex vivo* ist die Immunogenität des Vektors zweitrangig, da wiederholte Applikationen nicht durch neutralisierende Antikörper verhindert werden können. Da die vorliegende Arbeit zudem die Verbringung eines einzelnen und vergleichsweise kurzen Transgens zum Inhalt hatte, fiel die Wahl auf einen Vektor der ersten Generation ohne E4-Deletion.

### 3.5.3 Das AdEasy-System

Verschiedene, auch kommerziell erhältliche Vektorsysteme der ersten Generation sind im Einsatz. Sie unterscheiden sich in erster Linie in der Art der Transgeninsertion.

Das AdEasy-System wurde von He et al. 1998 beschrieben. Es ist gekennzeichnet durch den Gebrauch von plasmidkodierter nichtinfektöser Virus-DNA und dem Vorhandensein eines Transfervektors. Ferner ist die homologe Rekombination von Virusgenom und Transfervektor in Bakterien kennzeichnend. Dies vereinfacht die Klonierungsschritte und bewirkt beim AdEasy-System im Gegensatz zu konkurrierenden Systemen, welche die Vektoren in den Verpackungszelllinien rekombinieren, deutlich geringere Raten von replikationsfähigen Wildtypmutanten. Letzteres erspart die Aufreinigungen und Charakterisierung aus Einzelplaques. Die Verwendung eines kleinen und handlichen Transfervektors erleichtert zusätzlich die Klonierungsarbeiten. Die Herstellung von adenoviralen Vektoren mittels des AdEasy-Systems besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Zunächst wird das Transgen durch Verdau und Ligation in die multiple Klonierungsstelle des Transfervektors inkloniert. Es stehen vier verschiedene Transfervektoren von jeweils ca. 6-9 kbp Länge zur Verfügung. Man kann wählen, ob der Vektor bereits einen CMV-Promotor upstream der multiplen Klonierungsstelle trägt und ob bereits die GFP-cDNA plus Promotor als Expressionmarker vorhanden sein soll. Im zweiten Schritt wird der Transfervektor mit dem sog. Backbone-Plasmid in Bakterien homolog rekombiniert. Das Backbone-Plasmid trägt das E1- und E3-deletierte (pAdEasy1) bzw. die E1, E3 und E4 deletierte (pAdEasy2) Genom des Adenovirus Typ 5.



**Abbildung 1** Herstellungsschema eines mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektors mittels des AdEasy-Systems. (Einzelheiten siehe Text, Grafik verändert nach und mit freundlicher Genehmigung durch MP Biomedicals, vormalig QBiogene )

Die multiple Klonierungsstelle der Transfervektoren wird von adenoviralen Sequenzen flankiert, über welche die Rekombination vermittelt wird. Im Zuge der Rekombination fallen die bakteriellen Sequenzen des Backbone-Vektors inklusive des Ampicillinresistenzgens weg. Rekombinierte Klone können so über die Kanamycin-Resistenz des Transfervektors selektiert werden. Im dritten und letzten Schritt wird der rekombinierte Vektor linearisiert und von den bakteriellen Sequenzen befreit und in die Verpackungszelllinie eingeschleust, welche die fehlenden Genprodukte für die Replikation konstitutiv exprimiert (Siehe Abbildung 1).

### **3.6. Zielsetzung**

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten im Tiermodell zeigen, daß die Vakzinierung mit DNA von murinem Alpha-Fetoprotein (mAFP) protektive Wirkung auf das Wachstum von subkutanen Hepatomen aufweist (Hanke et al. 2002a). Dendritische Zellen, welche mit einem mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektor transduziert worden waren, zeigten ebenfalls protektive Wirkung, allerdings in geringerer Effektivität (Vollmer et al. 1999). DC-basierte Behandlungsmethoden zeigten sogar kurative Erfolge in der Maus (Lee et al. 2001). Da unsere humanen *in vitro* Daten die Effektivität von adenoviral transduzierten dendritischen Zellen in der Induktion einer AFP-spezifischen Immunantwort belegten, wollten wir diesen Ansatz im Tiermodell verbessern (González-Carmona et al. 2006). Auch sollte langfristig das artefizielle Modell der subkutanen Tumore durch ein orthotopes Lebertumormodell in der Maus abgelöst werden.

Ziel dieser Arbeit war somit die Herstellung eines mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektors, die Etablierung der Gewinnung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark in unserem Labor und die Transduktion derselben mit dem erwähnten Vektor. Ferner war die Klonierung eines GFP-kodierenden adenoviralen Vektors als Kontrollvektor notwendig.

Diese Arbeiten wurden in den Jahren 2002 bis 2003 durchgeführt und waren eingebettet in ein durch BONFOR unterstütztes Projekt des Autors, welches zum Ziel hatte, *in vitro* die mAFP-spezifische immunstimulatorische Aktivität dieser transduzierten DC zu quantifizieren und gegebenenfalls durch kostimulatorische Signale zu verbessern. Letztgenannte Arbeiten fanden in den Jahren 2003 bis 2004 statt und sind nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertationsschrift. Im weiteren Verlauf sollten diese Zellen therapeutisch in subkutanen und intrahepatischen HCC-Modellen erprobt werden.

## 4. Material

### 4.1. Plasmide und Vektoren

#### pCImAFP

Das Plasmid pCImAFP wurde in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt (Hanke et al. 2002a). Es besteht aus dem eukaryontischen Expressionsvektor pCI (Promega, Madison, WI, USA; Genbank CVU47119) und der vollständigen cDNA von mAFP einschließlich der Poly-A-Region. (Law und Dugaiczky 1981). Die cDNA des mAFP befindet sich in der multiplen Klonierungsstelle zwischen einer *KpnI* und *SalI* Erkennungssequenz unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Plasmid ist 6 kbp groß.

#### psL1180 (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Der psL1180 Vektor wurde zur Bestimmung der Elektrokompentenz von *E.coli* verwendet. psL1180 ist 3422 Basenpaare lang und trägt ein Ampicillin-Resistenzgen (Brosius 1989).

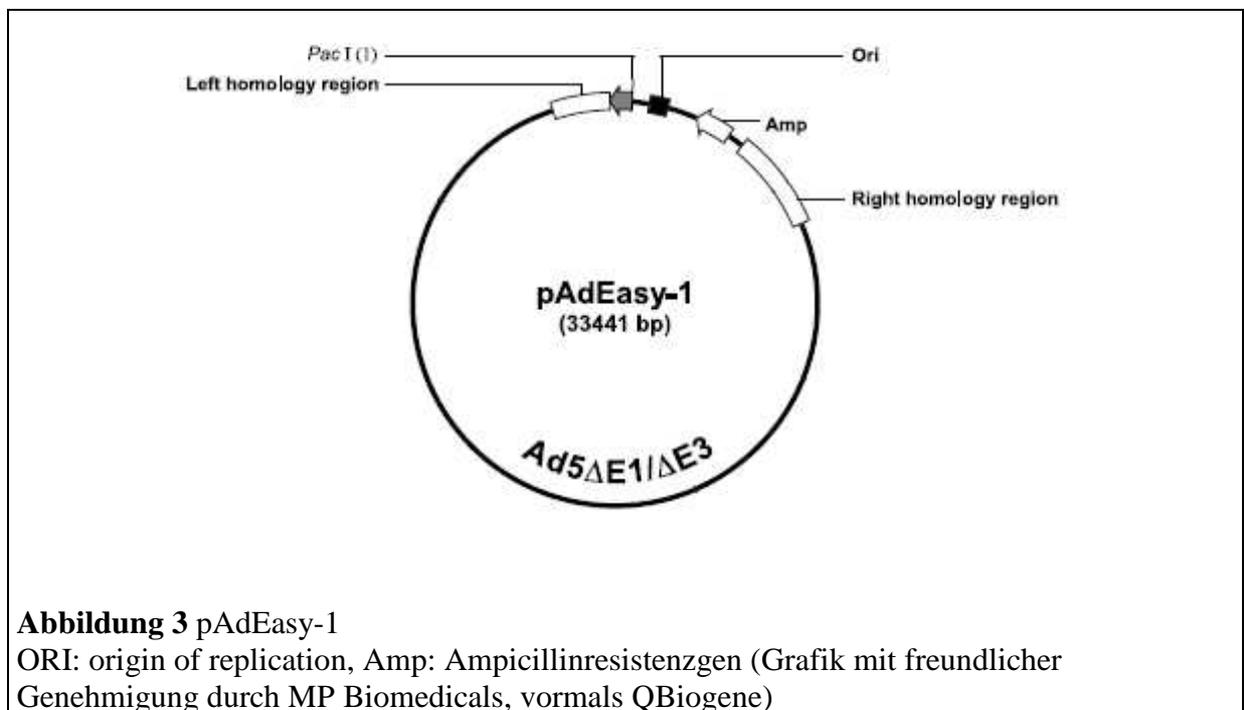
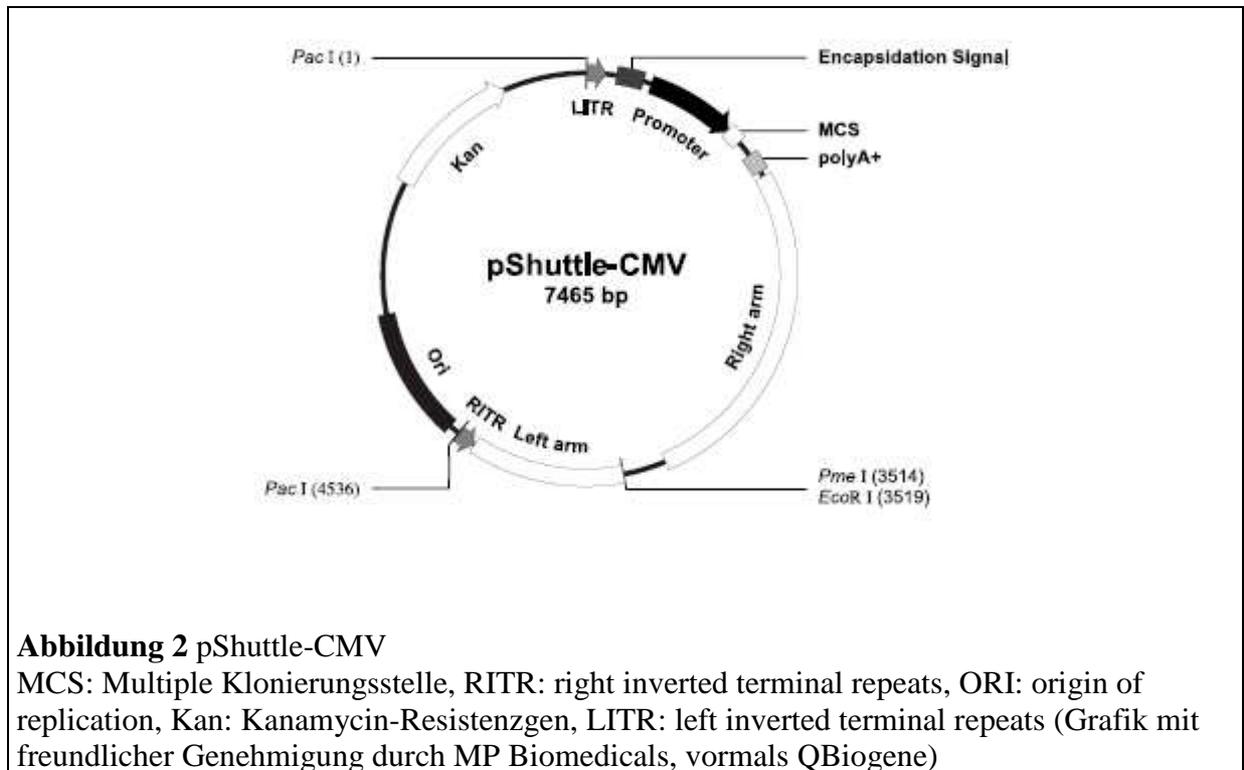
#### pShuttle-CMV (Genbank AF334399 - ATCC JHU-14)

Das Plasmid pShuttle-CMV ist ein Transferplasmid des AdEasy-Systems. Es ist 7,5 kbp groß und verfügt über ein Kanamycin-Resistenzgen und einen Origin of Replication. Diese Gene werden von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *PacI* flankiert. Für Klonierungszwecke verfügt das Plasmid über eine Polylinkerregion, welche zwischen dem CMV-Promotor und einer Polyadenylierungsregion liegt. Zu beiden Seiten einer *PmeI* Restriktionsstelle befinden sich überdies adenovirale Sequenzen. Einerseits die bp 34 931 - 35 935 und 1 - 480 („linker Arm“), andererseits die Nukleotide 30534 – 5790 („rechter Arm“) des Adenovirus vom Serotyp 5. Diese Sequenzen erlauben die homologe Rekombination von pShuttle-CMV mit den entsprechenden Sequenzen im Backbone-Vektor pAdEasy-1 in *E.Coli* nach Verdau mit *PmeI* (He et al. 1998).

#### pAdEasy-1 (Genbank AY370909 - ATCC JHU-19)

Der 33,4 Kilobasenpaare große pAdEasy-1-Vektor ist ein adenoviraler Backbone-Vektor des AdEasy-Systems. Er enthält das Genom des Adenovirus Serotyp 5 mit Deletionen der E1- und E3-Regionen für die Generierung replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren. Der Vektor enthält ein Origin of Replikation und ein Ampicillin-Resistenzgen. Diese bakteriellen

Sequenzen entfallen nach homologer Rekombination mit dem pShuttle-CMV-Vektor (He et al. 1998).



#### pAdTrackCMV (ATCC JHU-17)

pAdTrackCMV ist ein Transfervektor des AdEasy-Systems. Er besteht aus dem pShuttleCMV-Vektor und trägt zusätzlich die GFP-cDNA als Transgen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Mithilfe des pAdTrackCMV-Plasmids erstellte adenovirale Vektoren dienen zur Bestimmung der Transduktionseffizienz (He et al. 1998). Das Genprodukt GFP ist unter Bestrahlung mit violetterem oder blauem Licht leicht detektierbar. GFP ist ein Protein von knapp 27 kDa und emittiert Licht von 509 nm Wellenlänge, wenn es optisch angeregt wird. Die Anregungsmaxima liegen bei 395 nm und 475 nm (Shimomura O et al. 1962, Prasher et al. 1992, Chalfie et al. 1994).

#### AdMock

AdMock ist replikationsdefizienter adenoviraler Vektor auf Basis des AdEasy-Systems (He et al. 1998). AdMock wurde in der eigenen Arbeitsgruppe generiert und verfügt über kein Transgen. AdMock dient als Kontrollvektor bzw. Leervektor, um vektorabhängige Effekte bei Transduktionen darzustellen.

## 4.2. Eukaryontische Zelllinien

#### 911 (Fallaux et al. 1996)

911 ist eine humane, epitheliale, adhärenente Zelllinie, welche aus humanen embryonalen Retinoblasten (HER) gewonnen wurde. 911 Zellen sind stabil mit der E1-Region des Adenovirus Serotyp 5 transfiziert. Die einschichtig wachsenden Zellen dienen der Propagation und Titrierung von adenoviraler Vektoren.

#### A549 (ATCC CCL-185)

A549 ist eine humane epitheliale adhärenente Zelllinie, welche aus einem Bronchialkarzinom gewonnen wurde (Lieber et al. 1976). A549-Zellen exprimieren den Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und lassen sich somit leicht mit adenoviralen Vektoren transduzieren (Davison et al. 2001).

#### Hepa 1-6 (ATCC CRL-1830)

Hepa 1-6 ist eine murine Hepatomzelllinie aus dem BW7756 Lebertumor der C57L Maus.

Die Zelllinie wächst adhärent, einschichtig und zeigt epitheliale Morphologie. Hepa 1-6 Zellen sezernieren murines AFP (Darlington et al. 1980, Darlington 1987). Sie eignet sich zur Tumorinduktion in C57L/J-Mäusen (Grimm et al. 2000).

### 4.3. Bakterienstämme

*Escherichia coli* (*E.coli*) DH10B (Invitrogen, Mannheim)

Genotyp: F<sup>-</sup>, *endA1*, *recA1*, *galU*, *galK*, *deoR*, *nupG*, *rpsL*,  $\Delta$ *lacX74*,  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15, *araD139*,  $\Delta$ (*ara,leu*)7697, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\lambda$ <sup>-</sup>

Der Genotyp des Stammes DH10B enthält *endA1*, *recA1* und *deoR* und erlaubt die stabile Transformation auch großer Plasmide (Grant et al. 1990). Der Stamm ist aufgrund der *recA1*-Mutante nicht zur homologen Rekombination geeignet (Cassuto et al. 1981).

*Escherichia coli* (*E.coli*) BJ5183

Genotyp: *endA1*, *sbcBC*, *galK*, *met*, *thi-1*, *bioT*, *hsdR*, (Str<sup>r</sup>)

Der Stamm BJ5183 ist nicht *recA*-defizient und ist zur homologen Rekombination geeignet. Er besitzt ein Streptomycinresistenzgen. Die aus BJ5183-Kulturen erzielbaren Mengen präparierter Plasmid-DNA sind gering (Hanahan 1983).

### 4.4. Mausstamm

C57L/J (Jackson Laboratories/ Charles River Laboratories (Sulzfeld))

Der C57L/J Mausstamm eignet sich zur Induktion von Tumoren mittels Hepa 1-6. Der Haplotyp H2 ist bc (Shen et al. 1982).

### 4.5. Oligonukleotide

Primer für die rT-Reaktion:

Random Primer

Promega (Mannheim)

Die folgenden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer für rT-PCR und externe Sequenzierungen wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Life Technologies (Rockville, MD, USA) synthetisiert. Zum Design der Oligonukleotide wurde nach Rosen und Skaletsky (2000) vorgegangen.

#### Primer für humanes $\beta$ -Actin

Quelle (mRNA für humanes  $\beta$ -Actin): Genbank X00351

Sense :        5' CGGGAAATCGTGCGTGACAT 3'                    (Basen 657 – 676)

Antisense     5' GAACTTTGGGGGATGCTCGC 3'                    (Basen 1359 –1368)

#### Primer für murines $\beta$ -Actin

Quelle (mRNA für murines  $\beta$ -Actin): Tokunaga et al. 1984, Genbank X03672

Sense:         5' TGC CGC ATC CTC TTC CTC 3'                    (Basen 767 – 784)

Antisense:    5' CGC CTT CAC CGT TC CAGT 3                    (Basen 1404 – 1421)

#### Primer für mAFP

Quelle (mRNA für mAFP): Law und Dugaiczky 1981, Genbank NM\_007423

#### rT-PCR

Sense:         5' AGG AGG AGT GCT TCC AGA CA 3'                    (Basen 581-601)

Antisense:    5' GGC TTT CCT CGT GTA ACC AA 3'                    (Basen 1285-1305)

#### Sequenzierungen

Sense:         5' GAG AAG TGC TGC AAA GCC 3'                    (Basen 1767 – 1794)

Antisense:    5' CAG AAA CAC AGA ATA GCT GGC 3'                    (Basen 295 – 314)

## 4.6. Proteine

### 4.6.1 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega (Mannheim)

Restriktionsendonukleasen

NewEngland Biolabs GmbH (Frankfurt)

RNAse A

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

RNAsin Ribonuklease Inhibitor	Promega (Mannheim)
RQ1 RNase-Free DNase	Promega (Mannheim)
T4 DNA Ligase	NewEngland Biolabs GmbH (Frankfurt)

#### 4.6.2 Antikörper

Durchflußzytometrie:

Phycoerythrin (PE) gekoppelt:

Hamster-anti-Maus CD11c	BD Pharmingen (Heidelberg)
-------------------------	----------------------------

Ratte-anti-Maus CD86	AbD Serotec (Düsseldorf)
----------------------	--------------------------

Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gekoppelt:

Hamster-anti-Maus CD40	BD Pharmingen (Heidelberg)
------------------------	----------------------------

Hamster-anti-Maus CD80	BD Pharmingen (Heidelberg)
------------------------	----------------------------

Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
--------------------------	---------------------------------------

Isotypenkontrollen von BD Pharmingen (Heidelberg)

Ungekoppelt:

Kaninchen-anti-Maus-CAR, polyclonal	Dieses Serum wurde freundlicherweise von Dr. Bergelson (Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt (Bergelson et al. 1998).
-------------------------------------	--

MACS:

Ratte-anti-Maus LY6G	Southern Biotech/Biozol (Eching)
----------------------	----------------------------------

Ratte-anti-Maus CD45R	Southern Biotech/Biozol (Eching)
-----------------------	----------------------------------

Ratte-anti-Maus MHC II	Southern Biotech/Biozol (Eching)
------------------------	----------------------------------

Ratte-anti-Maus CD4	Southern Biotech/Biozol (Eching)
---------------------	----------------------------------

Ratte-anti-Maus CD8	Southern Biotech/Biozol (Eching)
---------------------	----------------------------------

Magnetic Beads:

Ziege-anti-Ratte IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
---------------------------------	--

Western Blot :

Kaninchen-anti-mAFP, polyklonal	Dieses Serum wurde freundlicherweise von Frau Dr. Hanke zur Verfügung gestellt. (Hanke et al. 2002a)
---------------------------------	--

Ziege-anti-Kaninchen IgG, (Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
---	---------------------------------------

### 4.6.3 Zytokine

Alle Zytokine wurden von Peprotech/Biozol (Eching) bezogen

Muriner Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Murines Interleukin 4 (mIL-4)

Muriner Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- $\alpha$ )

### 4.7. Kits

DC (detergent compatible)-Protein Assay	Biorad (München)
GeneClean III Kit Qbiogene	MP Biomedicals (Heidelberg)
GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nucleobond AX500 MaxiPrep Kit	Macherey & Nagel (Düren)

### 4.8. Reagenzien

#### 4.8.1 Materialien für die Molekularbiologie

1 Kilobasen (kb) Größenstandard	Invitrogen (Mannheim)
Agarose	Serva GmbH (Heidelberg)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercapto-Ethanol	Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)
Bactotrypton	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences (Heidelberg)
Chloroform	E. Merck (Darmstadt)
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
dNTP-Mix (Desoxyribonukleotidtriphosphate)	Promega (Mannheim)
Ethanol	E. Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Isoamylalkohol	E. Merck (Darmstadt)

Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	E. Merck (Darmstadt)
Phenol	E. Merck (Darmstadt)
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Roche II Größenstandard	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	KMF (Lohmar)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

#### 4.8.2 Materialien für die Proteinbiochemie

Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)
Colorburst Elektrophoresis Marker	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dithiotreitol (DTT)	Serva GmbH (Heidelberg)
Milchpulver	KMF (Lohmar)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH (Heidelberg)
SuperSignal West Pico Enhanced Chemiluminescence	Pierce/Perbio (Bonn)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Triton X 100	Serva GmbH (Heidelberg)
Tween 20	Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)

#### 4.8.3 Materialien für die Zellbiologie

Agarose Typ VII low gelling temp	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercapto-Ethanol	Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA (Cölbe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamax	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	Pierce/Perbio (Bonn)
Glutamin (200mM)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1- piperaziny)-ethansulfonsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Pferde-Serum (hitzeinaktiviert)	Invitrogen (Mannheim)
Isofluran	Abbot (Wiesbaden)

Lipofectamine	Invitrogen (Mannheim)
LPS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Minimum Essential Medium (10x)	Invitrogen (Mannheim)
OptiMEM	Invitrogen (Mannheim)
PBS mit Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> (PBS++)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)(100x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propidiumjodid	BD Biosciences (Heidelberg)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1640 Medium mit Glutamax	
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Yeast Extract	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

#### 4.8.4 Sonstige Reagenzien

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fluka Feinchemikalien GmbH (Neu-Ulm),

Merck (Darmstadt),

Serva GmbH (Heidelberg),

Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen).

## 4.9. Lösungen, Medien, Puffer und Gele

### 4.9.1 Molekularbiologie und Zellkultur

Agarose (1,5%) für Plaque-Assays:

Agarose Typ VII low gelling temp	1,2 g
Aqua bidest	80 ml

Das Gemisch wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

CsCl-Lösungen für die Gradientenzentrifugation:

Puffer:

EDTA	1 mM
Tris	10 mM (pH 8,1)

1,2 g/ml CsCl:

CsCl	13,85 g
Puffer	50 ml

1,33 g/ml CsCl:

CsCl	22,5 g
Puffer	50 ml

1,45 g/ml CsCl:

CsCl	30,5 g
Puffer	50 ml

DEPC-Wasser:

DEPC	0,1% (v/v)
------	------------

ad 1000 ml Aqua bidest.

Nach ständigem Rühren unter einem Abzug für 12 h wird das DEPC Wasser autoklaviert.

Dadurch zersetzt sich das DEPC.

Erythrozyten-Lyse-Puffer:

Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	8,29 g
Kaliumbikarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	1,0 g
EDTA	0,0371 g

In 1000 ml Aqua ad injectabilia lösen, sterilfiltrieren.

Luria Broth (LB)-Medium:

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt (Bacto Yeast Extract)	5 g
Natriumchlorid (NaCl)	10 g

Ad 1000 ml Aqua bidest.

Der pH-Wert wird mit 5M NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. Bei Bakterienkultivierung erfolgt die Zugabe von Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin mit einer Endkonzentration 25 µg/ml.

## LB-Agarplatten:

Bacto-Agar	15 g
LB-Medium	1000 ml

Dem LB-Medium wird vor dem Autoklavieren Agar zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C werden Selektionsantibiotika beigelegt und das Gemisch in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren erfolgt die Lagerung bei 4°C. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug 100 µg/ml. Die Endkonzentration von Kanamycin betrug 25 µg/ml.

## WB-Medium zur Gewinnung elektrokompeter Bakterien:

Glycerol	100 ml
----------	--------

Ad 1000 ml Aqua bidest. Autoklavieren und bei 4°C lagern.

## Lyselösung für Miniplasmidpräparation:

TE-Puffer	940 µl
NaOH 10 M	10 µl
SDS (10%)	50 µl

## MEM (2x) für Plaque-Assays:

MEM (10x)	40 ml
Pen /Strep (100x)	4 ml
Glutamin (200mM)	4 ml
Yeast Extract (5%)	4 ml

Der pH wird auf 7,4 mit NaHCO<sub>3</sub> eingestellt.

Pferdeserum	8 ml
-------------	------

Ad 200 ml mit autoklaviertem Aqua bidest.

## Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS):

Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	20,0 mM
NaCl	50,0 mM

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

## PBS/BSA für die Durchflusszytometrie:

Bovines Serumalbumin	1% (m/v)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	0,02% (m/v)

in PBS++ (plus Magnesium und Calcium)

MACS-Puffer:

Bovines Serumalbumin 0,5% (m/v)

EDTA 1 mM

in PBS++ (plus Magnesium und Calcium)

Probenpuffer für DNA-Elektrophorese (6x):

EDTA 10 mM

Glycerin 50% (m/v)

Bromphenolblau 0,2% (m/v)

Xylencyanol 0,2% (m/v)

in Aqua bidest

Propidiumjodid-Lösung:

Natriumcitrat 3,8 mM

Propidiumjodid 50 µg/ml

in PBS

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x):

Tris 242 g

Eisessig 57,1 ml

EDTA (0,5 M, pH 8,0) 100 ml

ad 1000 ml Aqua bidest

Tris-EDTA (TE)-Puffer :

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

ad 1000 ml Aqua bidest. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt.

Hefeextrakt (5%):

Yeast Extract 5 g

ad 100 ml Aqua bidest. Das Gemisch wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

#### 4.9.2 Proteinbiochemie

APS-Lösung

Ammoniumpersulfat 10% (m/v)  
in Aqua bidest

DC (detergent compatible)-Lysispuffer :

Tris-Phosphat 25 mM  
CDTA 2 mM  
DTT 2 mM  
Glycerol 10% (m/v)  
Triton X 100 1% (v/m)

in Aqua bidest. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,8 eingestellt.

Laufpuffer (Lämmli-puffer) (5x):

Tris 25 mM  
Glycin 250 mM  
SDS 0,5% (m/v)  
in Aqua bidest

Probenauftragpuffer (5x):

Tris 1,25 M  
DTT 50 mM  
Glycerin 30% (m/v)  
SDS 5% (m/v)  
Bromphenolblau 1,25 µg/ml

in Aqua bidest. Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer (4x):

Tris 0,5 M  
SDS 0,4 % (m/v)

Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.

Tris gepufferte Salzlösung (TBS)-Tween (TBST):

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05% (m/v)

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

TBST-blocking-Solution:

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Milchpulver	5% (m/v)
Tween 20	0,05% (m/v)

Trenngelpuffer (4x):

Tris	1,5 M
SDS	0,4 % (m/v)

Der pH-Wert wird auf 8,8 eingestellt.

Transferpuffer für den Semi-Dry-Blot (5x):

Tris	25 mM
Glycin	192 mM

ad 1000 ml Aqua bidest

Gebrauchsfertiger Transferpuffer:

Transferpuffer (5x)	40 ml
Methanol	40 ml

ad 200 ml Aqua bidest

### 4.9.3 Polyacrylamidgele für die Proteingelektrophorese

Angaben in Volumenprozent

Sammelgel 4,5%:

Acryl-/Bisacrylamid-Lösung	1,5 ml
Sammelgelpuffer (4x)	2,5 ml
Aqua bidest	5,9 ml
TEMED	7,5 µl
APS	100 µl

Trenngel 10%:

Acryl-/Bisacrylamid-Lösung	3,35 ml
Sammelgelpuffer (4x)	2,5 ml
Aqua bidest	4,15 ml
TEMED	7,5 µl
APS	40 µl

#### 4.10. Verbrauchsmaterialien

Zellstrainer 40 µm und 100 µm Porengröße	Falcon/ BD Biosciences (Heidelberg)
Elektroporationsküvetten, 0,2 cm Schlitz	Bio-Rad (München)
Einmalkanülen	Terumo (Eschborn)
FACS-Röhrchen	Labomedic (Bonn)
Gel-Blotting-Papier, GB003	Schleicher & Schuell (Dassel)
Glasswaren (Kolben, Pipetten, Standzylinder, Reagenzgläser usw.)	Schott (Mitterteich)
Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Multi-Well-Platten (6-Well, 12-Well, 96-Well)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Nitrozellulose-Membran Protran 45µm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Optiseal Tubes (16x60 mm)	Beckmann-Coulter (Krefeld)
Petrischalen	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (PCR, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Röntgenfilm, CL-XPosure	Pierce/Perbio (Bonn)
Slide-A-Lyser Dialysekammern	Pierce/Perbio (Bonn)
Skalpelle Cutfix Nr. 22	Aesculap (Tuttlingen)
Spritzen Amefa 2, 5, 20 ml	Braun (Melsungen)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
UltraClear Tubes (14x89 mm)	Beckmann-Coulter (Krefeld)
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Zellschaber	Falcon/ BD Biosciences (Heidelberg)

## 4.11. Geräte

Ausschwingrotor, SW41	Beckmann Coulter (Krefeld)
Autoklav, 3870 ELV	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Bakterienbrutschrank	Fisher Scientific (Schwerte)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Fisher Scientific (Schwerte)
Durchflusszytometer, EPICS XL	Beckman Coulter (Krefeld)
Elektrophoresekammer (DNA)	Biorad (München)
Elektrophoreseeinheit, Mini Protean II	Biorad (München)
Elektrophoresekammer (Protein)	Biorad (München)
Kühlzentrifuge, RC-5B	Sorvall (Bad Homburg)
Elektroporationsgerät, Easyjet, EquiBio	Peqlab (Erlangen)
ELISA-Reader c	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Festwinkelrotor SW50TI	Beckmann Coulter (Krefeld)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Labor Brand (Giessen)
Mikropipetten	Gilson (Bad Camberg)
Mikroskop, DM IL	Leica (Wetzlar)
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Netzgeräte für Blot und Elektrophorese	Biorad (München)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
Thermo-Cycler	Eppendorf GmbH (Hamburg)
pH-Elektrode	Hannah Instruments (Kehl a. Rhein)
Photometer, Gene Quant	Pharmacia (Freiburg)
Pipettierhilfe	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Präzisionskuvetten, Quarzglass	Hellma (Mühlheim)
Semi-Dry-Blotkammer	Biorad (München)
Schüttelinkubator HAT	INFORS AG (Bottmingen)
Schüttler, Promax 2000	Heidolph (Kelheim)
Laminar-Flow-Bank	Nunc (Wiesbaden)
Tischzentrifuge, Microfuge Lite	Beckmann Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge, Optima LE 80K	Beckmann Coulter (Krefeld)
Vortex, MS 1 Minishaker	IKA (Staufen)
Waage, SBA52	Scaltec (USA)

Wasserbad

Zentrifuge, Biofuge 22R

Zentrifuge, Megafuge 1.0R

Zentrifuge, Varifuge 3.0R

Köttermann (Uetze-Hänningen)

Fisher Scientific (Schwerte)

Fisher Scientific (Schwerte)

Fisher Scientific (Schwerte)

## 5. Methoden

### 5.1. Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Allgemeine Methoden

##### 5.1.1.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche in der Lage sind, doppelsträngige DNA an bestimmten, meist palindromischen, 4-8 Basenpaar langen Erkennungssequenzen zu schneiden. Dabei entstehen glatte („*blunt*“) oder 5'-bzw. 3'-überstehende („*sticky*“) Enden.

Eine Einheit (*unit*, U) Enzym ist definiert als diejenige Menge, welche in einer Stunde ein  $\mu\text{g}$  reine  $\lambda$ -DNA zu verdauen in der Lage ist.

Die Restriktionsansätze bestanden in möglichst geringem Volumen aus der zu verdauenden DNA, 1 U Restriktionsenzym/ $\mu\text{g}$  DNA und dem entsprechenden, vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Teilweise ist nach Herstellerangaben die Zugabe von BSA notwendig gewesen. Da die Enzymlösung Glycerinhaltig ist, sollte sie nicht mehr als 10% des Ansatzes ausmachen, um die Enzymfunktion nicht zu beeinträchtigen. Die Inkubation erfolgte in der Regel für eine Stunde bei 37°C. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Typischer Ansatz für kleine Mengen DNA:

DNA (ca. 1 $\mu\text{g}$ )	1 $\mu\text{l}$
Puffer nach Herstellerangabe (10x)	1 $\mu\text{l}$
BSA nach Herstellerangabe (10x),	1 $\mu\text{l}$
Enzym	1 $\mu\text{l}$
Ad 10 $\mu\text{l}$ Aqua bidest	

Für präparative Restriktionsverdaue wurden 50 – 100  $\mu\text{g}$  DNA gespalten. Nach Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese konnten diese aus dem Gel isoliert werden.

##### 5.1.1.2 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA-Fragmente lassen sich aufgrund ihrer negativen Nettoladung elektrophoretisch auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einem Agarosegel ist umgekehrt proportional zum Molekulargewicht, so daß kurze Fragmente näher beim Pluspol zu liegen kommen. Zirkuläre DNA zeigt zusätzlich ein konformationsabhängiges Wanderungsverhalten. Superspiralisierte DNA wandert schneller als linearisierte oder offen

zirkuläre DNA. Das Auflösungsvermögen eines Agarosegels hängt von seiner Konzentration ab, je größer die Konzentration eines Gels ist, desto besser lassen sich kleinere DNA-Fragmente von einander trennen. Zur Visualisierung der DNA im Gel wird Ethidiumbromid, eine interkalierende Substanz, welche unter UV-Licht fluoresziert, zugesetzt.

Für die DNA-Agarosegelelektrophorese wurden 0,5 bis 2 % ige (m/v) Gele verwendet. 1 - 5 g Agarose wurde mit 200 ml TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Den DNA-Lösungen wurde vor dem Auftragen ein beschwerender Probenpuffer zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm Elektrodenabstand in TAE-Puffer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (Sambrook et al. 1989).

#### 5.1.1.3 Glycerolstocks plasmidtragender Bakterien

Zur mittel- und langfristigen Lagerung plasmidtragender Bakterien wurden Glycerolstocks angelegt. Diese wurden aus Bakterienkulturen in LB-Medium bei einer OD von 0,6 gewonnen. 850 µl der Bakteriensuspension wurden mit 150 µl Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

### 5.1.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA durch Bakterien. Während diese streng durch sog. Kompetenzgene regulierte Eigenschaft gewisse Bakterienstämme konstitutiv charakterisiert, muß *E.coli* zunächst durch Stressoren künstlich kompetent gemacht werden (Chen und Dubnau, 2004). Bei der Elektroporation wird die Zellmembran der Bakterien durch eine elektrische Entladung für kurze Zeit reversibel permeabilisiert, wodurch die Aufnahme von Plasmiden möglich wird (Calvin und Hanawalt, 1988).

#### 5.1.2.1 Herstellung elektrokompenter *E.coli*

Das Protokoll dient der Gewinnung elektrokompenter DH10B und BJ5183. *E.coli* wurde in Kulturflaschen in LB-Medium in einem Gesamtvolumen von 1 l auf einem Schüttelinkubator (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Kulturen mit BJ5183 wurde 30 µg/ml Streptomycin zugesetzt (Hanahan 1983). Die Dichte der Kultur wurde regelmäßig photometrisch in einer Quarzküvette bestimmt. Entsprechend die Extinktion, gemessen gegen bakterienfreies LB-Medium, bei 550 nm exakt einer OD von 0,6, so wurde die Kultur auf Eis für 1 h gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C bei 6000 g zentrifugiert (Sorvall RC-5B).

Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 1 l 4°C kaltem WB-Medium aufgenommen und für 30 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bevor das Pellet in 20 ml Glycerin (10%) aufgenommen und für 10 min zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 3 ml Glycerin (10%) resuspendiert und zu je 30 µl auf in Trockeneis vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Essentiell für eine hohe Kompetenz der Bakterien ist die Kontinuität der Kühlkette während der gesamten Wasch- und Zentrifugationsschritte.

#### 5.1.2.2 Elektroporation von Bakterien

Zur Transformation der elektrokompetenten *E.coli* wurden Aliquots à 30 µl auf Eis aufgetaut und mit der DNA in einer gekühlten Elektroporationsküvette vermischt. Die Elektroporation erfolgte bei 1700 V, 25 µFarad, 201 Ohm für 0,05 Sekunden.

Die Bakteriensuspension wurde unmittelbar nach der Elektroporation in 1 ml LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum aufgenommen, bei 37°C für 1 h auf einem Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Die kurze Inkubation in Medium, welches kein Selektionsantibiotikum enthält, dient der Regeneration der Bakterien nach der elektrischen Entladung und der Transformation während der exponentiellen Wachstumsphase. Die über Nacht bei 37°C entstandenen Klone wurden isoliert und in antibiotikahaltigem LB-Medium für Mini- oder Maxi-plasmidpräparationen weitergezüchtet.

#### 5.1.2.3 Bestimmung der Elektrokompetenz

Die Elektrokompetenz der Bakterien wird durch die Anzahl transformierter Kolonien quantifiziert, welche 20 µl eines Stocks elektrokompetenter *E.coli* pro ng eingesetzter DNA eines Referenzplasmids erzielt.

Dazu wurden standardisierte Transformationen mit psL1180 durchgeführt. Es wurden 20µl des Stocks mit 10 ng psL1180 (1 µl) vermischt und elektroporiert. Nach Inkubation der Bakteriensuspension in 1 ml LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttelinkubator wurde eine Verdünnungsreihe in LB-Medium (je 1000 µl Gesamtvolumen pro Verdünnungsstufe) hergestellt und die Verdünnungen von 1:100 – 1:10 000 auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 16-20h bei 37°C wurden die sichtbaren Kolonien gezählt und auf die eingesetzte DNA umgerechnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verdünnungsschritte zur Bestimmung der Elektrokompentz mit psL1180 transformierter *E.coli*. Master: auf 1000  $\mu\text{l}$  verdünnter Transformationsansatz. Je Verdünnungsstufe wird 1/10 auf 1000  $\mu\text{l}$  verdünnt. Ausplattiert wurde auf ampicillinhaltige Agarplatten.

Verdünnungsstufe	enthaltene DNA	Ausplattiert	Ausplattierte DNA
Master	10 ng = $10^{-8}\text{g}$	-	-
1:10	$10^{-9}\text{g}$	-	-
1:100	$10^{-10}\text{g}$	100 $\mu\text{l}$	$10^{-11}\text{g}$
1:1 000	$10^{-11}\text{g}$	100 $\mu\text{l}$	$10^{-12}\text{g}$
1:10 000	$10^{-12}\text{g}$	100 $\mu\text{l}$	$10^{-13}\text{g}$

Auswertung: Nach einer Inkubationszeit von 16-20h bei 37°C. Aus den Zahlen für die Kolonien pro Picogramm wurde ein Mittelwert gebildet, und dieser auf Nanogramm umgerechnet.  $1 \times 10^4$  Kolonien pro ng sind ein Durchschnittswert.

Verdünnung	Kolonien	DNA	Kolonien / pg DNA
1:100	X	$10^{-11}\text{g}$	X / 10
1:1000	Y	$10^{-12}\text{g}$	Y
1:10 000	Z	$10^{-13}\text{g}$	Z x 10

### 5.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

#### 5.1.3.1 Miniplasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen in großer Zahl, etwa zum Screenen auf erfolgreiche Ligation, wurde ein Protokoll verwendet, welches die alkalisch Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und die Phenolchloroformextraktion (Sambrook et al. 1989) kombiniert. Zunächst wird eine alkalische Lyse der Bakterien vorgenommen. In einem schmalen pH-Bereich von ca. 12 – 12,5 denaturiert chromosomale, nicht aber Plasmid-DNA. Wird ein alkalisches Bakterienlysat unter Gegenwart von SDS mittels Natriumacetat neutralisiert, so renaturiert die chromosomale DNA teilweise unter Bildung eines unlöslichen Aggregats. Ferner werden RNA und SDS-Protein-Komplexe ausgefällt. Eine anschließende Phenolchloroformextraktion und Ethanol-fällung entfernt verbliebene Proteine und Salze und erlaubt eine hohe Ausbeute hochaufgereinigter Plasmid-DNA.

### Alkalische Lyse

Bakterienkolonien wurden von Agarplatten selektiert und in jeweils 5 ml LB-Medium bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator (300 rpm) inkubiert.

Die Bakterien von jeweils ca. 1 ml Suspension wurden in einer Zentrifuge (Biofuge) bei 20 000 g pelletiert und in 300 µl Lyselösung aufgenommen, auf einem Vortex gründlich durchmischt und auf Eis 5 min inkubiert.

Nach Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat- Lösung (pH 5,2) und erneutem Vortexen wurden die Lösung bei 4°C und 20 000 g für 2 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### Phenolchloroformextraktion

Den gewonnenen Überständen wurden 1000 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt und gründlich durchmischt. Nach einer Zentrifugation bei 20 000 g für 5 min (4°C) (Biofuge) entstehen zwei Phasen, die durch eine Interphase getrennt sind. Die obere wäßrige Phase enthält die DNA, in der Interphase befinden sich Proteine. Zelltrümmer reichern sich in der unteren phenolhaltigen Phase an. Die oberste Phase wurde jeweils entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

### Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung erfolgte zum Entfernen von Phenolresten. DNA kann in Gegenwart von einwertigen Kationen und Ethanol aus wäßrigen Lösungen präzipitiert werden. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) stellt sicher, daß der Plasmid-DNA die Hydrathülle entzogen wird.

Die DNA-Lösungen wurden mit je 1/10 Volumen Natriumacetat und dem 2,5 fachen Volumen Ethanol absolut (-20°C) versetzt. Die Gemische wurden gründlich gevortext und 5 min bei 20 000 g (4°C) zentrifugiert. Die Pellets wurden zum Entfernen restlicher Salze in 200 µl 70% Ethanol (4°C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Pellets kurz luftgetrocknet, bevor sie wahlweise in Aqua bidest oder TE +RNaseA aufgenommen werden.

Die Ethanol-fällung wurde analog auch zum Reinigen/Entsalzen von restriktionsverdauter DNA außerhalb des Protokolls für Miniplasmidpräparationen verwendet.

#### 5.3.1.2 Maxiprep mittels Nucleobond AX500 Maxiprep Kit (Macherey & Nagel, Düren)

Die Pärparation größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleobond AX500 Maxiprep Kit gemäß Herstellerangaben. Das Prinzip des Protokolls basiert auf einem

Anionenaustauscherharz. Nach einer alkalischen Lyse der Bakterien wird, abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert, Plasmid-DNA an einer Säule gebunden, während Zelltrümmer, Proteine, RNA und sonstige Verunreinigungen in Waschschrinen entfernt werden. Die gereinigte Plasmid-DNA läßt sich anschließend von der Säule eluieren und mittels einer Isopropanolfällung entsalzen. Für die exakten Zusammensetzungen der genannten Lösungen sei auf die Gebrauchsanweisung des Herstellers verwiesen.

Jeweils ein Liter selektionsantibiotikahaltiges LB-Medium wurde mit plasmidtragenden Bakterienstämmen angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden dann bei 4°C für 10 min bei 6000 g pelletiert (Sorvall RC 5B) und anschließend in S1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine alkalische Lyse durch Zugabe von S2-Puffer (NaOH und SDS) und vorsichtiges Mischen. Bakterienmembranen wurden dadurch aufgebrochen, Proteine und chromosomale DNA denaturiert und RNA durch die im S1-Puffer enthaltene RNase degradiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat (S3-Puffer) wurde die Suspension neutralisiert und Protein-SDS-Komplexe gefällt. Die Suspension flockte aus und wurde durch Filterpapier gereinigt.

Die filtrierte Lösung war nun von Zelltrümmern und chromosomaler DNA weitgehend befreit und wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Plasmid-DNA, gebunden an das Ionenaustauscherharz, wurde mit N3-Puffer dreimal gewaschen. Die Lösung und Waschpuffer durchliefen die Säule bei 1 g. Im Folgenden wurde die Plasmid-DNA mit dem N5-Puffer im alkalischen Bereich eluiert.

Es schloß sich eine DNA-Präzipitation mit Isopropanol an, dieser wurde im Überschuß zugegeben und das Gemisch bei 4°C für 30 min bei 11 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70%igem Ethanol von Salzen gereinigt und erneut bei 4°C und 20 000 g für 10 min sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde nach kurzer Lufttrocknung in 200 µl Aqua bidest aufgenommen.

#### **5.1.4 Photometrische Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen**

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren eignet sich die Extinktionsmessung.

Die Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren absorbieren Licht mit einem Absorbptionsmaximum bei 260 nm. Protein hingegen zeigt sein Absorbptionsmaximum bei 280 nm, verursacht durch aromatische Seitenketten.

50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngige RNA erzielt eine Absorbtion von 1.

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch den Absorbtionskoeffizienten läßt sich zudem der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren abschätzen. So ist von einer Verunreinigung mit Protein auszugehen, wenn das Verhältnis der Absorbtionen bei 260 nm und 280 nm unter 1,8 liegt.

Die Extinktionsmessungen der verdünnten DNA-Proben wurden in einer Quarzküvette gegen einen Nullwert durchgeführt.

### **5.1.5 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Zur Isolation von verdauter und linearisierter DNA aus Agarosegelen wurde das GeneClean III Kit (MP Biomedicals, Heidelberg) verwendet.

Das Funktionsprinzip beruht auf der Bindungsfähigkeit von DNA an Sillikatperlen. Die im Kit enthaltene Glasmilch bindet selektiv DNA in salzhaltiger Umgebung und gibt diese bei niedrigem Salzgehalt wieder frei.

Die Isolierung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für die genaue Zusammensetzung der Lösungen sei auf die Gebrauchsanweisung des Herstellers verwiesen.

Verdaute und linearisierte DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht-Kontrolle mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gewicht der entnommenen Agarosegele wurde bestimmt und die enthaltene DNA-Menge geschätzt. Die Gelstückchen wurden in einem Reaktionsgefäß mit dem 2-3fachen Volumen 6M NaI-Lösung versetzt und unter gelegentlichem Schwenken bei 55°C inkubiert, bis die Agarose vollständig geschmolzen war.

Sorgfältig resuspendierte Glasmilch wurde abhängig von Volumen und DNA-Gehalt der Lösung nach Herstellerkalkulation zugesetzt. Das Gemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert und anschließend bei 20 000 g für 5 min sedimentiert (Biofuge). Das Pellet wurde in eiskaltem NewWash-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert und dieser Waschschrift zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet für einige Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die gebundene DNA von den Sillikatperlen durch

sorgfältiges Resuspendieren in Aqua bidest gelöst. Nach Zentrifugation bei 20 000 g für 30 s konnte der die DNA enthaltende Überstand entnommen werden.

### 5.1.6 Ligation von DNA

Das Enzym T4 DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Phosphodieesterbrücke eines 3'Hydroxyl- mit einem 5'Phosphatrest und kann so DNA Moleküle kovalent verbinden (Armstrong et al. 1983). Die T4 DNA-Ligase kann sowohl glatte als auch überstehende Enden doppelsträngiger DNA ligieren.

Um ein Transgen in einen Vektor einzufügen, müssen beide zunächst restriktionsezymatisch verdaut, somit linearisiert und weiterhin das Transgen isoliert werden.

pCImAFP und pShuttle-CMV wurden zunächst in getrennten Ansätzen mit *KpnI* sowie mit *SalI* mit unterschiedlichen Inkubationszeiten inkubiert, um die Bedingungen für einen jeweils vollständigen Verdau zu ermitteln. Der Erfolg der enzymatischen Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft. Nach 420 min waren die Plasmide vollständig linearisiert.

Jeweils 20 µg pCImAFP wurden daraufhin mit jeweils 100 U *KpnI* bzw. *SalI* in einem Gesamtvolumen von 60 µl für 420 min bei 37°C inkubiert.

Ferner wurden jeweils 15 µg pShuttle-CMV mit jeweils 80 U *KpnI* bzw. *SalI* in einem Gesamtvolumen von ebenfalls 60 µl für 420 min bei 37°C inkubiert.

Ansätze:

pCImAFP	20 µl (= 20 µg)
Puffer 1 (NewEnglandBiolabs)	5 µl (10x)
BSA	5 µl (10x)
Aqua bidest	10 µl
<i>KpnI</i>	10 µl (= 100 U)
pCImAFP	20 µl (= 20 µg)
Puffer für <i>SalI</i> (NewEnglandBiolabs)	5 µl (10x)
BSA	5 µl (10x)
Aqua bidest	15 µl
<i>SalI</i>	5 µl (= 100 U)

pShuttle-CMV	42 $\mu$ l (= 15 $\mu$ g)
Puffer 1 (NewEnglandBiolabs)	7 $\mu$ l (10x)
BSA	7 $\mu$ l (10x)
Aqua bidest	6 $\mu$ l
<i>KpnI</i>	8 $\mu$ l (= 80 U)
pShuttle-CMV	42 $\mu$ l (= 15 $\mu$ g)
Puffer für <i>SalI</i> (NewEnglandBiolabs)	7 $\mu$ l (10x)
BSA	7 $\mu$ l (10x)
Aqua bidest	10 $\mu$ l
<i>SalI</i>	4 $\mu$ l (= 80 U)

Der Erfolg des quantitativen Verdauts wurde elektrophoretisch überprüft. Die DNA wurde anschließend ethanolgefällt (siehe: 5.1.3).

In einem zweiten Schritt wurde die cDNA von mAFP aus dem linearisierten Plasmid pCImAFP exzidiert, bzw. bei dem bereits linearisierten pShuttle-CMV ein korrespondierendes überhängendes Ende eingefügt.

Dazu wurden die ethanolgefällten Restriktionsansätze mit dem jeweils 2. Enzym für 420 min bei 37°C inkubiert:

pCImAFP (mit <i>SalI</i> verdaut)	40 $\mu$ l (= 15 $\mu$ g)
Puffer 1 (NewEnglandBiolabs)	6 $\mu$ l (10x)
BSA	6 $\mu$ l (10x)
<i>KpnI</i>	8 $\mu$ l (= 80 U)
pCImAFP (mit <i>KpnI</i> verdaut)	40 $\mu$ l (= 15 $\mu$ g)
Puffer für <i>SalI</i> (NewEnglandBiolabs)	6 $\mu$ l (10x)
BSA	6 $\mu$ l (10x)
Aqua bidest	4 $\mu$ l
<i>SalI</i>	4 $\mu$ l (= 80 U)
pShuttle-CMV (mit <i>SalI</i> verdaut)	36 $\mu$ l (= 9 $\mu$ g)
Puffer 1 (NewEnglandBiolabs)	6 $\mu$ l (10x)

BSA	6 µl (10x)
Aqua bidest	6 µl
<i>KpnI</i>	6 µl (= 60 U)
pShuttle-CMV (mit <i>KpnI</i> verdaut)	36 µl (= 9 µg)
Puffer für <i>SalI</i> (NewEnglandBiolabs)	6 µl (10x)
BSA	6 µl (10x)
Aqua bidest	9 µl
<i>SalI</i>	3 µl (= 60 U)

Der Erfolg des quantitativen Umsatzes wurde elektrophoretisch überprüft. Die Ansätze wurden auf einem präparativen Gel aufgetragen und die DNA daraus eluiert (siehe: 5.1.5).

In möglichst geringem Reaktionsvolumen von 10-20 µl wurde linearisierter Vektor, exzidiertes Transgen und T4 DNA-Ligase in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und ATP inkubiert. Die Menge der eingesetzten DNA orientierte sich an folgender Formel:

$$\text{Insert (ng)} = \text{Insert (kb)} / \text{Vektor (kb)} \times \text{Vektor (ng)} \times 6$$

Mit ca. 400 U T4 DNA-Ligase wurden verschiedene Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen erprobt. Die Reaktion kann durch Erhitzen auf 65°C durch Inaktivierung der Ligase gestoppt werden.

Ligation von mAFP mit pShuttle-CMV (nach Verdau mit *KpnI* und *SalI*):

pShuttle-CMV	1 µl (= 255 ng)
mAFP	1,6 µl (= 430 ng)
T4 DNA-Ligase Puffer	1 µl
Aqua bidest	5,4 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl (400 U)

Inkubationen erfolgten bei 4°C für 16h, sowie für 10 min und bis zu 16h bei Raumtemperatur (Sambrook et al. 1989). Der Ligationsansatz wurde im weiteren in elektrokompetente *E.coli* (DH10B) elektroporiert und der Erfolg der Ligation mittels restriktionsenzymatischem Verdau aus Mini-Plasmidpräparationen der gewachsenen Kolonien überprüft.

### 5.1.7 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Orientierung des Inserts in sein Vektorplasmid wurden externe DNA-Sequenzierungen in Auftrag gegeben. Die einklonierte cDNA muß in 5' –3' Richtung downstream der vektoreigenen Promotoren zu liegen kommen.

Die HotShot-Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) erlaubt Sequenzierungen von bis zu 900 Basen. Dazu wurde die zu analysierende DNA zusammen mit dem Primer in Tris-Puffer in PCR-Reaktionsgefäßen eingeschickt. Die Primer wurden derart gewählt, daß die Ligationsstellen von Transgen und Vektor sequenziert wurden.

### 5.1.8 Homologe Rekombination von Backbone und Transferplasmid in *E.Coli*

Homologe Rekombination bezeichnet den Austausch von DNA-Abschnitten zwischen zwei, aufgrund von Sequenzhomologien aneinandergelagerten, doppelsträngigen DNA-Molekülen. Dabei kommt es zum DNA-Strangbruch und zur gekreuzten Wiedervereinigung. Liegen mehrere getrennte übereinstimmende DNA-Sequenzen vor, können schleifenartig überstehende Anteile zwischen den homologen Abschnitten verloren gehen oder in ein größeres DNA-Molekül (z.B. ein Chromosom oder ein Vektor) eingefügt werden (Alberts et al. 1994). Essentiell für erfolgreiche Rekombinationen in *E.coli* ist insbesondere Anwesenheit der *recA* Rekombinase (Cassuto et al. 1981).

Für die homologe Rekombination nach dem AdEasy-System (He et al. 1998) wurden elektrokompente *E.coli* BJ5183 mit dem ringförmigen AdEasy-1 Backbone-Plasmid und dem Transfervektor transformiert. Der pShuttle-CMV-Vektor muß vor der homologen Rekombination, vorzugsweise mit *PmeI*, linearisiert werden. Die Schnittstelle muß zwischen dem linken und rechten Arm der adenoviralen Sequenzen des Vektors liegen.

Nach dem Verdau der Plasmide wurde zunächst eine Ethanol-fällung zum Entsalzen des Restriktionsansatzes durchgeführt, da ansonsten die Transformationseffizienz nach der Elektroporation zu gering wäre (Calvin und Hanawalt, 1988). Elektroporiert wurden, unter den üblichen Bedingungen, ca. 100 ng Backbone-Vektor und die 2-5 fache Menge linearisierter Transfer-Vektor. Entgegen dem üblichen Elektroporationsprotokoll werden nach erfolgter Elektroporation die Bakterien in 500 µl LB-Medium aufgenommen und lediglich 10 -20 min bei 37°C im Rüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension auf vier kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C für 20h inkubiert.

Die kleinsten Kolonien wurden unter sterilen Kautelen selektiert und in kanamycinhaltigen LB-Medien zum Screenen mittels Miniplasmidpräparation und Restriktionsverdau gezüchtet. Die Auswahl der kleinen Kolonien ist darin begründet, daß Bakterien, welche das große rekombinante Backboneplasmid tragen, langsamer wachsen als jene, welche lediglich das kleine religierte Transferplasmid enthalten.

Die Klone enthalten entweder das rekombinierte Plasmid, oder nur religiertes Transferplasmid oder gelegentlich sowohl den Backbone-Vektor und religiertes Transferplasmid. Nach der Identifikation eines Klons, welcher das gewünscht rekombinierte Plasmid trägt, schloß sich die Transformation von *E.coli* DH10B Bakterien mit dem neuen Vektor an. Das Plasmid ist aufgrund der fehlenden *recA* Rekombinase im Stamm DH10B stabiler und es werden größere Ausbeuten in Plasmidpräparationen erzielt.

#### 5.1.8.1 Homologe Rekombination von pAdEasy1 und pShuttle-CMV-mAFP

Abweichend vom üblichen Vorgehen wurde der Transfervektor pShuttle-CMV-mAFP nicht mit *PmeI* linearisiert, da die Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzym in der cDNA von mAFP vorkommt. Stattdessen wurde die Endonuklease *EcoRI* ausgewählt.

Ansatz:

pShuttle-CMV-mAFP	10 µl (6,5 µg)
Puffer für <i>EcoRI</i>	3 µl (10x)
Aqua bidest	12 µl
<i>EcoRI</i>	5 µl (100 U)

Der Ansatz wurde für 4h bei 37°C inkubiert, um pShuttle-CMV-mAFP vollständig umzusetzen und anschließend ethanolgefällt. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde gelelektrophoretisch und restriktionsenzymatisch überprüft

200 µg des linearisierten und ethanolgefällten Plasmids pShuttle-CMV-mAFP wurden mit 100 µg pAdEasy1, sowie 20 µl elektrokompenter *E.coli* BJ5183 vermischt.

pShuttle-CMV-mAFP	0,5 µl (200 µg)
linearisiert mit <i>EcoRI</i>	
pAdEasy1	1 µl (100 µg)
elektrokompente <i>E.coli</i> BJ5183	20 µl

Die Bakterienmischung wurde, wie beschrieben, in 500 µl LB-Medium aufgenommen und bei 250 rpm für 10 min auf einem Rüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Suspension auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Klone selektiert, damit jeweils 5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium beimpft und diese für 18h bei 250 rpm im Rüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Nach 18 h wurden Miniplasmidpräparationen durchgeführt und die gewonnene DNA restriktionsenzymatisch mit *PacI* auf homolog rekombinierte Plasmide gescreent.

#### 5.1.8.2 Homologe Rekombination von pAdEasy1 und pAdTrackCMV

Der Tranfevektor pAdTrackCMV wurde mit *PmeI* linearisiert und zusammen mit pAdEasy1 in elektrokompente *E.coli* BJ5183 transferiert.

Ansatz:

pAdTrackCMV	5 µl (4 µg)
BSA	1,5 µl (10x)
Puffer 4 (New EnglandBiolabs)	1,5 µl (10x)
Aqua bidest	3 µl
EcoRI	4 µl (40 U)

Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, um pAdTrackCMV vollständig umzusetzen und anschließend ethanolgefällt. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde gelelektrophoretisch und restriktionsenzymatisch überprüft. 200 µg des linearisierten und ethanolgefällten Plasmids pAdTrackCMV wurden mit 100 µg pAdEasy1, sowie 20 µl elektrokompenter *E.coli* BJ5183 vermischt.

pAdTrackCMV linearisiert mit <i>PmeI</i>	3 µl (200 µg)
pAdEasy1	1 µl (100 µg)
elektrokompente <i>E.coli</i> BJ5183	20 µl

Die Elektroporation erfolgte bei 1700 V, 201 Ohm und 25 µF für 5 msec. Die Bakterienmischung wurde, wie beschrieben, in 500 µl LB-Medium aufgenommen und bei 250 rpm für 10 min auf einem Rüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Suspension auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden Klone selektiert, damit jeweils 5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium beimpft und

diese für 18h bei 250 rpm im Rüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Nach 18h wurden Miniplasmidpräparationen durchgeführt und die gewonnene DNA restriktionsenzymatisch mit *PacI* auf homolog rekombinierte Plasmide gescreent.

### **5.1.9 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Transkription eines Gens in mRNA läßt sich durch die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion nachweisen. Dazu wird die RNA einer Zelle isoliert, in komplementäre DNA durch reverse Transkriptase umgeschrieben und anschließend das nachzuweisende Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und durch Gelelektrophorese dargestellt.

#### 5.1.9.1 Extraktion von RNA aus eukaryoten Zellen

Zur Isolation von RNA wurde das GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit von Sigma-Aldrich nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. für die exakte Zusammensetzung der Puffer sei auf die Gebrauchsanweisung des Herstellers verwiesen.

In 6-Well-Platten kultivierte Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysispuffer bedeckt. Der Lysispuffer, dem  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben wird, enthält Guanidin-Thiocyanat. Die Zellen wurden somit lysiert und RNAsen inaktiviert. Nach kurzer Inkubation von einigen Minuten wurde die zähe Suspension in die Filtrationssäule überführt und bei 20 000 g für 2 min zentrifugiert (Microfuge Lite), um Zelltrümmer und chromosomale DNA abzutrennen.

Das Filtrat wurde zu gleichen Teilen mit RNase freiem Ethanol (70%) vermischt, und in Sillikatsäulen überführt, welche verbleibende Nukleinsäuren in Gegenwart von Ethanol hochaffin binden. Mit Waschpuffern wurde die gebundene RNA von verbliebenem Protein und Zelldebris gereinigt. Die Waschschrte wurden mittels Zentrifugation bei 12 000 g durchgeführt. Mit der Elutionslösung ließ sich die RNA von der Säule lösen, in der Zentrifuge auffangen und in RNase-inaktivierte Reaktionsgefäße überführen.

#### 5.1.9.2 DNase-Verdau

Um die Präparierte RNA von DNA-Kontaminationen zu befreien fand anschließend ein DNA-Ribonuklease-Verdau statt. In Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  degradiert DNase I einzel- und doppelsträngige DNA vollständig (Sambrook et al. 1989).

Ca. 30  $\mu$ l RNA-haltige Elutionslösung wurden mit 50 U DNase I und mitgeliefertem Puffer (10x) bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Reaktionsvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf die

optimale Pufferkonzentration eingestellt. Der Verdau wurde im Heizblock bei 70°C für 5 min durch Inaktivierung der DNase gestoppt.

RNA	30 µl
DNase Puffer	4 µl
DEPC-Wasser	1 µl
DNase I	5 µl

### 5.1.9.3 Reverse Transkription

Nach Degradation der kontaminierenden DNA kann die verbliebene RNA durch die reverse Transkriptase aus dem *Molony Murine Leukemia Virus* (M-MLV) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Roth et al. 1985).

Dazu wurde RNA nach DNase-Verdau mit *random primer* versetzt und auf 70°C erhitzt, um die Bindung der Primer ungehindert durch Sekundärstrukturen der RNA zu gewährleisten.

Für 1 µg RNA wurden 0,5 µg Random Primer eingesetzt. Nach 5 min wurde der Ansatz sofort auf Eis heruntergekühlt, um die Reformation von Verwindungen, Haarnadelstrukturen oder Hybridisierungen zu verhindern.

Die mit Primern versetzte RNA wurde mit der M-MLV Reversen Transkriptase, dem beigefügten Puffer (5x) sowie ausreichenden Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) inkubiert. Der Reaktion wurde RNAsin Ribonukleaseinhibitor zugegeben, um eine Degradation der RNA zu verhindern (Blackburn et al. 1977). Das Reaktionsvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf die optimale Pufferkonzentration eingestellt.

RNA aus DNase-Ansätzen	5 µl (= ca. 2 µg)
Random Primer	0,73 µl (0,5 µg/µl)

Inkubation für 5 min bei 70 °C, dann auf Eis und Zugabe von:

M-MLV Puffer	4 µl (5x)
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl (200 U)
dNTP	2,5 µl (20 mM)
DEPC-Wasser	6 µl
RNAsin	0,7 µl (40 U/µl)

Die rT-Reaktion verlief bei 37°C für 1 Stunde in RNase-inaktivierten Reaktionsgefäßen.

#### 5.1.9.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Sequenzen durch Verwendung der thermostabilen Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq) und spezifische Oligonukleotid-Primer (Innis et al. 1988).

Durch die zyklische Abfolge von Denaturierung des DNA-Doppelstrangs durch Hitze, Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) bei individuell zu wählender Temperatur und Polymerisation im Bereich des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase wird die zu amplifizierende Sequenz exponentiell vervielfältigt.

Verwendet wurde der REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), welcher bereits Taq-Polymerase,  $Mg^{2+}$ , dNTP, Puffer (2x) und einen Farbstoff enthält. Der Farbstoff erlaubt die sofortige Beladung eines Agarosegels nach erfolgter PCR. Die Zugabe von Probenpuffer für die Gelelektrophorese ist somit nicht notwendig.

Reaktionsansatz:

ReadyMix (incl. 1,5 U Taq-Polymerase)	25 µl
<i>forward</i> Primer (10µM)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (10µM)	2,5 µl
PCR-Aqua bidest.	15 µl
DNA-Template (rT-Produkt)	5 µl

Verwendung fanden dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml).

Einstellungen des Thermocyclers:

	5 min	94°C	Denaturierung
30 Zyklen:			
1.	1 min	94°C	Denaturierung
2.	1 min	61°C	Annealing
3.	1 min	72°C	Polymerisation
Anschließend:			
	10 min	72°C	Polymerisation
	∞	4°C	

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den eingesetzten Oligonukleotid-Primern und wurde durch Austestung verschiedener Temperaturen ermittelt.

## 5.2. Proteinbiochemie

### 5.2.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

#### 5.2.1.1 Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen

Zur Extraktion zellulärer Proteine wurden Zellen in 6-Well-Platten kultiviert und mit Trypsin-EDTA oder einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß zweimal mit PBS gewaschen. Die nötigen Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur, 1 200 rpm für 5 min statt (Megafuge). Das gewaschene Zellpellet wurde in 100 µl DC-Lysispuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach Sedimentation bei 13 000 rpm (Biofuge) bei 4°C für 5 min wurde der proteinhaltige Überstand entnommen, dessen Proteinkonzentration bestimmt und bei -20°C gelagert.

#### 5.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte kam das DC-Protein Assay von BioRad zur Anwendung. Vorgegangen wurde nach Herstellerangaben. Für die genaue Zusammensetzung der Reagentien sei auf die Gebrauchsanweisung des Herstellers verwiesen. Die Funktionsweise beruht auf einem photometrischen Abgleich der proteinhaltigen Extrakte mit einer Eichgerade bestehend aus BSA-Lösungen definierter Konzentrationen. Zunächst werden in alkalischem Milieu Protein-Kupfer-Komplexe gebildet, welche in einem zweiten Schritt Folin reduzieren und somit einen blauen Farbstoff bilden (Lowry et. al 1951).

Aus BSA wurde die Eichgerade in Konzentrationen von 0,15 µg/µl bis 6 µg/µl erstellt. Aus den gelieferten Lösungen A und S wurde die kupfertartrathaltige Lösung A' frisch angesetzt.

Eine 96-Well Mikrotiterplatte wurde mit je 25 µl Lösung A' und je 5 µl Proteinextrakt bzw. Eichlösung pro Well beschickt. Jeder Ansatz wurde dann mit 200 µl Folinreagenz (Lösung B) versehen und bei Raumtemperatur in Dunkelheit 15 min inkubiert.

Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm.

### 5.2.2 Auftrennung von Proteinen und Nachweis von mAFP mittels Western Blot

#### 5.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. SDS denaturiert Proteine vollständig und überlagert deren Eigenladung. Die Laufstrecke eines Proteins ist, in einem gewissen Korridor, somit lediglich abhängig von Laufgel und

Molekulargewicht, welches anhand des Vergleichs mit einem Markerprotein abgelesen werden kann.

Das Laufgel besteht aus einem Sammelgel (pH 6,8), welches der Konzentration der eingesetzten Proteinlösung dient, und einem stärker quervernetzten Trenngel (pH 8,7), in welchem die Separation entsprechend des Molekulargewichts erfolgt.

Es wurden 4,5%ige Sammel- und 10%ige Trenngele verwendet. Die Auftrennung der in Probenpuffer eingesetzten Proteinextrakte erfolgte bei Raumtemperatur in Laufpuffer bei 90 - 130 V (Laemmli 1970; Weber und Osborn, 1969).

#### 5.2.2.2 Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden bei Raumtemperatur in einem halbtrockenen Verfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen und so immobilisiert. Vier Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Auf die positive Blotelektrode wurden zwei Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wiederum zwei Filterpapiere gestapelt. Die Filterpapiere überragten Gele und größenäquivalente Membranen an allen Seiten. Luftblasen und überschüssiger Puffer wurden ausgestrichen. Die Blotkammer wurde mit der negativen Elektrode verschlossen und für den Transfer wurde für 25 min eine Spannung von 25 Volt angelegt (Kyhse-Andersen, 1984).

#### 5.2.2.3 Immunologischer Nachweis

Über Nacht wurden die Nitrozellulosemembranen bei 4°C in TBST-blocking-Solution inkubiert um unspezifische Bindungen abzusättigen, bevor die Membranen bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert wurden.

Dafür wurde nach einmaligem Waschen in TBST-Puffer verdünntes (1: 2000) anti-mAFP-Kaninchenserum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach insgesamt sechs Waschgängen mit TBST-Puffer zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dieser ist ein Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper, an welchen Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*: HRP) gebunden ist. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur für 60 min auf einem Schüttler. Nach weiteren sechs Waschgängen wurden die Membranen für zwei Minuten mit SuperSignal West Pico Enhanced Chemilumineszenzlösung inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte

Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, wodurch Lumineszenz entsteht (Gillespie und Hudspeth, 1991).

Durch das Auflegen und Belichten von Röntgenfilmen wurde die Lumineszenz dokumentiert

## **5.3. Zellbiologie**

### **5.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen vorzubeugen, wurden sämtliche Arbeiten mit Zellen unter sterilen Kautelen unter einer Laminar Flow-Werkbank durchgeführt. Die Medien waren zudem mit Penicillin und Streptomycin versetzt, wenn nicht anders angegeben.

#### 5.3.1.1 Kultur und Passage von Zelllinien

Die adhärennten Zelllinien 911, A549 und Hepa 1-6 wurden in DMEM mit Glutamax, FCS (10% v/v), Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert (komplettes DMEM). Bei Erreichen von >90% Konfluenz (jeweils ca. alle 48 –72 h) wurden die Zellen passagiert, d.h. abgelöst und mit frischem Medium zu i.d.R. einem sechstel neu ausgesät. Verwendung fanden i.d.R. T175-Zellkulturflaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde der Überstand entfernt, der Zellrasen mit PBS behutsam gewaschen und die Zellen in Trypsin-EDTA inkubiert.

Murine dendritische Zellen wurden in RPMI mit Glutamax, FCS (10% v/v) Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), HEPES (25 mM), β-Mercapto-Ethanol (0,05 mM) kultiviert (DC-Medium), dem Medium wurde mGM-CSF (200 U/ml) und mIL-4 (20 ng/ml) zugesetzt (komplettes DC-Medium). Verwendung fanden 6-Well-Zellkulturplatten.

#### 5.3.1.2 Einfrieren von Zelllinien

Zur mittel- oder langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden diese in Gegenwart von DMSO eingefroren. DMSO verhindert die Ausbildung von Eiskristallen.

Die Zellen einer zu 90% dicht bewachsenen T75 Zellkulturflasche wurden mittels 3 ml Trypsin-EDTA gelöst. Die Trypsinwirkung wurde dann durch Zugabe von komplettem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 500 rpm (Megafuge) sedimentiert

und das Pellet in 3ml FCS mit DMSO (10% v/v) resuspendiert. Die Suspension wurde zu je einem Milliliter in einem Kryoröhrchen in einer Styroporverpackung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach 24h in einen Flüssigstickstofftank überführt. Die Zwischenlagerung in Styropor ermöglicht eine langsame Abkühlung um ca.  $1^{\circ}\text{C}$  pro Stunde.

#### 5.3.1.3 Auftauen von Zelllinien

Um in Stickstoff gelagerte Zellen aufzutauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, der Inhalt in 10 ml komplettes Medium (DMEM oder RPMI) überführt und 5 min bei 1 200 rpm abzentrifugiert (Megafuge), um das DMSO auszuwaschen. Das Pellet wurde in komplettem Medium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit mindestens 30 ml komplettem Medium überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, das Medium nach 24 h erneuert.

#### 5.3.1.4 Bestimmung der Zellzahlen mittels der Neubauer-Zählkammer.

Zur Bestimmung von Zellzahlen wurde eine 10  $\mu\text{l}$ -Probe einer (u.U. 1:10 verdünnten) Zellsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  einer Trypanblaulösung (0,2%) vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Trypanblau ist ein Farbstoff, welcher vitale Zellen nicht anzufärben vermag, da er nur durch defekte Zellmembranen dringt. Unter 40facher Vergrößerung wurden die lebenden Zellen von 4 Quadranten (jeweils 16 Quadrate) ausgezählt und das arithmetische Mittel für den Verdünnungsschritt mit Trypanblau verdoppelt. Der resultierende Wert multipliziert mit  $10^4$  entspricht der Zellzahl pro Milliliter (der u.U. verdünnten) Ausgangssuspension.

### 5.3.2 Transfektion eukaryoter Zellen mittels Lipofektion

Zur Transfektion von 911-Zellen mit den erstellten linearisierten, rekombinanten Backbone-Vektoren (pAdmAFP und pAdGFP) wurde eine Lipofektion mit Lipofectamine (Invitrogen, Mannheim) durchgeführt. Der Vorgang der Lipofektion bezeichnet das Einbringen von Molekülen, z.B. DNA, in Zellen mit Hilfe von kationischen Lipiden. Letztere bilden Micellen oder Liposomen, welche negativ geladene Moleküle einschließen können und von den Zielzellen entweder über Pinocytose aufgenommen werden, oder direkt mit der Zellemembran verschmelzen. In beiden Fällen werden die zuvor eingeschlossenen Moleküle im Zytosol freigesetzt (Hawley-Nelson et al. 1993).

$1 \times 10^6$  911 Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50% für etwa 24h inkubiert. Ca. 6  $\mu\text{g}$  *PacI*-verdauter rekombinanter Backbone-Vektor und 60  $\mu\text{l}$  Lipofectamine wurden jeweils in 300  $\mu\text{l}$  Optimem-Medium gelöst und im Anschluß miteinander vermischt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 45 min inkubiert.

Die zu transfizierenden Zellen wurden dreimal mit Optimem gewaschen um Serum und Antibiotika zu entfernen und letztlich mit einer Menge von 2,4 ml Optimem bedeckt. Der Lipofectamine/DNA-Ansatz wurde nun vorsichtig zum Zellüberstand hinzugegeben und die Zellkulturflaschen 6 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor der Überstand entfernt und durch komplettes DMEM ersetzt wurde. Das Auftreten typischer zytopathischer Effekte innerhalb von ca. 7 Tagen zeigte den Erfolg der Transfektion und die Produktion von adenoviralen Vektoren an. Verschiedene Inkubationsbedingungen und Enzymkonzentrationen wurden getestet, um einen vollständigen Verdau von pAdmAFP mit *PacI* zu erreichen.

Ansatz:

pAdmAFP	10 $\mu\text{l}$ (14 $\mu\text{g}$ )
Puffer 1	3 $\mu\text{l}$ (10x)
BSA	3 $\mu\text{l}$ (10x)
<i>PacI</i>	14 $\mu\text{l}$ (140 U)

Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, gelelektrophoretisch auf Vollständigkeit des Verdau überprüft und ethanolgefällt.

pAdGFP wurde ebenfalls unter diesen Bedingungen linearisiert.

### 5.3.3 Amplifikation adenoviraler Vektoren

Nach erfolgter Lipofektion in T25-Zellkulturflaschen ist die Menge der produzierten Vektoren noch sehr gering, weshalb zunächst eine weitere einzelne T25 Zellkulturflasche transduziert werden muß, bevor in einem weiteren Schritt eine größere Menge von Zellen in einer T175-Zellkulturflasche transduziert werden kann. Aus der Ernte einer T175-Zellkulturflasche läßt sich dann im weiteren Verlauf eine Vielzahl von T175-Zellkultrufaschen simultan zur Gewinnung großer Vektormengen transduzieren.

Bis zur Ernte der adenoviralen Vektoren aus transduzierten 911 Zellkulturen wurde das Erscheinen typischer zytopathischer Effekte abgewartet. Dies ist charakterisiert durch das sukzessive Abkugeln und Lösen der Zellen, sowie den Umschlag des Farbindikators im Überstand. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die überwiegende Anzahl der adenoviralen Vektoren im Zellkern (Horwitz MS, 2001). Als optimaler Zeitpunkt wurde erachtet, wenn

mehr als 80% der Zellen abgekugelt, aber der überwiegende Teil der Zellen noch adhärent war.

#### 5.3.3.1 Ernte von adenoviralen Vektoren

Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1 300 rpm pelletiert (Megafuge). Der zellfreie Überstand enthält nur wenige Vektoren und wurde größtenteils verworfen. Einige Milliliter wurden u.U. jedoch als Reserve bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Zellpellet wurde in einer geringen Menge PBS++ mit Glycerol (10% v/v) aufgenommen: Pellets aus Lipofektierten T25-Zellkulturflaschen wurden in 300  $\mu\text{l}$  aufgenommen, während Zellpellets aus infizierten einzelnen T25, T75 oder T175-Flaschen i.A. in 1 ml resuspendiert wurden.

Anschließend erfolgte die Freisetzung der adenoviralen Vektoren durch die Lyse der Zellen durch viermaliges Einfrieren in Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Suspension wurde anschließend durch Zentrifugation bei 1 300 rpm für 5 min sedimentiert (Megafuge) und der vektorhaltige Überstand entnommen. Der Überstand wurde für Transduktionen verwendet, bzw. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 5.3.3.2 Transduktion von 911-Zellen zur Generation großer adenoviraler Stocks

Die Transduktion von 911-Zellen erfolgen in möglichst geringem Volumen zur Erhöhung der Vektorkonzentration und zur Reduktion von Diffusionsstrecken. Der erste Amplifikationsschritt nach Ernte der lipofektierten T25-Zellkulturflaschen erfolgte in einer weiteren T25-Flasche, in welche Tags zuvor  $1,5 \times 10^6$  911-Zellen ausgesät worden waren. Sie wurde mit DMEM mit 2% Pferdeserum (v/v) gewaschen und mit 700  $\mu\text{l}$  sowie den 300  $\mu\text{l}$  Vektorsuspension bedeckt. Die Flasche wurde unter gelegentlichem Schwenken für 2 h inkubiert, bevor 5 ml komplettes DMEM hinzugefügt wurde.

Nach im Mittel 5 Tagen konnte die Flasche erneut geerntet werden und der Vektor in 1 ml PBS++ mit 10% (v/v) Glycerol aufgenommen werden.

Im Anschluß wurden 911-Zellen in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen zweimal mit DMEM mit Pferdeserum (2% v/v) gewaschen. Zur Infektion wurden die Zellen mit 0,5 ml der Ernte einer T25-Flasche, sowie 3,5 ml DMEM mit Pferdeserum (2% v/v) bedeckt und im Brutschrank unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach 2 h wurde 26 ml komplettes DMEM hinzugegeben.

Nach etwa 48 h kann sich, abhängig vom zytopathischen Effekt, die Ernte wie oben beschrieben anschließen.

Um große Mengen eines Vektors ( $>10^{12}$  PFU) für die CsCl-Präparation zu erzielen, wurden eine Vielzahl ( $>30$ ) von T175 -Zellkulturflaschen mit 911-Zellen beschickt und diese bis zu einer Konfluenz von ca. 70% inkubiert.

Die Zellen wurden mit DMEM mit Pferdeserum (2% v/v) gewaschen und anschließend mit der Viruspräparation aus einer T175-Zellkulturflasche transduziert. Zur Transduktion kam pro Flasche ein Volumen von 4 ml DMEM mit Pferdeserum (2% v/v) zur Anwendung. Teilweise wurde auch bereits titrierter Vektor verwendet. In solchen Fällen kamen Multiplicities of infection (MOIs) zwischen 0,5 und 5 zur Anwendung. *Multiplicity of infection* beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis des Vektors zur zu transduzierenden Zelle. Während der Transduktion wurden die Flaschen unter gelegentlichem Schwenken im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden 26 ml komplettes DMEM zu jeder Flasche addiert.

Die Ernte erfolgte analog zum bereits beschriebenen Vorgehen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und in der Zentrifuge bei 1 200 rpm für 5 min sedimentiert (Megafuge). Die Zellpellets wurden in insgesamt 8 ml PBS++ mit Glycerol (10% v/v) resuspendiert und in einem einzelnen Reaktionsgefäß vereinigt. Nach drei Zyklen von Einfrieren und Auftauen erfolgte die Lagerung des vektorhaltigen Überstandes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur CsCl-Präparation.

#### **5.3.4 Aufreinigung adenoviraler Vektoren**

Zur Aufreinigung und Konzentration der adenoviralen Vektoren wurden eine zweifache CsCl-Gradienten-Zentrifugation und eine anschließende Dialyse durchgeführt (Fallaux et al. 1996, Graham und Prevec 1991).

Zunächst fand eine Ultrazentrifugation in einem diskontinuierlichen CsCl-Gradienten statt, um Zelltrümmer, Protein und einen Großteil defektiver Vektoren zu entfernen. Dazu wurden CsCl-Lösungen mit einer Dichte von 1,45 g/ml bzw. 1,2 g/ml hergestellt. Als Lösungsmittel diente Tris-EDTA (Tris 10mM pH 8,1, EDTA 1mM). In einem Ultraclear Tube wurden 3 ml der schweren CsCl-Lösung mit 4,5 ml der leichten CsCl-Lösung vorsichtig überschichtet. Darüber wurde wiederum der geerntete Vektor in PBS++ mit Glycerol gelegt, bis die Röhrchen vollständig gefüllt waren. Die befüllten Tubes wurden in die Titanbuckets des Ausschwingrotors (SW41) überführt und sorgfältig austariert. Bei maximaler Beschleunigung erfolgte eine Zentrifugation bei 32 000 rpm für 1 h bei  $17^{\circ}\text{C}$ . Der Rotor lief ohne Bremse aus, bevor die Röhrchen geborgen wurden.

Der Vektor hat eine Dichte von ca. 1,3 g/ml und setzt sich i.A. in zwei Banden in der Mitte der Tubes ab. Die obere, i.d.R. schwächere Bande besteht aus defektem Vektor.

Die unteren Banden wurden mittels einer Kanüle aspiriert (1-2 ml pro Tube) und in ein Optisealtube überführt. Die Tubes wurden dann luftblasenfrei mit CsCl-Lösung (1,33 g/ml) maximal aufgefüllt, verschlossen, in den Festwinkelrotor (SW50TI) verbracht und sorgfältig austariert.

Im Anschluß erfolgte die zweite Ultrazentrifugation im kontinuierlichen CsCl-Gradienten bei 40 000 rpm für 12 h bei 17°C bei maximaler Beschleunigung. Diese Zentrifugation verfolgt den Zweck, Restkontaminationen mit defektem Vektor abzutrennen. Die Zentrifuge lief bei geringer Bremskraft („low brake“) aus. Die Tubes wurden geborgen und die Vektor-Bande, welche sich in der Mitte der Röhren darstellt in einem Volumen von ca. 1 ml pro Röhren aspiriert.

Die CsCl-Lösung mit dem Vektor wurde im Anschluß in einer Dialysekammer vom CsCl befreit. Dafür erfolgten dreimal für je 30 min Dialysen gegen PBS und anschließend eine Dialyse für 30 min gegen PBS++ mit Glycerol (10% v/v). Um ein Ausfällen des CsCl zu verhindern, erfolgte die erste Dialyse bei Raumtemperatur, die nachfolgenden bei 4°C.

Der resultierende Vektorstock wurde sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße), aliquotiert (je 50 µl) und bei -80°C gelagert.

### **5.3.5 Titration adenoviraler Vektoren**

Zur Titerbestimmung wurden Plaque-Assays durchgeführt (Fallaux et al. 1996).

Dazu wurden 911-Zellen in 6-Well-Platten mit einer Verdünnungsreihe des CsCl-präparierten Vektorstocks transduziert und mit einem agarosehaltigen Medium überschichtet. Die Agarose verhindert weitgehend die Ausbreitung von nach Transduktion frisch produzierten Vektoren. Dadurch entstehen durch den zytopathischen Effekt lokal begrenzte charakteristische Plaques, welche sich unter dem Mikroskop, und teilweise bereits mit bloßem Auge, quantifizieren lassen. Die Quantifikation des Vektorgehalts des Stocks wird in Plaque forming units (PFU) pro Milliliter angegeben. Auf ein PFU entfallen etwa 10-50 Vektorpartikel (ungeachtet ihrer Intaktheit). Dieses Verhältnis läßt sich durch die Quantifizierung der Vektorpartikel mittels DNA-Bestimmung und den Vergleich mit den Titern aus den Plaque-Assays erhalten.

Für das Plaque-Assay wurden drei 6-Well-Platten mit  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well beschickt und bis zu einer Konfluenz von 50% inkubiert. Autoklavierte Agarose Typ VII wurde in einem

Mikrowellengerät aufgeköcht, dadurch verflüssigt und langsam in einem Wasserbad bei 42°C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe des Vektorstocks hergestellt. Dazu wurde 40 µl des Stocks mit 4 ml DMEM mit 2% HS (v/v) vermischt (1. Verdünnungsstufe 1:100). 400 µl dieser Verdünnung wurden in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 3,6 ml DMEM mit 2% HS (v/v) überführt und gemischt (2. Verdünnungsstufe 1:1000). Dieser Vorgang wurde bis zu einer Verdünnung von 1: 10<sup>12</sup> wiederholt.

Die Überstände der 6-Well-Platten wurden vorsichtig abgenommen und die Zellen behutsam mit jeweils 2 ml DMEM mit 2% HS (v/v) gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit den Verdünnungsreihen 1:10<sup>8</sup> bis 1:10<sup>12</sup> transduziert. Dazu wurde in jedes Well, dessen Überstand des Waschschrittes vorsichtig abgesaugt worden war, jeweils 1 ml der Verdünnungsstufen pipettiert. Jeweils drei Wells wurden mit einer Verdünnungsstufe transduziert, drei Wells wurden als Kontrolle mit vektorfreiem DMEM mit 2% HS (v/v) versehen. Die 6-Well-Platten wurden für 2 h im Brutschrank inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Nach der Inkubation wurde der Überstand erneut abgenommen, und die Platten überschichtet. Dazu wurde 40 ml MEM (2x) (37°C) mit 40 ml der Agarose (42°C) vermischt und jeweils 4 ml der Mischung vorsichtig in die Wells pipettiert. Die Agarose erstarrte innerhalb von ca. 10 min bei Raumtemperatur, danach wurden die 6-Well-Platten in den Brutschrank verbracht. Nach 10 - 12 Tagen erfolgte die Auswertung. Dafür wurden die Plaques je Well gezählt und zunächst für jede Verdünnungsstufe gemittelt, diese auf eine einheitliche Verdünnungsstufe umgerechnet und erneut gemittelt. Ein durchschnittlicher Titer betrug 1x10<sup>11</sup> PFU /ml.

### **5.3.6 Transduktion von A549-Zellen mit adenoviralen Vektoren**

A549-Zellen sind empfänglich für adenovirale Vektoren, da sie eine starke CAR-Expression aufweisen. Da die Vektoren aufgrund der E1-Deletion replikationsdefizient sind, können sie die Zellen infizieren, sich in diesen jedoch nicht vermehren. Die Expression des rekombinanten Gens ist also abhängig von der Infektionslast.

Um die Expression von mAFP zu überprüfen wurden A549-Zellen mit bestimmten *multiplicities of infection* (MOIs) von AdmAFP transduziert und 48h später mAFP im Proteinextrakt detektiert.

2-5x10<sup>5</sup> A549-Zellen je Well wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Die Platten wurden im Brutschrank mit 4 ml komplettem DMEM je Well inkubiert. Bei fast vollständiger Konfluenz wurde die Zellzahl einzelner Wells stellvertretend bestimmt. In Reaktionsgefäßen wurde die

jeweils notwendige Menge titrierten Vektorstock (MOIs im ein-, zwei- und dreistelligen Bereich) vorgelegt und mit DMEM 2% HS (v/v) ad 1 ml vermischt. Die Überstände der verbliebenen Wells wurden abgesaugt und mit jeweils 2 ml DMEM mit 2% HS (v/v) gewaschen. Nach Entfernen des Waschmediums wurden die Wells mit je einem Milliliter der vorher angefertigten Vektorlösungen beschickt. Zur Kontrolle dienten Wells welche mit vektorfreiem DMEM mit 2% HS (v/v) versehen wurden, sowie simultane Transduktionen mit AdGFP und AdMock in vergleichbaren MOIs nach analogem Vorgehen.

Die 6-Well-Platten wurden unter gelegentlichem Schwenken für 2 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Überstände gegen je 4 ml komplettes DMEM getauscht wurden.

Nach 48-72h wurden die Überstände asserviert, RNA isoliert, sowie Proteinextraktionen vorgenommen.

### **5.3.7 Isolation und Ausreifung muriner dendritischer Zellen**

Murine dendritischen Zellen (DC) wurden aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der verwendeten Mäuse gewonnen (Inaba et al., 1992).

Die Vorläuferzellen wurden mittels magnetischer Depletion angereichert und in Gegenwart von mGM-CSF und mIl-4 ausdifferenziert (Labeur et al. 1999; Schmidt et al. 2003).

#### **5.3.7.1 Gewinnung von Knochenmark**

Im Tier-Op wurden die im Mittel 6-8 Wochen alten Mäuse (i.d.R. wurden zwei syngene Mäuse verwendet und ihr Knochenmark gepoolt) mittels Isoflurandämpfen betäubt und durch Genickbruch getötet. Tibiae und Femura wurden steril präpariert und in ein Reaktionsgefäß mit DC-Medium auf Eis überführt.

Unter einer Laminar-Flow-Werkbank wurden die Knochen aus dem Medium geborgen und durch kurzes Eintauchen in Ethanol (70%) desinfiziert bevor sie in frischem eisgekühltem DC-Medium bis zur Verarbeitung gelagert wurden. Unter sterilen Bedingungen wurden die Epiphysen der Knochen im metaphysären Bereich abgetrennt, so daß die Markräume beidseitig eröffnet waren. Mit Hilfe einer Kanüle (26G) und einer Spritze (5 ml) wurde der Markraum mit jeweils ca. 3 ml DC-Medium durchspült und Mark und Medium in einem Cellstrainer (100 µm Porenweite) aufgefangen. Das Filtrat wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und auf einen weiteren Cellstrainer überführt (40 µm Porenweite) und unter Spülen mit DC-Medium weiter gesäubert. Die zweimal geklärte Suspension wurde bei 4°C für 7 min bei 1 700 rpm sedimentiert (Megafuge), das Pellet in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde wie eben

beschrieben erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1-2 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Pro Maus wurden ca.  $3\text{-}5 \times 10^7$  Zellen gewonnen.

### 5.3.7.2 MACS-Depletion

Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Suspension wurde im folgenden mit 6  $\mu\text{l}$  einer Mixtur aus unverdünnten Antikörpern pro  $10^6$  Zellen vermischt. Die Antikörper markieren T-Zellen (CD4, CD8, CD45R), B-Zellen (CD45R), NK-Zellen (CD45R), Granulozyten (LY6G) und Makrophagen (MHC II) (Schmidt et al. 2003, Lai et al. 1998). Die prozentuale Zusammensetzung der Mixtur sei in Tabelle 2 vermerkt.

Die Mischung wurde für 20 min auf Eis inkubiert und währenddessen der MACS-Puffer entgast, indem 5-10 Milliliter davon mittels einer Saugpumpe einem starken Unterdruck ausgesetzt wurden. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in 10 ml MACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation in 80  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden nun mit sekundärem Antikörper vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es wurden pro  $10^7$  Zellen 20  $\mu\text{l}$  MicroBead gekoppelter Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörper verwendet. Das Gemisch wurde nach Inkubation erneut abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig entnommen und das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  entgastem MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Je 500  $\mu\text{l}$  der Suspension wurde auf eine mit 500  $\mu\text{l}$  äquilibrierte MS-Säule im Magnetfeld appliziert. Jede Säule wurde dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  entgastem MACS-Puffer gespült und der gesamte Durchfluß aufgefangen.

Tabelle 2: Prozentualer Anteil unverdünnter Antikörper eines Antikörpergemisches für die MACS-Depletion. Je 6  $\mu\text{l}$  dieser Mixtur werden pro  $10^6$  Zellen eingesetzt.

Antikörper (Ratte-Anti-Maus-)	Anteil
LY6G	40%
CD45R	30%
MHC II	10%
CD 4	10%
CD 8	10%

### 5.3.7.3 Kultivierung muriner dendritischer Zellen

Die aufgefangenen Zellen wurden erneut mittels Zentrifugation pelletiert, in 1-2 ml DC-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, wobei je  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 2 ml komplettem DC-Medium (mit 200 U/ml mGM-CSF und 20 ng/ml mIl-4) je Well im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellen wurden kräftig gerüttelt, um sie in den Wells gleichmäßig zu verteilen. An Tag 3 und 5 nach Aussaat wurde nach vorsichtigem Schwenken je Well 1,5 ml Überstand entnommen und durch 2 ml frisches komplettes DC-Medium ersetzt. An Tag 6 erfolgte die Stimulation mit 25 ng/ml TNF- $\alpha$  oder 1 ng/ml LPS und/oder die Transduktion mittels adenoviraler Vektoren.

### 5.3.8 Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren

Die dendritischen Zellen wurden geerntet, für 7 min bei 1700 rpm (Megafuge) zentrifugiert und das Pellet in DC-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden nun je nach Experiment  $5 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  Zellen auf 15 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurde der benötigte Vektorstock (MOI 100-1000) für jede Charge dendritischer Zellen vorgelegt und auf 500  $\mu$ l mit DC-Medium aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in den bereitstehenden Vektorlösungen resuspendiert. Die Infektion erfolgte bei 3 500 rpm und 37°C für 2h in der Zentrifuge (Megafuge). Die Reaktionsgefäße wurden im Anschluß aus der Zentrifuge geborgen, die Pellets im Überstand resuspendiert und in je ein Well von 12-Well-Platten überführt in welche bereits 2 ml komplettes DC-Medium (mit mGM-CSF und mIl-4) je Well vorgelegt war.

Als Kontrolle wurden in jedem Experiment analog zur Transduktion DC ohne Vektor zentrifugiert, sowie teilweise sowohl mit als auch ohne Vektor für 2 h bei 37°C in geringem Volumen in 12-Well Platten inkubiert (Gong et al. 1997).

Transduziert wurde mit AdMock, AdGFP und AdmAFP. Teilweise wurden die zu transduzierenden dendritischen Zellen 12 Stunden vor der Ernte zusätzlich mit LPS (1 ng/ml) oder TNF- $\alpha$  (25 ng /ml) stimuliert. Nach 48h Inkubation im Brutschrank wurden Überstände asserviert, die Zellen geerntet und flowzytometrisch untersucht, sowie Proteinextrakte angefertigt.

#### 5.4. Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie werden Zellen in Suspension in einem dünnen Strahl von Trägerflüssigkeit vereinzelt und an einer Laserlichtquelle (meist Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge) vorbeigeführt. Aufgrund des seitlich und vorwärts gestreuten Lichts (*side* und *forward scatter*) lassen sich Aussagen zu Granularität und Größe der Zellen treffen. Ferner können durch das Licht Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Sind diese z.B. an Antikörper gekoppelt, welche an Oberflächenproteine binden, so läßt sich die Verteilung der Oberflächenproteine in einer Zellsuspension quantifizieren. Die Daten, die von jeder einzelnen Zelle gewonnen werden, werden gesammelt und können in Histogrammen aufgetragen werden. Zur Verwendung kommen insbesondere Fluorescein-isothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Antikörper. FITC emittiert Licht mit einem Maximum von 521 nm Wellenlänge, wenn es angeregt ist (Anregungsmaximum bei 494 nm). PE hingegen wird bei 480 nm angeregt und emittiert Licht mit einem Maximum von 578 nm Wellenlänge. Auch GFP mit einem Anregungsmaximum bei 475 nm eignet sich für die Durchflußzytometrie (Shapiro 2003).

Die dendritischen Zellen wurden durchflußzytometrisch auf Ausreifung und Transduktionseffizienz untersucht. Dargestellt wurde die Expression von CD11c (Metlay et al. 1990) als Standardmarker für murine DC, sowie CD40, CD80 und CD86 als Maturationsmarker (Inaba et al. 1994). Ferner wurde die Expression des vektorkodierten Gens GFP gemessen.

Dendritische Zellen wurden geerntet, für 7 min bei 1700 rpm zentrifugiert (Megafuge) und in PBS/BSA (4°C) resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und  $5 \times 10^5$  Zellen für jede Färbung in FACS-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden für 7 min bei 800 rpm (Varifuge) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 80 µl PBS/BSA resuspendiert. Je 10 µl unverdünnter FITC-gekoppelter Antikörper, sowie je 5 µl PE-gekoppelter Antikörper wurden zugesetzt und gründlich vermischt. Die FACS-Röhrchen wurden für 15 min bei 4°C inkubiert, bevor sie nach Zusatz von jeweils 1 ml PBS/BSA erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 1 ml PBS/BSA resuspendiert. Die Messungen erfolgten an einem EPICS XL Durchflußzytometer. Große granuläre Zellen wurden gegatet. Verstärkung und Kompensationen wurden anhand der Isotypfärbungen bzw. Positivkontrollen eingestellt. Wenigstens 10 000 Zellen wurden für jede Messung berücksichtigt. Durch Zugabe von Propidiumjodid (2% m/v) unmittelbar vor der Messung

einer nicht mit PE-gekoppelten Antikörpern versehenen Probe, wurde der Anteil abgestorbener Zellen bestimmt.

Die Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm FCS Express Version 3 der Firma De Novo Software.

Zudem wurde die Expression des murinen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors untersucht (Bergelson et al. 1998). Dafür stand jedoch kein gekoppelter Antikörper zur Verfügung.

Jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 15  $\mu$ l 1:500 verdünntem Kaninchen-anti-Maus-CAR Serum, bzw. in 15  $\mu$ l Kaninchenserum, bzw. in 15  $\mu$ l PBS/BSA suspeniert und auf Eis für 30 min inkubiert. Nachdem die Zellen in jeweils 1 ml PBS/BSA gewaschen, bei 4000 rpm für 5 min (Biofuge) sedimentiert und die Überstände verworfen worden waren, wurden die Zellen mit je 15  $\mu$ l 1:100 verdünnter FITC-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit 1 ml PBS/BSA gewaschen. Die in jeweils einem Milliliter PBS/BSA resuspendierten Zellen wurden, wie obenstehend beschrieben, mit dem EPICS XL Durchflusszytometer untersucht und die Daten mit FCS Express Version 3 der Firma De Novo Software aufbereitet.

## **5.5. Statistik**

Zum Vergleich von Transduktionseffizienzen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuchsgruppen bestimmt. Die Signifikanzniveaus der Differenzen zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem zweiseitigen Student's t-Test für unverbundene Stichproben ungleicher Varianz bestimmt. Ein Unterschied von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Herstellung adenoviraler Vektoren

Basierend auf dem AdEasy-System von He et al. (1998) wurde ein für mAFP rekombinanter adenoviraler Vektor, sowie ein für GFP rekombinanter adenoviraler Vektor kloniert. Die cDNA von murinem Alpha-Fetoprotein wurde aus pCImAFP ausgeschnitten und in den Transfervektor pShuttle-CMV einkloniert. Der resultierende Vektor pShuttle-CMV-mAFP wurde mit dem Backbone-Plasmid pAdEasy1 zu pAdmAFP rekombiniert. Das bereits vorhandene Transferplasmid pAdTrackCMV wurde mit dem Backbone-Plasmid pAdEasy1 zu pAdGFP rekombiniert. Die linearisierten Vektoren pAdmAFP und pAdGFP wurden in 911-Zellen transfiziert und die daraufhin produzierten adenoviralen Vektoren AdmAFP und AdGFP amplifiziert und aufgereinigt.

#### 6.1.1 Herstellung eines mAFP kodierenden Transfervektors

Die gesamte cDNA von murinem Alpha-Fetoprotein wurde aus pCImAFP ausgeschnitten und in den Transfervektor pShuttle-CMV einkloniert um den rekombinanten Transfervektor pShuttle-CMV-mAFP zu erhalten. Um die Sequenz auszuschneiden und in die Multiple Klonierungsstelle von pShuttle-CMV einzufügen, wurden die Restriktionsenzyme *KpnI* und *SalI* ausgewählt. Deren Erkennungssequenzen liegen ebenfalls in der Klonierungsstelle von pAdShuttle-CMV, kommen aber nicht in der Basensequenz von mAFP vor.

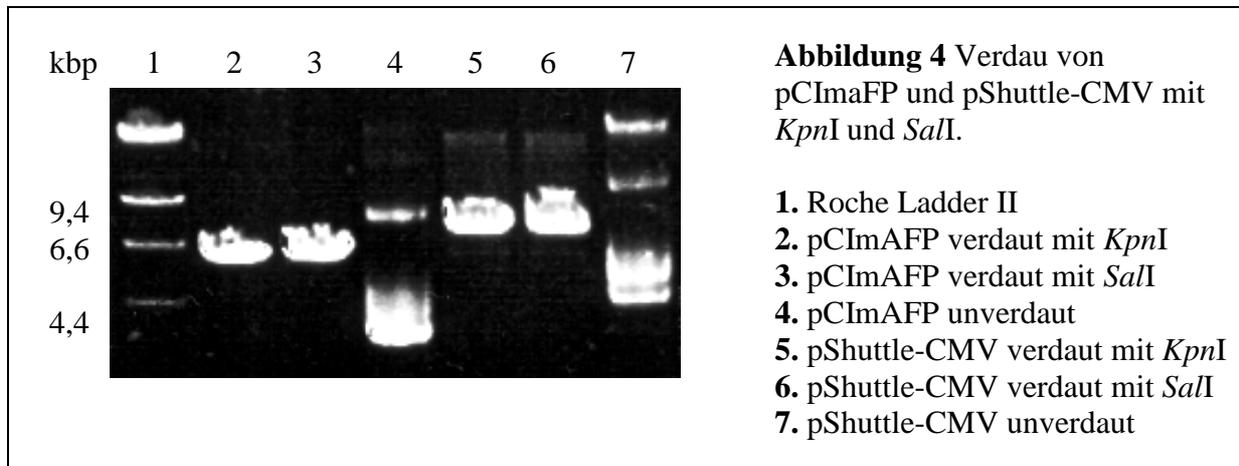
LB-Kulturen wurden mit Glycerolstocks von pCImAFP bzw. pShuttle-CMV tragenden *E.coli* DH10B geimpft und die entsprechenden Plasmide mittels Maxiplasmidpräparation aufgereinigt.

pCImAFP und pShuttle-CMV wurden zunächst in getrennten Ansätzen mit *KpnI* sowie mit *SalI* mit unterschiedlichen Inkubationszeiten inkubiert, um die Bedingungen für einen jeweils vollständigen Verdau zu ermitteln. Der Erfolg der enzymatischen Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft. Nach 420 min waren die Plasmide vollständig linearisiert.

Jeweils 20 µg pCImAFP wurden daraufhin mit jeweils 100 U *KpnI* bzw. *SalI* in einem Gesamtvolumen von 60 µl für 420 min bei 37°C inkubiert.

Ferner wurden jeweils 15 µg pShuttle-CMV mit jeweils 80 U *KpnI* bzw. *SalI* in einem Gesamtvolumen von ebenfalls 60 µl für 420 min bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg des quantitativen Verdauens wurde elektrophoretisch überprüft (Abbildung 4). Die Ansätze wurden daraufhin ethanolgefällt.



In einem zweiten Restriktionsspaltungsschritt wurde mAFP aus dem bereits linearisierten pCIImAFP exzidiert. Bei dem bereits linearisierten pShuttle-CMV wurde ein korrespondierendes überhängendes Ende eingefügt.

Dazu wurden die ethanolgefällten Restriktionsansätze mit dem jeweils anderen Enzym für 420 min bei 37°C inkubiert.

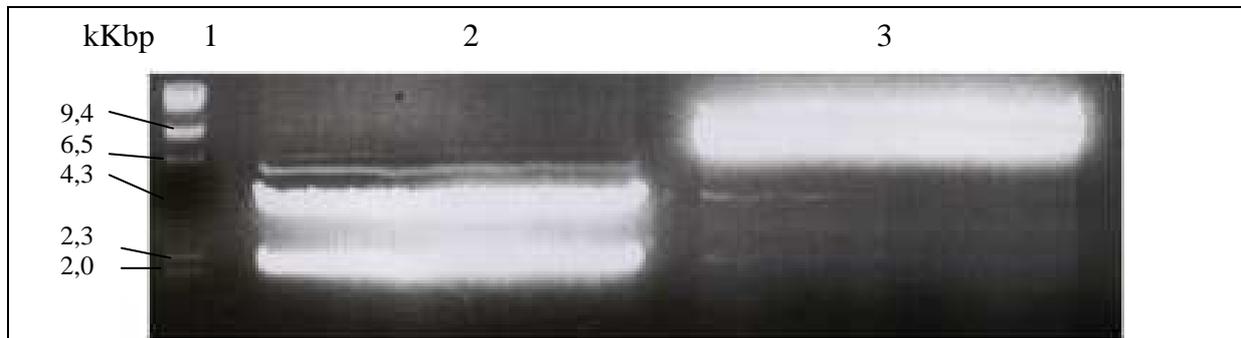
Der Erfolg des quantitativen Umsatzes wurde elektrophoretisch überprüft. Die Ansätze wurden kombiniert und auf einem präparativen Gel aufgetragen (Abbildung 5).

Die gewünschten Banden wurden mit dem Kit GeneClean III aus dem Gel eluiert (Siehe: 5.1.5). Elektrophoretisch wurden gröbere Kontaminationen der mAFP-cDNA und des linearisierten pShuttle-CMV mit pCIImAFP bzw. linearisiertem pCI ausgeschlossen (Abbildung 6). Die Konzentration der Eluate betrug 270 ng/μl für mAFP und 255 ng/μl für pAdShuttle-CMV.

Die Ligation der cDNA von mAFP in das mit *KpnI* und *SalI* linearisierte pShuttle-CMV-Transferplasmid erfolgte mittels der T4 DNA-Ligase (Siehe: 5.1.6). Für den Ligationsansatz wurden verschiedene Inkubationsbedingungen erprobt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in *E.coli* DH10B elektroporiert und die Bakteriensuspensionen anschließend auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen.

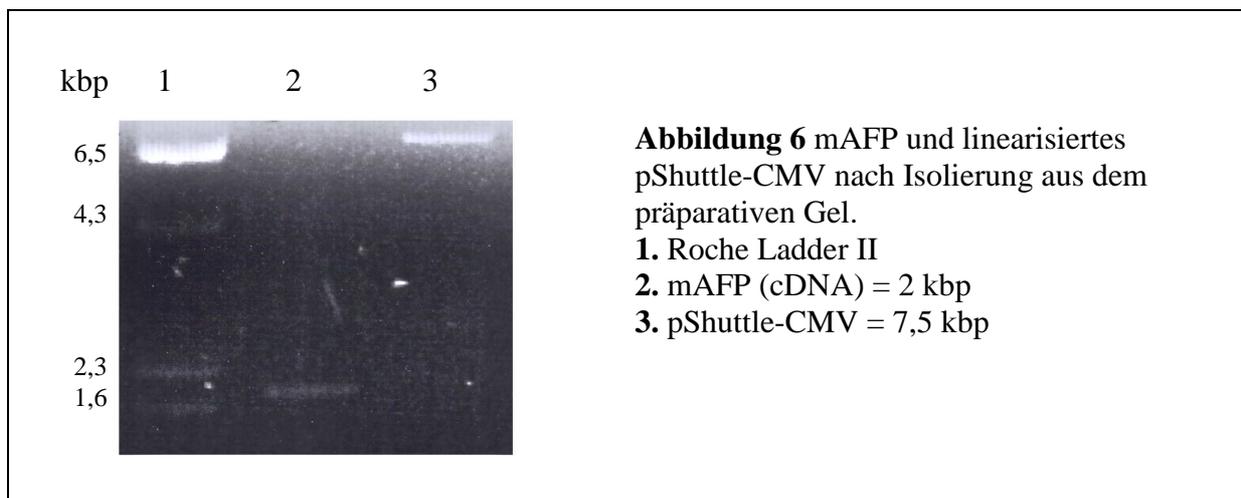
Nach 18h-24h Inkubation bei 37°C wurden mit einzelstehenden Kolonien kanamycinhaltige LB-Kulturen (à 5 ml) beimpft und diese in einem Rüttelinkubator bei 37°C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Es folgten Miniplasmidpräparationen aus den Kulturen. Die gewonnene

DNA wurde restriktionsenzymatisch untersucht, um religierte pShuttle-CMV haltige Klone von pShuttle-CMV-mAFP haltigen Klonen zu unterscheiden.



**Abbildung 5** Präparatives Gel der mit *KpnI* und *SalI* verdauten Plasmide. **1.** Roche Ladder II **2.** pCI-mAFP **3.** pShuttle-CMV

Spur 2 zeigt die cDNA von mAFP bei 2 Kilobasenpaaren, darüber das linearisierte pCI. Auf Laufhöhe von ca 6 Kilobasenpaaren zeigt sich unvollständig (einfach) verdautes pCI-mAFP. Spur 3 zeigt das linearisierte pShuttle-CMV. Darunter sind linksbetont schwache Banden zu erkennen. Diese korrespondieren mit Banden der Spalte 2 und sind als diffusionsbedingte Verunreinigung zu werten.

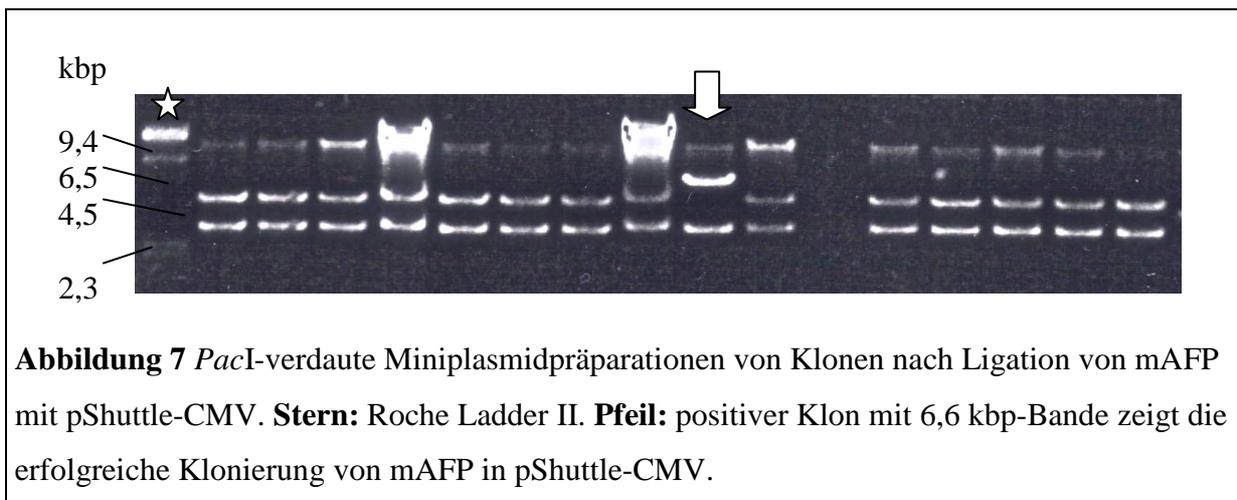


Die Religation der linearisierten pShuttle-CMV ist trotz der durch Doppelverdau mit *KpnI* und *SalI* unterschiedlichen Enden durchaus möglich. Durch Schneiden mit *PacI* läßt sich die erfolgreiche Ligation mit mAFP identifizieren. Ein positiver Klon wurde letztlich identifiziert, nachdem die Inkubationsbedingungen der Ligation mit 4°C für 16h gewählt worden waren (Abbildung 7). Mit der dem positiven Klon zugehörigen LB-Kultur wurde eine Maxiplasmidpräparation durchgeführt. Zur Überprüfung der korrekten Orientierung von mAFP wurde eine HotShot-Sequenzierung durchgeführt (Abbildung 8). Diese zeigte die in

der Basensequenz den Übergang von pShuttle-CMV zur cDNA von mAFP in der erwarteten Position und korrekten Orientierung (Abbildung 8).

Tabelle 3: Erwartete Fragmentgrößen in Basenpaaren nach Verdau mit *PacI*

pShuttle-CMV	pShuttle-CMV-mAFP
4541	6607
2921	2921



**Abbildung 8** Sequenzierungsergebnis der HotShot-Sequenzierung von pShuttle-CMV-mAFP:

```

TTTTTAAACACCCANCGCCAGNAGTTTTTCTTCATTGCANCCAACACATCGCTA
GTCATTTTGTTCACCTTCCTCCTCGGTGGCTTCCGGAACAAACTGGGTAAAGGTG
ATGGTAGCTATGCTAAGCACATTCTTCTCCGTCACGCACTGGGAGGAATCTAA
CGTGGAAGCTATCCCAAACATTTTTTCGTGCAATGCTTTGGACGCAGCGAAAT
GTAGCAGGAGGATGAGGGAAGCGGGTGTGATCCACTTCATGGCTGCTGGTAC
CAGATCTCTAGCGGATCTGACGGTTCACTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACC
TCCCACCGTACACGCCTACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACG
ACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAAACTCCCATTGACGT
CAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCA
TTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTA
GATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCC
AGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGA
TACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTG
ACGTCAATGGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATT
GACGT

```

Oben: Dargestellt ist die auf den *Antisense* Primer folgende Basensequenz in 5'-3' Richtung. Unten: Der Übergang des Transferplasmids zu mAFP dargestellt in kodierender Richtung mit komplementärem Strang. Jeweils grau unterlegt die Sequenz von mAFP.

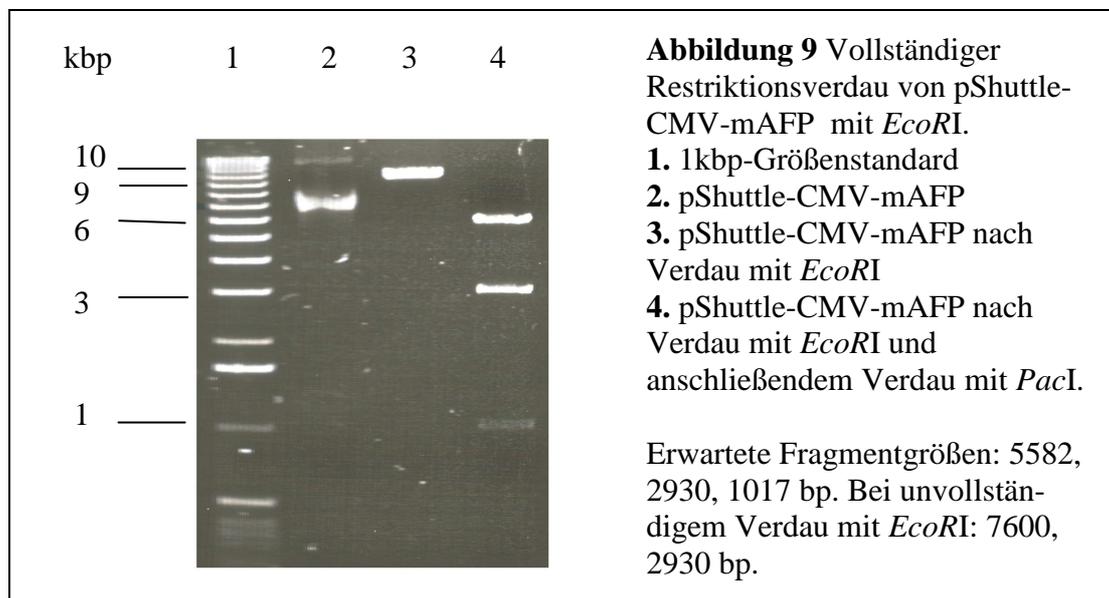
```

5`...gatctggtaccagcagccatg...3`
3`...ctagaccatggtcgtcggta...5`

```

### 6.1.2 Homologe Rekombination von Transfervektoren mit pAdEasy1

Der neu klonierte Transfervektor pShuttle-CMV-mAFP wurde mit dem Backbone-Vektor pAdEasy1 homolog rekombiniert. Dazu wurden elektrokompente *E.coli* BJ5183 mit linearisiertem pShuttle-CMV-mAFP und pAdEasy1 transformiert. Der Transfervektor wurde nicht mit *PmeI* linearisiert, da die Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzym in der cDNA von mAFP vorkommt. Stattdessen wurde die Endonuklease *EcoRI* ausgewählt. Der Ansatz wurde für 4h bei 37°C inkubiert, um pShuttle-CMV-mAFP vollständig zu linearisieren. Anschließend erfolgte eine Ethanol-fällung. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde gelelektrophoretisch und restriktionsenzymatisch überprüft (Abbildung 9).



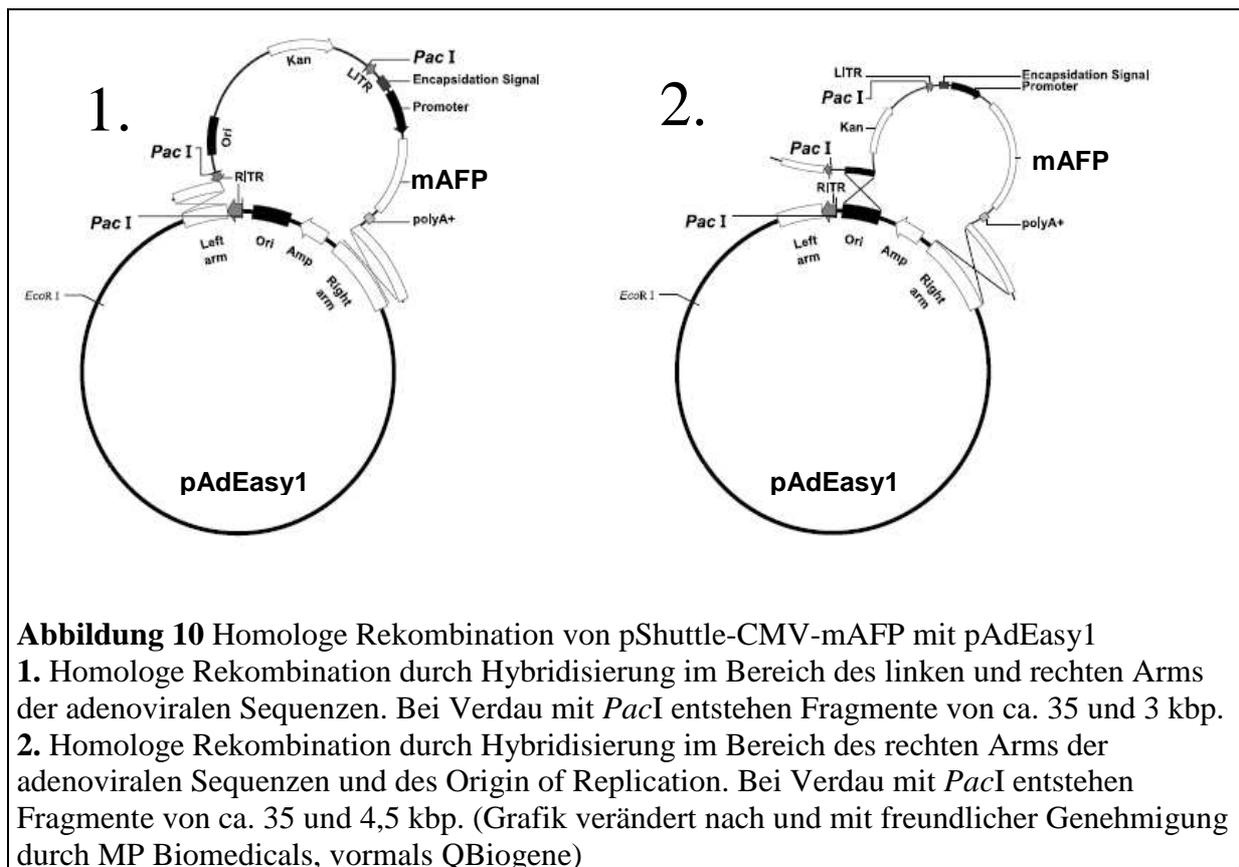
200 µg des linearisierten und ethanolgefällten Plasmids pShuttle-CMV-mAFP wurden mit 100 µg pAdEasy1, sowie 20 µl elektrokompenter *E.coli* BJ5183 vermischt. Die Elektroporation erfolgte bei 1700 V, 201 Ohm und 25 µF für 5 msec. Die Bakterienmischung wurde in 500 µl LB-Medium aufgenommen und bei 250 rpm für 10 min auf einem Rüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Suspension auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden Klone selektiert, damit jeweils 5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium beimpft und diese für 18h bei 250 rpm im Rüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

Nach 18h wurden Miniplasmidpräparationen durchgeführt und die gewonne DNA restriktionsenzymatisch mit *PacI* auf homolog rekombinierte Plasmide gescreent.

Grundsätzlich sind vier verschiedene Plasmide je Klon zu unterscheiden. Aufgrund des Kanamycinresistenzgens ist immer der Transfervektor involviert.

Die Mehrheit der Klone trägt den religierten Transfervektor und zeigt nach Verdau zwei Fragmente von ca. 3 bzw. 6,5 kbp. Gelegentlich erscheint ein zusätzliches Fragment von ca. 33 kbp, insofern sich das religierte Transferplasmid und pAdEasy1 in einem Klon befindet, ohne rekombiniert zu sein. Ferner existieren Klone mit erfolgreich rekombinierten Plasmiden. Zwei unterschiedliche Arten der Rekombination sind möglich und sind im *PacI*-Verdau erkenntlich an Fragmenten von 35 kbp und jeweils einem Fragment von 3 bzw. 4,5 kbp (Abbildung 10).



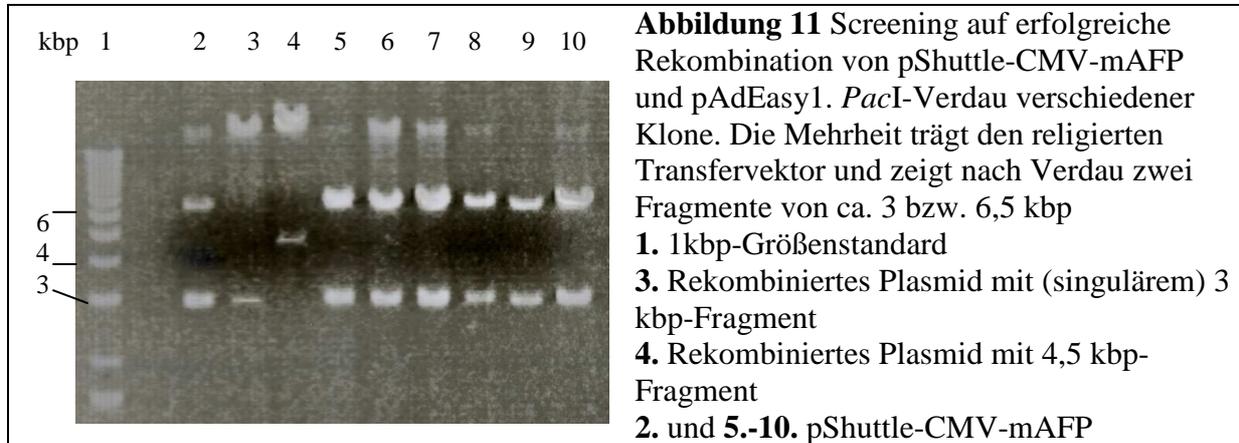
**Abbildung 10** Homologe Rekombination von pShuttle-CMV-mAFP mit pAdEasy1  
**1.** Homologe Rekombination durch Hybridisierung im Bereich des linken und rechten Arms der adenoviralen Sequenzen. Bei Verdau mit *PacI* entstehen Fragmente von ca. 35 und 3 kbp.  
**2.** Homologe Rekombination durch Hybridisierung im Bereich des rechten Arms der adenoviralen Sequenzen und des Origin of Replication. Bei Verdau mit *PacI* entstehen Fragmente von ca. 35 und 4,5 kbp. (Grafik verändert nach und mit freundlicher Genehmigung durch MP Biomedicals, vormals QBiogene)

Das Plasmid des Klons 3 (Abbildung 11) erhielt den Namen pAdmAFP. Mit der DNA der Miniplasmidpräparation von Klon 3 wurden elektrokompente *E.coli* DH10B transformiert. Da der Stamm DH10B RecA-defizient ist, sind darin propagierte Plasmide stabiler. Außerdem erlaubt der Stamm DH10B höhere Erträge bei Plasmidpräparationen. Eine Maxi-plasmidpräparation aus DH10B-Kulturen schloß sich daher an.

Der Transfervektor pAdTrack-CMV wurde ebenfalls mit dem Backbone-Vektor pAdEasy1 homolog rekombiniert. Dazu wurde pAdTrack-CMV mit *PmeI* linearisiert und zusammen mit pAdEasy1 in elektrokompente *E.coli* BJ5183 transferiert.

pAdTrack-CMV wurde innerhalb von 90 min bei 37°C vollständig umgesetzt und anschließend ethanolgefällt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde gelelektrophoretisch und

restriktionsenzymatisch überprüft. 200 µg des linearisierten und ethanolgefällten Plasmids pAdTrack-CMV wurden mit 100 µg pAdEasy1, sowie 20 µl elektrokompetenter *E.coli* BJ5183 vermischt.



Die Elektroporation erfolgte bei 1700 V, 201 Ohm und 25 µF für 5 msec. Die Bakterienmischung wurde in 500 µl LB-Medium aufgenommen und bei 250 rpm für 10 min auf einem Rüttelinkubator inkubiert. Danach wurde die Suspension auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Klone selektiert, damit jeweils 5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium beimpft und für 18h bei 250 rpm im Rüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Nach 18h wurden Miniplasmidpräparationen durchgeführt und die gewonne DNA restriktionsenzymatisch mit *PacI* auf homolog rekombinierte Plasmide gescreent.

Analog zur Abbildung 11 wurde ein positiver Klon identifiziert und dessen Plasmid fortan pAdGFP genannt. Mit der DNA der Miniplasmidpräparation dieses Klones wurden elektrokompetente *E.coli* DH10B transformiert. Eine Maxi-plasmidpräparation aus DH10B-Kulturen schloß sich an.

### 6.1.3 Transfektion von 911-Zellen mit pAdmAFP und pAdGFP

Um die generierten Plasmide in die Verpackungszelllinie 911 zu verbringen, wurde sie mittels Lipofectamine transfiziert. Dazu wurden die Plasmide zunächst linearisiert. Mithilfe der Restriktionsendonuklease *PacI* wird das Plasmid nicht nur linearisiert, sondern auch simultan von bakteriellen Sequenzen, wie der Kanamycinresistenz und des Origin of Replication befreit.

Verschiedene Inkubationsbedingungen und Enzymkonzentrationen wurden getestet, um einen vollständigen Verdau von pAdmAFP mit *PacI* zu erreichen. Der Ansatz wurde für 90 min bei

37°C inkubiert, gelelektrophoretisch auf Vollständigkeit des Verdauens überprüft und anschließend ethanolgefällt.

Eine zu 50% mit 911-Zellen bewachsene T25-Zellkulturflasche wurde mit 5,6 µg der mit *PacI* verdauten und ethanolgefällten pAdmAFP-DNA transfiziert. Für die Transfektion wurde eine Lipofektion mit Lipofectamine durchgeführt (Siehe: 5.3.2). Zur Kontrolle wurde eine weitere zu 50% dicht mit 911-Zellen bewachsene T25-Zellkulturflasche nach identischem Protokoll zeitgleich mit einem DNA-freiem Lipofectamine-Ansatz behandelt.

Nach 24h, sowie nach 6 Tagen wurde das Zellkulturmedium in den Flaschen ausgetauscht.

Nach acht Tagen zeigten sich in der mit pAdmAFP transfizierten Flasche, im Gegensatz zur Kontrolle, typische zytopathische Effekte, die auf das Vorhandensein eines adenoviralen Vektors hindeuteten (Horwitz MS, 2001). Der entstandene adenovirale Vektor wurde AdmAFP genannt.

Analog wurde eine zu 50% mit 911-Zellen bewachsene T25-Zellkulturflasche mit 6 µg der mit *PacI* verdauten und ethanolgefällten pAdGFP-DNA transfiziert. Zur Kontrolle wurde eine weitere zu 50% dicht mit 911-Zellen bewachsene T25-Zellkulturflasche nach identischem Protokoll zeitgleich mit einem DNA-freiem Lipofectamine-Ansatz behandelt.

Nach 24h, sowie nach 6 Tagen wurde das Zellkulturmedium in den Flaschen ausgetauscht.

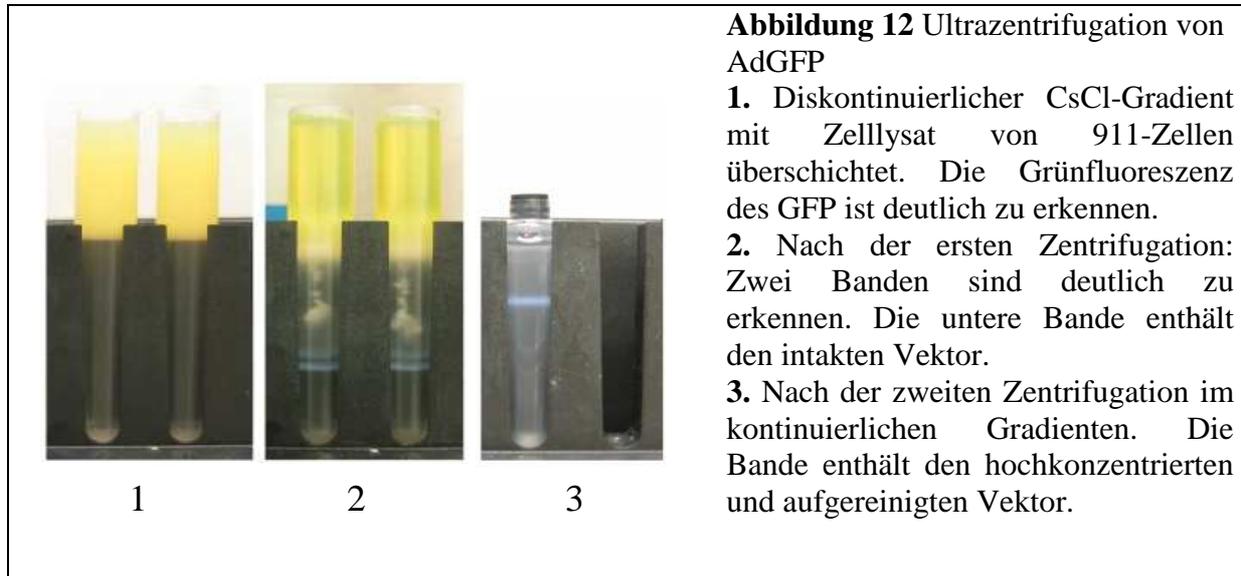
Nach acht Tagen zeigten sich in der mit pAdGFP transfizierten Flasche, im Gegensatz zur Kontrolle, typische zytopathische Effekte sowie eine deutliche Grünfluoreszenz im Durchlichtmikroskop unter blauem Licht. Der entstandene adenovirale Vektor wurde AdGFP genannt.

#### **6.1.4 Amplifikation und Aufreinigung der adenoviralen Vektoren**

Die Gewinnung von ausreichenden Mengen der Vektoren AdGFP und AdmAFP erfolgte in mehreren Amplifikationsschritten von Transduktion und Lyse (Siehe: 5.3.3). Zunächst wurden 911-Zellen in einer weiteren T25-Zellkulturflasche transduziert, nachdem der Vektor aus der transduzierten T25-Zellkulturflasche, wie beschrieben, geerntet worden war. Der gewonnene Vektor diente zur Transduktion von 911-Zellen in einer T175-Zellkulturflasche, welche wiederum die Vektormenge produzierten, welche ausreichte, um 911-Zellen in 30 oder mehr T175-Flaschen zu transduzieren.

Produktionen von AdMock erfolgten direkt in 30 oder mehr Flaschen, ausgehend von einem CsCl-präparierten und bei -80°C gelagerten Vektorstock.

Die Ernte der Flaschen erfolgte jeweils zum optimalen Zeitpunkt nach 2-3 Tagen. Gelingt dies nicht, so war die Ausbeute der Viruspräparation nach CsCl-Aufreinigung gering.



Die Aufreinigung der adenoviralen Vektoren erfolgte in einer zweistufigen CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Siehe: 5.3.4). Dazu wurde zunächst eine Ultrazentrifugation in einem diskontinuierlichen CsCl-Stufengradient durchgeführt um Zelltrümmer, Protein und einen Großteil defektiver Vektoren zu entfernen. Anschließend erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen CsCl-Gradienten um Restkontaminationen mit defektem Vektor abzutrennen.

Der Vektor stellte sich nach den Zentrifugationsläufen als dünne Bande dar und konnte mittels einer Kanüle aspiriert werden (Abbildung 12). Nach viermaliger Dialyse zur Entfernung des CsCl wurde der Vektor aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Titer der aufgereinigten Vektoren wurden in Plaque Assays ermittelt. Erste Plaques waren lichtmikroskopisch nach im Mittel 3-4 Tagen zu identifizieren, mit bloßem Auge nach im Mittel 5 Tagen. Die Auswertung erfolgte nach 10 Tagen. Die erzielten Titer lagen zwischen  $5 \times 10^9$  und  $10^{12}$  pfu/ml, je nachdem, ob die Ernte zum optimalen Zeitpunkt oder verspätet durchgeführt worden war.

## 6.2. Transduktion eukaryontischer Zelllinien mit adenoviralen Vektoren

Die titrierten adenoviralen Vektoren wurden in der A549 Zelllinie auf ihre Transgenexpression hin überprüft. Die A549-Zelllinie ist humanen Ursprungs und exprimiert kein mAFP.

Aufgrund der starken Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors lassen sich A549-Zellen leicht mit adenoviralen Vektoren transduzieren. Die Expression der Transgene ist aufgrund der Replikationsdefizienz der Vektoren abhängig von der Vektorlast. Transduzierte A549-Zellen wurden auf die Expression von mAFP-mRNA und mAFP hin untersucht. Als Positivkontrolle diente die murine Hepatomzelllinie Hepa1-6. Zeitgleich erfolgten jeweils Kontrollexperimente mit AdMock und AdGFP.

6-Wellplatten wurden mit  $2 \times 10^5$  Zellen je Well beschickt und für 24h inkubiert. Die Zellzahl je Well wurde am Tag der Infektion exemplarisch durch Ernte einzelner Wells bestimmt.

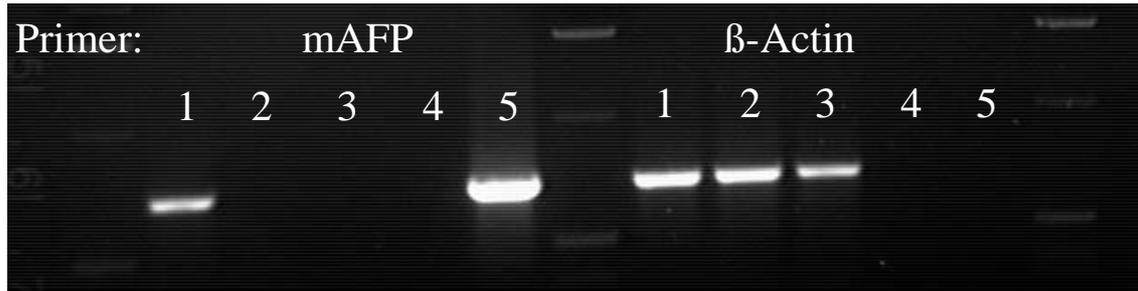
Die Infektion erfolgte mit verschiedenen MOIs. Nach 24h wurde die Expression von GFP durchlichtmikroskopisch unter blauem Licht geschätzt, RNA isoliert und Proteinextrakte gewonnen. Die Experimente wurden mehrfach wiederholt.

Durchlichtmikroskopisch war die Expression von GFP abhängig von der MOI nachweisbar. Bei MOI 10 waren bereits vereinzelt fluoreszierende Zellen auszumachen. Bei MOI 50 lag die Expression von GFP bei etwa 50% der Zellen. Eine Transduktion von nahezu 100% der Zellen war bei MOI 200 zu beobachten.

### **6.2.1 Nachweis der mAFP-mRNA in mit AdmAFP transduzierten A549-Zellen**

Aus den transduzierten 6-Wellplatten wurde mit dem GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit von Sigma-Aldrich nach den Vorgaben des Herstellers RNA isoliert (Siehe: 5.1.9). RNA aus nativen A549-Zellen, AdmAFP-, AdGFP- und AdMock- transduzierten Zellen sowie Hepa1-6-Zellen (als Positivkontrolle) wurde gewonnen und nach DNase-Verdau mittels der rT-Reaktion in DNA umgeschrieben. Daran schloß sich eine PCR mit mAFP-spezifischen Oligonukleotiden als Primer an. Als Positivkontrolle diente pCImAFP. Humane bzw. murine  $\beta$ -Actin-spezifische Oligonukleotide dienten als Kontrolle für die erfolgreiche rT-PCR. Um eine Kontamination der Primer oder Master-PCR-Ansätze auszuschließen, liefen Proben dieser ebenfalls mit.

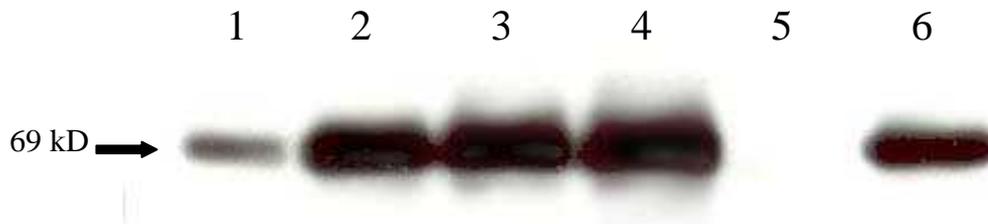
Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetragen und unter UV-Licht ausgewertet. A549-Zellen waren negativ für mAFP-RNA. Ebenfalls negativ für mAFP-RNA waren AdMock- und AdGFP-transduzierte A549-Zellen. AdmAFP-transduzierte Zellen zeigten Banden ab einer MOI von 10 (Abbildung 13).



**Abbildung 13** Nachweis von mAFP-mRNA in A549-Zellen mittels rT-PCR:

Gelelektrophorese der rT-PCR-Produkte

1. AdmAFP transduzierte A549-Zellen (MOI 10)
2. AdGFP transduzierte A549-Zellen (MOI 10)
3. native A549-Zellen
4. PCR-Ansatz
5. pCImAFP



**Abbildung 14** Nachweis von mAFP in A549-Zellen mittels Westernblot: Durch Luminol geschwärtzter Röntgenfilm. Jeweils 10  $\mu$ g Proteinextrakt. Färbung mit Anti-mAFP-Kaninchenserum, Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin gekoppelt an Meerrettichperoxidase als Sekundärantikörper.

1. A549-Zellen, transduziert mit AdmAFP MOI 10
2. A549-Zellen, transduziert mit AdmAFP MOI 50
3. A549-Zellen, transduziert mit AdmAFP MOI 100
4. A549-Zellen, transduziert mit AdmAFP MOI 200
5. A549-Zellen, nativ
6. Hepa1-6

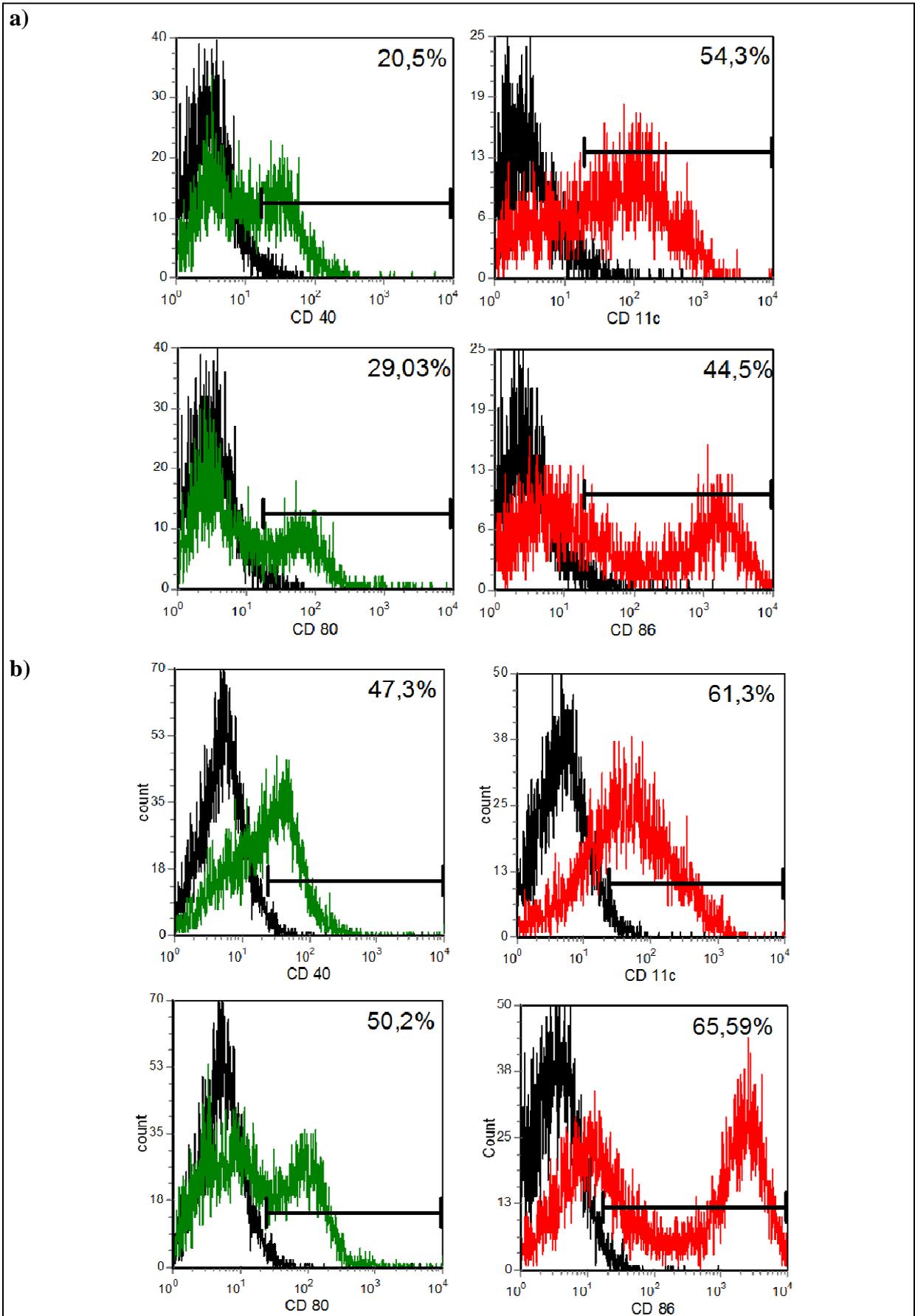
### 6.2.2 Nachweis von mAFP in mit AdmAFP transduzierten A549-Zellen

Aus den transduzierten A549-Zellen in 6-Wellplatten wurde Protein extrahiert und mittels Westernblot auf mAFP untersucht (Siehe: 5.2). Proteinextrakte aus nativen A549-Zellen, AdmAFP-, AdGFP- und AdMock- transduzierten Zellen sowie Hepa1-6-Zellen wurden gewonnen. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und mit einem halbtrockenen Verfahren auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Zum Nachweis von mAFP diente ein polyklonales Anti-mAFP-Kaninchenserum als primärer Antikörper und ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper als sekundärer Antikörper. Letzterer katalysierte die Umsetzung von Luminol, welches aufgelegte Röntgenfilme schwärzte. Da reines mAFP kommerziell nicht erhältlich ist, dienten die Proteinextrakte von Hepa1-6-Zellen als Positivkontrolle. Deutliche Banden bei 69

Kilodalton waren in den Proteinextrakten von mit AdmAFP transduzierten A549-Zellen schon bei einer MOI von 10 zu erkennen (Abbildung 14). Eine MOI von 50 reichte aus, um ähnliche Intensitäten wie Hepa1-6 zu erzeugen. Untransduzierte, oder mit AdMock bzw. mit AdGFP transduzierte A549-Zellen zeigten kein Signal (Daten werden nicht abgebildet).

### 6.3. Generierung von murinen dendritischen Zellen

Vorläufer muriner dendritischer Zellen wurden aus dem Knochenmark von C57L/J-Mäusen gewonnen, magnetisch angereichert und in Gegenwart von GM-CSF und Il-4 ausdifferenziert (Siehe: 5.3.7). Aus Femura und Tibiae wurden pro Maus zwischen  $3 \times 10^7$  und  $5 \times 10^7$  Zellen gewonnen und magnetisch depletiert. Durch Negativselektion der mit einem Antikörpermix gegen LY6G, CD45R, MHC II, CD4 und CD8 markierten Zellsuspension wurden undifferenzierte Vorläuferzellen angereichert. Die Antikörper markieren T-Zellen (CD4, CD8, CD45R), B-Zellen (CD45R), NK-Zellen (CD45R), Granulozyten (LY6G) und Makrophagen (MHC II) (Schmidt et al. 2003, Lai et al. 1998). Die Ausbeute nach magnetischer Depletion betrug etwa 30% der isolierten Zellen. Diese wurden in Kultur genommen und in Gegenwart hoher Dosen von GM-CSF und Il-4 zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. An Tag 6 waren durchschnittlich  $1,5 \times 10^7$  Zellen pro Maus verfügbar. Die Zahl schwankte dabei zwischen  $6,5 \times 10^6$  und  $4,2 \times 10^7$  Zellen je Experiment. Als Maß für den Anteil vitaler Zellen wurde durchflußzytometrisch die Propidiumjodidaufnahme gemessen. Der Anteil positiver Zellen schwankte zwischen 20 und 30%. Somit waren regelmäßig mehr als 70% der Zellen als vital einzuordnen. An verschiedenen Tagen wurden durchflußzytometrische Bestimmungen von typischen Oberflächenmarkern von dendritischen Zellen bestimmt (Siehe:5.4). Diese Versuche dienten zur Charakterisierung der dendritischen Zellen und zum Nachweis ihrer Ausreifung. Dazu wurden die dendritischen Zellen mit FITC- bzw. PE-gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen murine Oberflächenantigene inkubiert. In den anschließenden isotypkontrollierten Messungen zeigten an Tag 6 bereits 47% ( $\sigma = 9,9$ ;  $n=5$ ) der Zellen den DC-typischen Oberflächenmarker CD11c. Nach Stimulation mit LPS konnte ein Anstieg der Marker beobachtet werden. An Tag 8 waren ca. 61% der Zellen positiv für CD11c. Der Anteil stieg bis zum Tag 11 auf 76,5% ( $n=3$ ) der Gesamtpopulation. Etwa 27% ( $\sigma = 10,1$ ) waren positiv für den Marker CD40 und 26% ( $\sigma = 3,9$ ) bzw. 44% ( $\sigma = 8,1$ ) waren positiv für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.



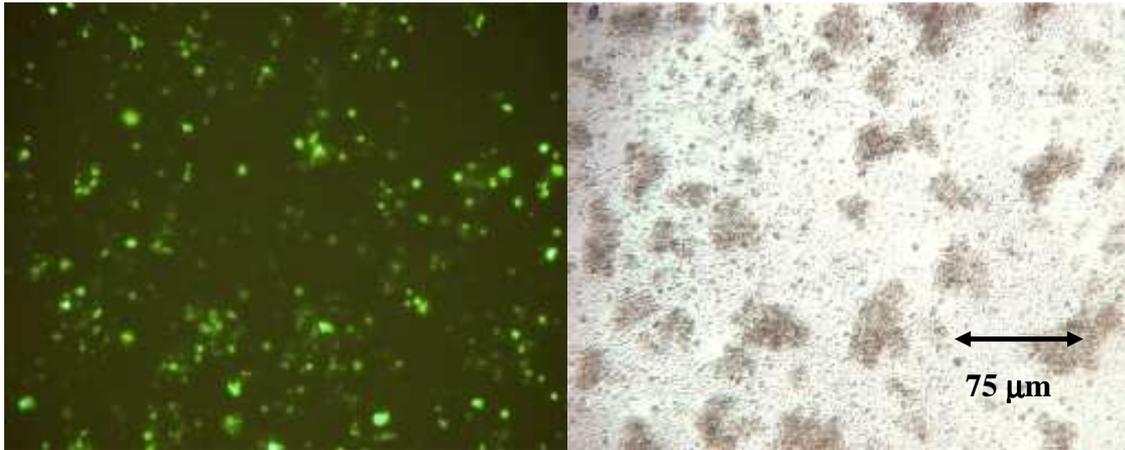
**Abbildung 15** Durchflußzytometrie. Oberflächenmarker muriner dendritischer Zellen. CD40 und CD80: FITC-markierte Antikörper (grün), CD11c und CD86: PE-markierte Antikörper (rot). Jeweils gegen Isotypenkontrolle aufgetragen (schwarz). Dargestellte Populationen wurden als „large granular cells“ im *forward* und *sideward scatter* gegatet (jeweils >85% der Gesamtpopulation). Repräsentatives Experiment aus 5 Versuchen. **a)** Tag 6 **b)** Tag 8

Der Anteil CD40 exprimierender Zellen stieg auf ca. 51% an Tag 8 (n=2). 42% der Zellen waren positiv für CD80. Bis zu 70% der Zellen exprimierten CD86. In den im *forward* und *sideward scatter* als groß und granulär gegateten Populationen lagen die Anteile der Marker z.T. deutlich höher, selbst wenn über 85% der Gesamtzellzahl erfaßt wurden (Abbildung 15). Zur Infektion nutzen Adenoviren den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) dieser wird in hohem Maße von A549- und 911-Zellen exprimiert. Zum Nachweis des murinen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (mCAR) wurden murine dendritische Zellen zunächst mit einem Anti-mCAR-Kaninchenserum und ferner mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper inkubiert. In der darauf folgenden Durchflußzytometrischen Messung zeigten nur 5% der Zellen ein Signal.

#### **6.4. Transduktion muriner dendritischer Zellen mit AdGFP**

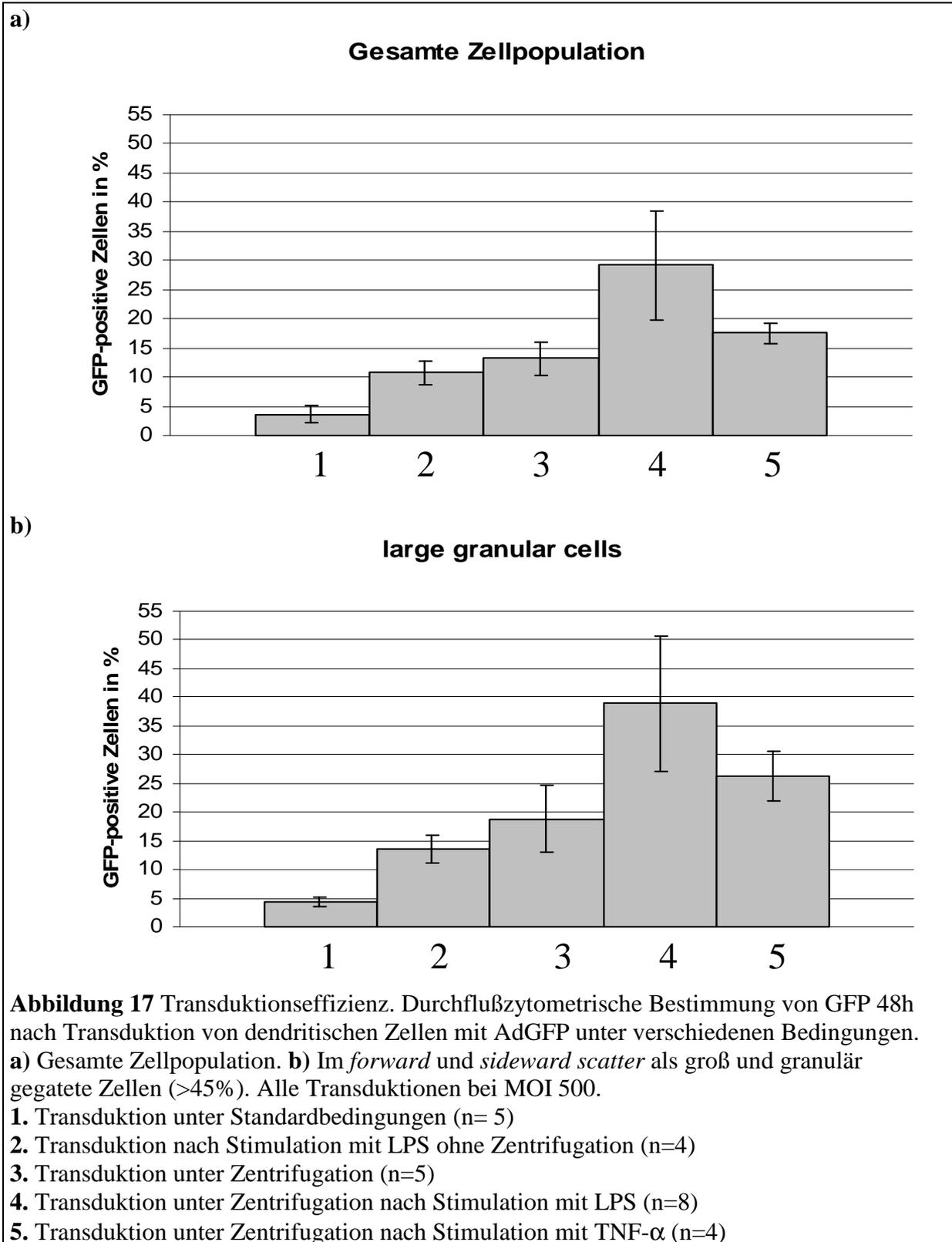
An Tag 6 wurden murine dendritische Zellen geerntet und unter verschiedenen Bedingungen mit adenoviralen Vektoren transduziert. AdGFP diente zur Überprüfung der Transduktionseffizienz. Quantifiziert wurde die Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch anhand der Expression von GFP 48 h nach der Transduktion. Gemessen wurde gegen AdMock-transduzierte dendritische Zellen. Die Markerregionen wurden so gewählt, daß weniger als 2% der AdMock-transduzierten Zellen positiv für grünes Signal waren. Große granuläre Zellen wurden gegatet. Mit den Gates wurden mehr als 45% der Zellen erfaßt.

In einem Pilotexperiment zeigte sich eine überlegene Transduktionsrate bei MOI 500 im Gegensatz zu MOI 100. MOI 1000 führte zu hohen Anteilen avitaler Zellen, gemessen an der Propidiumjodidaufnahme und der Anfärbbarkeit mit Trypanblau (>70%). Niedrigere MOIs resultierten in niedrigeren Anteilen Propidiumjodid-aufnehmender Zellen sowie geringerer Streubreite in *forward* und *sideward scatter*, wodurch bis zu 80% der Zellen durch die Gates bei MOI 100 erfasst wurden. In einem Pilotexperiment waren keine Unterschiede sichtbar zwischen DC welche in PBS oder DC-Medium mit oder ohne FCS transduziert worden waren.



**Abbildung 16** Murine dendritische Zellen nach Transduktion mit AdGFP MOI 500. Die Zellen wurden nach Stimulation mit LPS unter Zentrifugationsbedingungen transduziert. Der gleiche Bildausschnitt ist unter dem Durchlichtmikroskop vergrößert dargestellt. Links unter blauem Licht. Die Fluoreszenz von GFP ist deutlich zu erkennen.

In die Auswertung wurden insgesamt 26 Experimente, durchgeführt an 15 verschiedenen Tagen, einbezogen, in denen dendritische Zellen unter vergleichbaren Bedingungen mit AdGFP transduziert worden waren. 5 mal wurden Zellen ohne Zentrifugation transduziert, weitere 4 mal nach vorheriger Stimulation mit LPS, jeweils 2 Experimente wurden zeitgleich durchgeführt. Unter Zentrifugationsbedingungen wurden insgesamt 13 Experimente durchgeführt, 8mal nach Stimulation mit LPS, davon erfolgten jeweils 2 Versuche gleichzeitig. Zeitgleich zu den Transduktionen unter Zentrifugationsbedingungen nach Stimulation mit LPS wurden 4 Transduktionen unter Zentrifugationsbedingungen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  durchgeführt. Der Anteil transduzierter Zellen war allgemein höher innerhalb der gegateten Zellpopulationen. Ohne Zentrifugation war der Anteil grün fluoreszierender Zellen nach Transduktion mit AdGFP (MOI 500) gering und lag im Durchschnitt bei 3,6% ( $\sigma = 1,5$ ). Durch Stimulation mit LPS stieg der Anteil transduzierter Zellen signifikant auf 10,7% ( $\sigma = 2,1$ ) ( $p = 0,01$ ). Unter Zentrifugationsbedingungen stieg der Anteil GFP-positiver Zellen auf durchschnittlich 13,2% ( $\sigma = 2,9$ ) ( $p = 0,001$ ). Durch Stimulation mit LPS 12 Stunden vor Zentrifugation wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen zusätzlich signifikant auf durchschnittlich 29,2% ( $\sigma = 9,3$ ) ( $p = 0,001$ ) erhöht. Durch die Stimulation mit LPS vor Zentrifugation resultieren höhere Transduktionsraten als durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  (17,6%;  $\sigma = 1,8$ ;  $p = 0,01$ ). Werden nur die gegateten Zellpopulationen betrachtet („large granular cells“), so ließ sich eine Transduktionsrate von bis zu 48% erzielen. Im Mittel wurden 38,2% ( $\sigma = 11,8$ ) gemessen. Ohne Stimulation oder Zentrifugation wurden in der gegateten Population 4,3% ( $\sigma = 0,8$ ) gemessen.



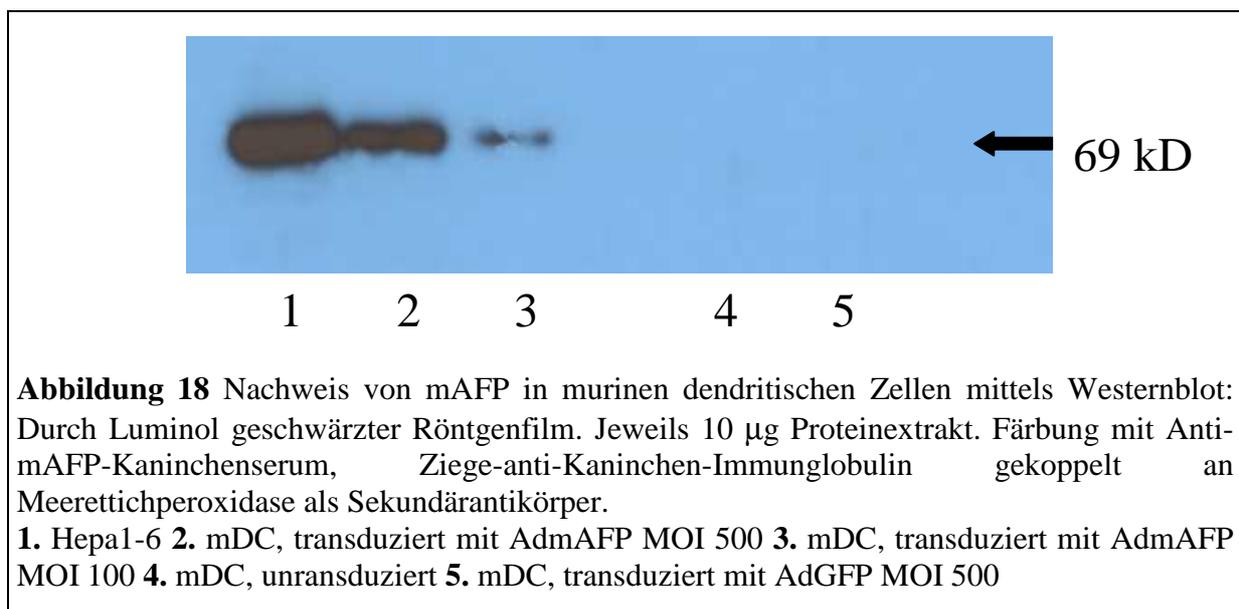
Die Steigerung der Transduktionsrate durch Stimulation und Zentrifugation ist hochsignifikant ( $p = 0,0001$ ). Die Propidiumjodidaufnahme unterschied sich nicht signifikant voneinander und schwankte zwischen 25% und 30%. Ohne Zentrifugation, aber mit Stimulation, wurden durchschnittlich 13,6% erzielt ( $\sigma = 2,5$ ), mit Zentrifugation, aber ohne

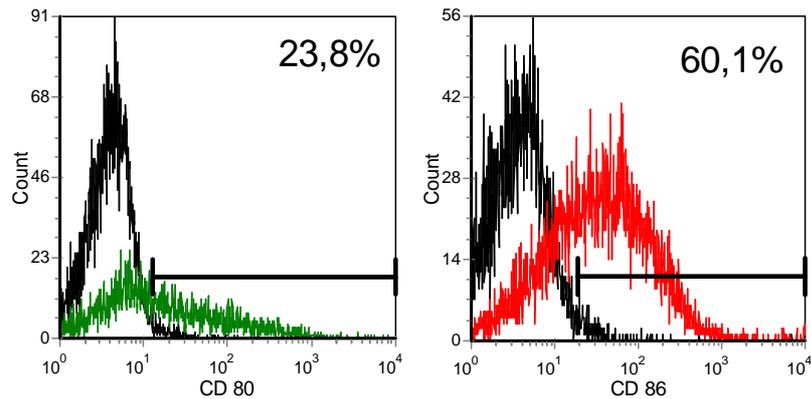
Stimulation, 18,7% ( $\sigma = 5,9$ ). Beide Modi erzielten signifikant unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich mit der konventionellen Transduktion ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,005$ ). Durch die Stimulation mit LPS vor Zentrifugation resultieren höhere Transduktionsraten als durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  auch in der gegateten Population (26,46%;  $\sigma = 4,3$ ;  $p = 0,03$ ).

## 6.5. Transduktion muriner dendritischer Zellen mit AdmAFP

48h nach Transduktion muriner dendritischer Zellen mit AdmAFP unter Zentrifugationsbedingungen bei MOI 100 und MOI 500 nach Stimulation mit LPS wurden Proteinextrakte gewonnen und mittels Westernblot auf mAFP untersucht (Siehe: 5.2). Zum Nachweis von mAFP diente ein polyklonales Anti-mAFP-Kaninchenserum als primärer Antikörper und ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper als sekundärer Antikörper. Letzterer katalysierte die Umsetzung von Luminol, welches aufgelegte Röntgenfilme schwärzte. Da reines mAFP kommerziell nicht erhältlich ist, dienten die Proteinextrakte von Hepa1-6-Zellen als Positivkontrolle.

Bereits bei MOI 100 ließ sich bei 69 kD eine deutliche Bande nachweisen. Eine stärkere Bande war bei MOI 500 sichtbar, wenn auch schwächer als die des, als Positivkontrolle verwendeten, Proteinextrakts aus Hepa1-6. Proteinextrakte untransduzierter bzw. AdGFP-transduzierter dendritischer Zellen zeigten wie erwartet kein Signal im Westernblot (Abbildung 18).





**Abbildung 19** Durchflußzytometrie. Oberflächenmarker AdmAFP-transduzierter muriner dendritischer Zellen. CD 80: FITC-markierte Antikörper (grün), CD 86: PE-markierte Antikörper (rot). Jeweils gegen Isotypenkontrolle aufgetragen (schwarz). Dargestellte Populationen wurden als „*large granular cells*“ im *forward* und *sideward scatter* gegatet (jeweils >85% der Gesamtpropulation). Repräsentatives Experiment. Die Expression von CD 80 ist im Vergleich zu stimulierten untransduzierten mDC reduziert, CD 86-positive Zellen zeigen weniger Signalintensität. (Siehe Abbildung 15).

Um den Einfluß sowohl der adenoviralen Transduktion als auch der Expression von mAFP durch die dendritischen Zellen auf die Ausreifung der Zellen zu beurteilen, wurden mit AdmAFP transduzierte Zellen 48h nach Transduktion durchflußzytometrisch untersucht. Die Transduktion mit adenoviralen Vektoren hatte keinen Einfluß auf die Expression von CD11c und CD40. Jedoch zeigten sich nach Transduktion mit AdmAFP tendentiell geringere Raten CD80 positiver Zellen (24%, n=2) und die Intensität der CD86-positiven Zellen war geringer (Abbildung 19). AdMock transduzierte Zellen zeigten den LPS-stimulierten untransduzierten DC vergleichbare Expressionsmarker.

## 7. Diskussion

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit (Kew 2002). In den westlichen Industrienationen ist ein Anstieg der Erkrankungszahlen aufgrund erhöhter Prävalenzen von chronischen Hepatitis C-Virusinfektionen zu beobachten (El-Serag und Rudolph 2007, Jepsen et al. 2007). Die Prognose des hepatozellulären Karzinoms ist schlecht. Ausgehend von der Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Einteilung werden unter Therapie 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 70% im Frühstadium, 3-Jahres-Überlebensraten von bis zu 40% im Zwischen- und fortgeschrittenen Stadium, sowie 1-Jahres-Überlebensraten von 10% im Endstadium unterschieden (Bruix et al. 2005). Angesichts der in der Regel späten Diagnosestellung liegen heute die Gesamtüberlebensraten trotz Therapie immer noch unter 10% auf fünf Jahre (Llovet et al. 2003). Die im Vergleich zu historischen Kollektiven verbesserten Überlebensraten im Frühstadium werden durch die chirurgischen Methoden der Resektion und der Transplantation erreicht. Diese kurativen Ansätze werden durch zugrundeliegende Zirrhosen, multilokuläres Auftreten der Tumore, die schnelle Progression des HCC und nicht zuletzt durch die knappe Organverfügbarkeit in ihrer Anwendbarkeit und ihrem Erfolg eingeschränkt. Systemische Chemotherapien zeigen in der Regel keine Wirksamkeit (Trojan et al. 2007). In jüngster Zeit wurde eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens unter Therapie mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib berichtet (Llovet et al. 2008). Derartige auf molekulare Zielstrukturen gerichtete Therapieansätze sind vielversprechend, auch wenn bislang nur in wenigen Fällen eine Regression des Tumors beobachtet werden kann. Daher besteht weiterhin dringender Bedarf an effektiveren Therapieverfahren.

Ein grundsätzliches Charakteristikum von Tumoren im Allgemeinen und dem HCC im Besonderen ist die Tatsache, daß sie der Detektion durch das Immunsystem entgehen, obwohl sie aufgrund von Mutationen, Re- und Überexpression eine Vielzahl von tumorspezifischen Antigenen tragen. So wurde in jüngerer Zeit eine Reihe von sogenannten Cancer/Testis Antigenen beschrieben, wie etwa NY-ESO und Produkte der MAGE-A Genfamilie (Xiao und Chen 2004). Das am längsten bekannte und am besten erforschte Tumorantigen ist Alpha-Fetoprotein (Deutsch 1991). Ein Großteil der HCC exprimiert AFP (Ruoslahti und Seppälä 1979).

Obwohl AFP-spezifische Effektorzellen in HCC-Patienten nachgewiesen wurden (Mikuzoshi et al. 2006, Alisa et al. 2005, Hanke et al. 2002b), kommt es in der Regel nicht zu einer tumorkontrollierenden Immunantwort. Dies könnte unter anderem auch in der Besonderheit

des Lebergewebes begründet sein, welches in der Lage ist, vermittelt durch Sinusendothelzellen, insbesondere gegenüber löslichen Antigenen Toleranz zu induzieren (Berg et al. 2006, Knolle und Limmer 2003). Die Durchbrechung der Immuntoleranz und Herbeiführung einer tumorspezifischen Immunabwehr könnte eine vielversprechende Therapiestrategie gegen das HCC sein. Selbst wenn sie nicht zur Herbeiführung kompletter Remissionen größerer Tumore geeignet sein sollte, so könnte sie doch die Rezidivrate nach Tumorresektionen senken. Unterschiedliche Strategien wurden dazu verfolgt. Ein Ansatz ist die Induktion einer Immunantwort durch die Verwendung professioneller antigenpräsentierender Zellen, welche AFP präsentieren. *In vitro* zeigen humane dendritische Zellen, welche mittels AFP-rekombinanten adenoviralen Vektoren transduziert wurden, große Effektivität in der Stimulation von AFP-spezifischen Effektoren (González-Carmona et al. 2006). Diesen Ansatz wollten wir in ein Tiermodell übertragen, um ihn *in vitro* und *in vivo* zu optimieren. Ziel dieser Arbeit war die Klonierung eines mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektors, die Etablierung der Gewinnung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark in unserem Labor und die Transduktion derselben mit dem erwähnten Vektor.

## 7.1. Herstellung adenoviraler Vektoren

Zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort müssen dendritische Zellen das Antigen den Effektorzellen zusammen mit kostimulatorischen Signalen präsentieren (Janeway 2001). Eine Reihe von Faktoren spricht für die Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorantigenen durch adenovirale Transduktion: Erstens wird, im Gegensatz zur Inkubation von DC mit Protein, durch genbasierte Beladung erreicht, daß die dendritische Zelle alle MHC-restringierten Epitope selbst produziert und sie im MHC I-Kontext präsentiert. Zudem werden sezernierte Proteine, neben der *cross presentation*, wieder aufgenommen, prozessiert und in MHC II-Kontext präsentiert. Zweitens müssen mRNA oder gewöhnliche Expressionsvektoren mittels Elektroporation oder Lipofektion in die dendritische Zelle verbracht werden. Diese Verfahren sind toxisch und ineffektiv (Arthur et al. 1997). Drittens ist die zusätzliche immunologische Stimulation durch den adenoviralen Vektor im Rahmen einer *ex vivo*-Beladung unter Umständen von Vorteil (Korst et al. 2002). Viertens wurde mit adenoviralen Vektoren bereits viel präklinische und klinische Erfahrung gewonnen, im Gegensatz zu anderen viralen Vektoren, wie *adeno-associated virus* oder lentiviralen Vektoren (Ribas 2005, Mahadevan et al. 2007, Wang et al. 2006).

Da der von uns verfolgte Ansatz eine *ex vivo* Beladung von dendritischen Zellen vorsieht, ergeben sich aus der Verwendung der Vektoren keine Probleme hinsichtlich systemischer Toxizität oder neutralisierender Antikörper.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein mAFP-rekombinanter adenoviraler Vektor sowie ein GFP-kodierender Vektor hergestellt. AdMock, ein Kontrollvektor ohne Transgen, stand im Labor bereits zur Verfügung und mußte lediglich amplifiziert und titriert werden. Verwendung fand das AdEasy-System von He et al. (1998) welches replikationsdefiziente Adenoviren vom Serotyp 5 zur Basis hat. Die in dieser Arbeit erstellten Vektoren gehören zur sog. ersten Generation adenoviraler Vektoren (Danthinne und Imperiale 2000). Dies bedeutet, daß durch Deletion der sog. E1-Region im Genom des Vektors, eine Replikation außerhalb von speziellen Verpackungszelllinien nicht möglich ist. Die Verpackungszelllinien sind stabil mit der E1-Region transfiziert und exprimieren die für die Replikation notwendigen Genprodukte konstitutiv (Fallaux et al. 1996). Durch das Fehlen der adenoviralen E3-Region im Genom des Vektors wird zudem die Präsentation von MHC-Molekülen auf den Zielzellen nicht unterdrückt (Shenk 2001), ein für den hier dargestellten immuntherapeutischen Ansatz wesentliches Merkmal.

Die cDNA von mAFP stand bereits zur Verfügung (Hanke et al. 2002a). Sie wurde in den Transfektor pShuttle-CMV kloniert und dieser mit dem Backbone Vektor pAdEasy1 rekombiniert. Die Verwendung eines Transfektors ist einer der Vorteile des AdEasy-Systems, da die Handhabung des großen adenoviralen Genoms während der Klonierung schwierig wäre. Der zweite Vorteil des AdEasy-Systems ist die homologe Rekombination des Transfektors mit dem Backbone-Vektor in *E.coli*. Die Elektroporation der Plasmide in Bakterien ist einfach und effizient. Die Anzahl der zu analysierenden Klone ist durch bakterielle Resistenzgene gering, deren Wachstumsgeschwindigkeit groß. Wildtyp-Rekombinationen entstehen, im Gegensatz zu Systemen, welche die homologe Rekombination mit dem Transfektor in eukaryonten Verpackungszelllinien vorsehen, in deutlich geringerer Anzahl (Danthinne und Imperiale 2000).

Ebenso wurde der Transfektor pAdTrackCMV mit dem Backbonevektor homolog rekombiniert. Die Transfektion der rekombinanten Vektorplasmide in die Verpackungszelllinie erfolgte jeweils mittels Lipofectamine. Die Produktion infektiöser Vektoren war im Falle des GFP-kodierenden Vektors (AdGFP) unter blauem Licht anhand

der Fluoreszenz direkt zu beobachten. Auf die Produktion von mAFP-kodierenden Vektoren (AdmAFP) mußte hingegen durch das Auftreten zytopathischer Effekte geschlossen werden. Die Vektoren wurden in mehreren Runden von Amplifikation und Lyse vermehrt, mittels Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten aufgereinigt und durch Plaque Assays titriert. Die erzielten Titer reichten von  $5 \times 10^9$  bis  $10^{12}$  pfu/ml, je nachdem, ob die Ernte zum optimalen Zeitpunkt oder verspätet durchgeführt worden war und entsprachen den Literaturangaben (He et al. 1998).

Der Nachweis der GFP-Produktion erfolgte im Durchlichtmikroskop unter blauem Licht. Der Nachweis der Expression von mAFP nach adenoviraler Transduktion erfolgte in empfänglichen A549-Zellen. Diese exprimieren nicht die E1-Regionen des adenoviralen Genoms. Transduzierte A549-Zellen produzieren demnach keine neuen Vektoren und die Expression des adenoviralen Transgens ist somit von der Infektionslast abhängig. Zusätzlich zum Nachweis des mAFP-Proteins anhand eines polyklonalen Serums mittels Westernblot wurde eine Bestimmung der mRNA-Transkription von mAFP durch eine reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Durch den hochspezifischen Nachweis auf transkriptionaler Ebene sollte der methodisch bedingt wenig spezifische Nachweis auf translationaler Ebene ergänzt werden.

Der Nachweis von mAFP-mRNA gelang in transduzierten A549-Zellen regelhaft bei einem MOI von 10 oder mehr. Ebenso gelang der Nachweis von mAFP-mRNA in Hepa1-6-Zellen in Übereinstimmung mit der Literatur, welche die Hepa1-6-Zelllinie als mAFP-positiv beschreibt (Darlington et al. 1980, Darlington 1987). Stets negativ bei positiver  $\beta$ -Actin-Kontrolle blieben die untransduzierten A549-Zellen und jene welche mit AdMock oder AdGFP transduziert worden waren.

Proteinextrakte der transduzierten Zellen wurden ferner im Westernblot untersucht, als Positivkontrolle wurde Hepa1-6 verwendet. Proteinextrakte aus Hepa1-6 ergaben regelmäßig ein kräftiges Signal im Gegensatz zu A549-Zellen, welche untransduziert oder mit AdMock oder AdGFP transduziert worden waren. Eine Bande ließ sich nach Transduktion mit AdmAFP regelhaft bereits ab einer MOI von 10 nachweisen. Dosisabhängig zeigte sich ein stärkeres Signal. Die Bande war unquantifiziert stärker ab einer MOI von 50 als die Positivkontrolle bei gleicher eingesetzter Proteinmenge.

Die dosisabhängige Expression von mAFP in mit AdmAFP transduzierten Zellen war somit nachgewiesen.

## 7.2. Herstellung muriner dendritischer Zellen

Dendritische Zellen gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Sie filtern Antigene aus ihrer Umgebung, prozessieren diese und sind in der Lage, sie in MHC-Kontext zu präsentieren. Dabei ist es ihnen möglich, durch die Bereitstellung kostimulatorischer Signale in der Interaktion mit CD4- und CD8-positiven T-Zellen eine adaptive Immunantwort zu induzieren (Janeway et al. 2001). Die am weitesten verbreitete Methode zur Gewinnung von murinen dendritischen Zellen *in vitro* ist von Inaba et al. (1992) beschrieben worden. Die Generierung muriner dendritischer Zellen war in unserem Labor nicht etabliert und ein wesentlicher Aspekt der vorgestellten Arbeit war die Adaption und Standardisierung der notwendigen Protokolle. Das von Inaba et al. (1998) beschriebene Protokoll wurde in einer weit verbreiteten Modifikation verwendet. Die antikörperabhängige komplementvermittelte Lyse von ausdifferenzierten leukozytären Zellen im Originalprotokoll wurde durch eine magnetische Depletion ersetzt. Dies beschleunigt das Protokoll und toxische Nebeneffekte des Komplements entfallen. Die murinen dendritischen Zellen (DC) wurden aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Mäuse gewonnen, mittels magnetischer Depletion angereichert und in Gegenwart von mGM-CSF und mIL-4 ausdifferenziert (Labeur et al. 1999; Schmidt et al. 2003). Die Addition von IL-4 zu den Kulturen erhöht die stimulatorische Aktivität der so gewonnenen Zellen (Wells et al. 2005). Der verwendete Mausstamm war die C57L/J-Maus welche syngen zur Hepatomzelllinie Hepa1-6 ist (Grimm et al. 2000, Shen et al. 1982). Die Möglichkeit der späteren Verwendung der dendritischen Zellen *in vivo* zur Behandlung von mAFP-positiven Tumoren war eine grundlegende Bedingung bereits im Planungsstadium.

Aus Femura und Tibiae wurden pro Maus zwischen  $3 \times 10^7$  und  $5 \times 10^7$  Zellen gewonnen und magnetisch depletiert. Die Ausbeute nach magnetischer Depletion betrug etwa 30% der isolierten Zellen. Nach Ausdifferenzierung waren durchschnittlich  $1,5 \times 10^7$  Zellen pro Maus verfügbar. Die Zellen waren positiv für CD11c und exprimierten an Tag 6 CD40, CD80 und CD86. 48h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS wurden die Marker CD40, CD80 und CD86 vermehrt exprimiert. An Tag 11 waren etwa 75% der Zellen positiv für CD11c. Berücksichtigt man das Protokoll sowie die Expression des typischen Markers CD11c und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Markers CD40, so zeigt sich, daß dendritische Zellen vom myeloischen Typ in guter Reinheit vorlagen. Diese dendritischen Zellen eignen sich zur Induktion von reaktiven Effektorzellen und bilden ein gutes Modell für die humanen dendritischen Zellen, welche aus menschlichen Blutmonozyten gewonnen

werden können, da sie ihnen in Phänotyp und Verhalten ähneln (Sato und Fujita 2007, Lipscomb und Masten 2002).

### **7.3. Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren**

Dendritische Zellen, welche adenoviral transduziert wurden und AFP exprimieren, scheinen in der Lage zu sein, effizient anerge Effektorzellen von HCC-Patienten zu stimulieren. Sie scheinen ferner, wie jüngere Ergebnisse bestätigen, Peptid-gepulsten DC darin überlegen zu sein (Evdokimova et al. 2007). Die Transduktion dendritischer Zellen erfordert jedoch hohe MOI, da dendritische Zellen keinen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) exprimieren.

Zur Infektion nutzen Adenoviren den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, welcher in hohem Maße von A549- und 911-Zellen exprimiert wird (Bergelson et al. 1998). Zum Nachweis des murinen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (mCAR) wurden murine dendritische Zellen zunächst mit einem Anti-mCAR-Kaninchenserum und ferner mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper inkubiert (Bergelson et al. 1998). In der darauf folgenden durchflußzytometrischen Messung zeigten, übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen geringen Transduktionseffizienzen von adenoviralen Vektoren, nur 5% der Zellen ein Signal.

Wir transduzierten die dendritischen Zellen an Tag 6 nach der Isolierung aus dem Knochenmark mit AdGFP. Die Transduktionseffizienz wurde durchflußzytometrisch bestimmt und entsprach der Quantifizierung unter blauem Licht im Durchlichtmikroskop. Die Transduktionsraten waren gering und lagen unter den Berichten einiger Arbeitsgruppen in der Literatur. Mit MOI 500 wurde im Durchschnitt eine Transduktionsrate von 4,3% innerhalb der gegateten Zellpopulation erzielt. Im Vergleich liegen die Transduktionsraten anderer Arbeitsgruppen für murine dendritische Zellen bei vergleichbaren MOI in Bereich von 50% oder mehr (z.B.: Miller et al. 2003, Korst et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen hingegen berichten ebenfalls von geringen Transduktionseffizienzen (Melero et al. 1999).

Ein durchflußzytometrisches Meßartefakt konnte mikroskopisch ausgeschlossen werden. Da Vektoren, welche auf dem humanpathogenen Adenovirus Typ 5 beruhen, bereits mehrfach zur Transduktion muriner dendritischer Zellen eingesetzt worden waren, scheint auch kein grundsätzliches Problem mit der Art des Vektors vorzuliegen. Ein Defekt des neu

rekombinierten Vektors oder fehlerhafte Durchführungen der Titrierungen wurde durch den Vergleich mit bereits vorhandenen Stocks aus älteren Klonierungen und Produktionen ausgeschlossen. Zudem zeigten mit dem neu rekombinierten AdGFP transduzierte A549-Zellen unauffällige Transgenexpressionen. In Pilotexperimenten wurde durch die Gegenwart von Serum während der Transduktion kein Unterschied in der GFP-Expression deutlich. Dies stimmt mit den sehr variablen aber dennoch effektiven Bedingungen in der Literatur überein. Während viele Arbeitsgruppen an Tag 8 nach Isolation aus dem Knochenmark transduzieren, verwenden Korst et al. (2002) und Miller et al. (2003) ebenfalls 6 Tage alte DC. Auch der Mausstamm scheint nicht ausschlaggebend zu sein, wie in Pilotexperimenten zu sehen war, in denen C57BL/6- und C3H-Mäuse mit ähnlichen Ergebnissen Verwendung fanden. Korst et al. und Miller et al. gebrauchen für ihre Transduktionsexperimente verschiedene Mauslinien, unter anderem auch C57BL/6-Mäuse. Miller et al. berichten, im Gegensatz zu Korst et al., deutliche Unterschiede in der Transgenexpression zwischen Balb/c und C57L/J Mäusen. Jedoch zeigten die aus den -mit den C57BL/6-Mäusen eng verwandten- C57L/J-Mäusen gewonnenen DC deutlich mehr Fluoreszenz als diejenigen der Balb/c-Mäuse.

Einstimmig berichtet die Literatur aber von der Notwendigkeit hoher MOI bei der Transduktion dendritischer Zellen. Dafür wird das Fehlen des CAR verantwortlich gemacht. Eine weitere Ursache für unsere, im Vergleich mit manchen Arbeitsgruppen, geringen Transduktionsraten bei hohen MOI konnte von uns jedoch nicht identifiziert werden, so daß wir Strategien erprobten, um dennoch zu akzeptablen Transgenexpressionen zu gelangen. Nishimura et al. (2001) hatten für humane dendritische Zellen eine Zentrifugationsmethode vorgeschlagen, welche durch unser Labor bereits adaptiert worden war (González-Carmona et al. 2006). Mit der Übertragung dieses Ansatzes auf die murinen DC gelang eine signifikante Steigerung der Expressionsraten auf durchschnittlich 18,7% bei MOI 500. Der genaue Mechanismus der erhöhten Transduktion durch die G-Kräfte ist nicht bekannt. Analog zu Nishimura et al. (2002) läßt sich spekulieren, daß die adenoviralen Vektoren stärker an niedrig affine alternative Rezeptoren, binden und internalisiert werden können, oder direkt mit den als Korezeptor fungierenden Integrinen interagieren (Noureddini und Curiel, 2005).

Die Arbeitsgruppe um DeMatteo veröffentlichte während der Etablierung unserer Protokolle mit der Zentrifuge einen Artikel, welcher eine Steigerung der Transduktionsraten durch Stimulation mittels LPS oder TNF- $\alpha$  12 Stunden vor Transduktion beschreibt (Miller et al. 2003). Dieser Ansatz wurde ebenfalls übernommen und zeigte Effizienzen von

durchschnittlich 13,6%. Durch die Kombination von Stimulation und Zentrifugation konnten Ergebnisse von bis zu 48% erzielt werden. Dabei zeigte sich eine Überlegenheit der Stimulation von LPS im Gegensatz zu der mit TNF- $\alpha$ .

Der zugrundeliegende Mechanismus der verbesserten Transduktionsraten nach Stimulation ist unklar. Unter Umständen erhöhen immature dendritischen Zellen nach Stimulation kurzfristig ihre pinozytotische Aktivität und somit die Aufnahme von adenoviralen Vektoren.

Nach Standardisierung des Transduktionsprotokolls wurde auch die Expression von mAFP in dendritischen Zellen nach Transduktion mit AdmAFP überprüft. Dazu wurden, 48h nach Transduktion mit verschiedenen MOI, Proteinextrakte aus dendritischen Zellen angefertigt und im Westernblot untersucht. Als Positivkontrolle dienten Proteinextrakte aus Hepa1-6-Zellen. Bereits bei einer MOI von 100 war eine Bande zu erkennen, MOI 500 erzielte kräftige Signale. Untransduzierte oder AdGFP-transduzierte DC waren durchweg negativ. Trotz der aufwendigen Transduktionsbedingungen erwies sich AdmAFP somit als geeigneter Vektor, um in DC die Expression von mAFP zu induzieren.

## **7.4. Immunologische Effekte**

Zur effektiven Stimulation der Effektoren müssen dendritische Zellen mit diesen interagieren, indem sie Antigene präsentieren und kostimulatorische Signale bereitstellen. Diese Signale bestehen aus Oberflächenmarkern wie z.B. CD80 und CD86, welche als Ligand für CD28 auf T-Zellen fungieren, und Interleukinen, welche parakrin auf die Effektorzellen wirken. Zu diesen Interleukinen gehört beispielsweise Il-12, welches für das Schlüsselsignal zur Th1-Differenzierung angesehen wird, sowie Il-4 welches, vereinfacht gesprochen, als Antagonist dazu wirkt (Reiner 2007). Die Ausreifung von dendritischen Zellen, welche auf ein Gefahrensignal hin geschieht, geht mit erhöhter Expression dieser Marker bzw. Sekretion von Cytokinen einher und bewirkt eine verstärkte antitumorale Wirkung (Labeur et al. 1999). Zu diesen Gefahrensignalen werden TNF- $\alpha$  und auch LPS gezählt. Die Verwendung dieser Substanzen im Rahmen der Transduktion erscheint daher nicht als Nachteil.

### **7.4.1 Einfluß adenoviraler Vektoren auf dendritische Zellen**

Der Effekt von adenoviraler Transduktion an sich auf die stimulatorischen Fähigkeiten von DC wird allgemein als verstärkend beurteilt (Hirschowitz et al. 2000). Korst et al. (2002)

berichten von erhöhten Expressionraten von CD40, CD80, CD86 und MHC II auf murinen dendritischen Zellen nach Transduktion mit einem Leervektor. Auch die Sekretion von IL-12 wurde gesteigert. Miller et al. (2003) bestätigte dies, konnte jedoch keinen zusätzlichen Effekt durch die Stimulation durch TNF- $\alpha$  oder LPS nachweisen, was auf einen Ceiling-Effekt von Gefahrensignalen hinweisen könnte. Die Expression der Marker 48 Stunden nach Transduktion mit AdMock und LPS war vergleichbar mit der Expression 48 Stunden nach Stimulation mit LPS alleine in Übereinstimmung mit Miller et al. (2003). Insgesamt wurden aber geringere Expressionsraten erzielt, als von Miller et al. (2003) beschrieben. Dies könnte durch die Reinheit der Zellpopulation bedingt sein, als auch durch weniger restriktive Gateparameter während der durchflußzytometrischen Messungen.

#### **7.4.2 Einfluß von AdmAFP und AFP auf dendritische Zellen**

Die mit AdmAFP transduzierten dendritischen Zellen wurden auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Expression von CD80 und CD86 vermindert war, im Vergleich mit stimulierten bzw. mit AdMock transduzierten dendritischen Zellen. CD80 war in Intensität und der Anzahl positiver Zellen deutlich vermindert, CD86 insbesondere in der Intensität.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Um et al. (2004) veröffentlicht. Sie zeigten anhand von humanen dendritischen Zellen, daß die Gegenwart von AFP zu geringeren Expressionraten von CD86 und einigen anderen Markern führt. Im Gegensatz zu unseren Daten war insbesondere auch die Expression von CD40 herunterreguliert. Dies korrelierte mit verminderter Produktion von Zytokinen und reduzierter Stimulation von Effektorzellen *in vitro*. Ferner war die Apoptoserate der dendritischen Zellen erhöht. Das AFP war in diesen Arbeiten jedoch dem Überstand beigefügt worden und relativ hohe Konzentrationen waren notwendig (min. 2500 ng/ml) um die beobachteten Effekte zu erzielen. Die Konzentration von mAFP in den Überständen der mAFP-transduzierten DC ließ sich leider nicht ermitteln, da monoklonale Antikörper für ein ELISA und rekombinantes mAFP für eine Eichreihe nicht zur Verfügung standen. Es läßt sich aber spekulieren, daß wirksame AFP-Spiegel erreicht worden sein könnten, insbesondere wenn vorausgesetzt wird, daß für die beobachteten Effekte eine Internalisierung bzw. eine zytoplasmatische Form von mAFP bzw. AFP nötig ist. AFP-Rezeptoren wurden bereits auf Lymphozyten beschrieben, ebenso die Internalisierung von AFP (Suzuki et al. 1992, Torres et al. 1990).

## 7.5. Ist AFP immunsuppressiv?

Bereits in den 70er Jahren wurden Zusammenhänge zwischen AFP und Immunsuppression im Sinne der gestörten Lymphozytenfunktion festgestellt. Diverse Beobachtungen zwischen dem Auftreten von HCC und derartigen Phänomenen wurden seither veröffentlicht (Kakumu 2000, Saibara et al. 1993, Lee 1991). Speziell die Inhibition von antigenpräsentierenden Zellen scheint mit AFP assoziiert zu sein (Um et al. 2004). Die Beobachtungen von Um et al. (2004) bzw. aus unserem Labor stehen in Einklang mit anderen Veröffentlichungen, welche blockierende Effekte von AFP auf antigenpräsentierende Zellen beschreiben (Laan-Pütsep et al. 1991, Lu et al. 1984). Ferner lassen sie sich mit Berichten vereinbaren, wonach AFP-Spiegel in HCC-Patienten mit Störungen der Lymphozytenfunktion einhergehen (Murgita et al. 1978, Lester et al. 1976 und 1978). Allerdings gibt es ebenfalls experimentelle Evidenz dafür, daß AFP-Spiegel keinen Einfluß auf die Ausreifung von dendritischen Zellen haben, welche aus HCC-Patienten gewonnen wurden (Ritter et al. 2004). Im Zusammenhang mit der letzten Studie an HCC-Patienten durch Butterfield et al. (2006) wurden Daten erhoben, welche andeuten, daß die Zahl reaktiver AFP-spezifischer CD4-Zellen in HCC-Patienten reduziert ist. Ferner scheint zwar die Anzahl von AFP-spezifischen CD8-Zellen erhöht zu sein, diese sind aber offenbar anerg (Butterfield et al. 2007). *In vitro* ließen sich die ohnehin reduzierten reaktiven CD4 Zellen der HCC-Patienten durch gepulste dendritische Zellen signifikant weniger stimulieren, als durch die adenoviral transduzierten dendritischen Zellen (Evdokimova et al. 2007). Leider stehen derzeit von der Arbeitsgruppe um Butterfield keine Daten zur Verfügung, welche die Transduktionseffizienzen oder die Markerprofile der dendritischen Zellen beschreiben, welche mit AFP- oder in der Vergangenheit mit mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektoren transduziert wurden.

Eine mögliche Interpretation der Studienlage wäre, daß AFP von dendritischen Zellen *in vivo* aufgenommen wird und diese an der Ausreifung hindert. Reaktive CD4- und CD8-Zellen würden somit ohne kostimulatorische Signale während der Interaktion mit den DC zu anergen Phänotypen ausdifferenzieren. Durch die adenovirale Beladung der DC mit AFP scheinen sie aber grundsätzlich zur Ausreifung und Durchbrechung der Anergie in der Lage zu sein, dies suggerieren zumindest unsere humanen *in vitro*-Daten (González-Carmona et al. 2006).

## 7.6. Ausblick

Die vorgestellten Arbeiten waren in ein Projekt eingebunden, welches zum Ziel hatte, die stimulatorische Aktivität der mit AdmAFP transduzierten dendritischen Zellen auf Lymphozyten *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden im weiteren Verlauf murine Lymphozyten aus der Milz der Mäuse gewonnen und mit den transduzierten DC kokultiviert. In daraufhin folgenden Zytotoxizitätsassays bewiesen die mit AdmAFP-transduzierten DC zunächst keine signifikant höhere stimulatorische Kapazität als untransduzierte DC, gemessen an der Lyse von Hepa1-6-Zellen durch die kokultivierten Lymphozyten. Hingegen zeigten Lymphozyten, welche mit DC kokultiviert worden waren, die zuvor mit Admock transduziert worden waren, vergleichsweise hohe Lyseraten. Dies geschah in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen bezüglich der Expression von kostimulatorischen Molekülen nach Transduktion und in Widerspruch zu unseren humanen *in vitro*-Daten (González-Carmona et al. 2006). Der Ansatz wurde daraufhin dahingehend weiterentwickelt, daß zusätzlich zu AdmAFP adenovirale Vektoren eingesetzt wurden, welche für kostimulatorische Signale kodieren. Durch die Expression von CD40Ligand oder Il-12 zusätzlich zu mAFP konnten starke mAFP-spezifische Immunreaktionen hervorgerufen werden. Nachdem die Ausreifung der mAFP-exprimierenden DC optimiert worden war, wurden die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse in ein Mausmodell *in vivo* übertragen. Diesbezügliche Daten werden derzeit zur Veröffentlichung vorbereitet.

## 8. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom ist eine häufige Tumorerkrankung mit schlechter Prognose. In Deutschland ist mit über 3 000 Erkrankungsfällen jährlich zu rechnen, bei steigenden Fallzahlen (Schurr et al. 2006). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt insgesamt lediglich 10% (Llovet et al. 2003). Dies ist in den unzureichenden kurativen Therapieansätzen begründet. Chirurgische oder lokoregionäre Maßnahmen können in einem Teil der frühzeitig diagnostizierten Fälle zu einer definitiven Ausheilung führen. Immuntherapeutische Maßnahmen haben in klinischen Studien bei Patienten nach kurativer Resektion zu einer Verbesserung der Prognose geführt (Peng et al. 2005). Eine Optimierung dieser Therapiestrategien könnte auch zu einer erfolgreichen Behandlung von Patienten beitragen, welche aufgrund ihres Tumorstadiums für die Resektion nicht mehr in Betracht kommen. Einer der verfolgten immunologischen Therapieansätze ist die Induktion einer Alpha-Fetoprotein (AFP)-spezifischen Immunantwort mittels Durchbrechung der Immuntoleranz gegen AFP durch manipulierte dendritische Zellen. *In vitro*-Daten zeigen, daß mit einem AFP-rekombinanten adenoviralen Vektor transduzierte dendritische Zellen eine potente und spezifische Immunantwort induzieren können (González-Carmona et al. 2006). Tierversuche sind jedoch vor der Durchführung von Therapieerprobungen im Menschen *in vivo* unabdingbar.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung eines adenoviralen Vektors, welcher für murines Alpha-Fetoprotein (mAFP) kodiert, die Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen sowie die Transduktion derselben mit dem erwähnten Vektor mit dem Ziel, die Immuntoleranz gegenüber mAFP zu durchbrechen. Zudem werden, anhand eines GFP-kodierenden adenoviralen Vektors, verschiedene Strategien erprobt und verglichen, um die Transduktion der dendritischen Zellen zu verbessern.

Es wird gezeigt, daß der klonierte Vektor dosisabhängig zu starker mAFP-Expression in Zielzellen führt. Die aus Knochenmark gewonnenen Zellen weisen den Phänotyp von dendritischen Zellen auf und reifen nach entsprechender Stimulation in typischer Weise aus. Die Transduktionsraten der dendritischen Zellen können durch ein Zentrifugationsverfahren oder durch vorherige Stimulation oder durch eine Kombination der genannten Faktoren erheblich gesteigert werden. Es wird ferner gezeigt, daß dendritische Zellen, welche mit dem mAFP-rekombinanten adenoviralen Vektor transduziert wurden, murines Alpha-Fetoprotein

exprimieren. Die Daten weisen weiterhin daraufhin, daß mAFP zu einer reduzierten Ausreifung der dendritischen Zellen führt, gemessen an der Expression von kostimulatorischen Markern. Diese Beobachtung steht in Einklang mit bereits publizierten Berichten, welche AFP eine immunsuppressive Rolle zuschreiben.

Die dargestellten Arbeiten bildeten die Grundlage für die Untersuchung der Induktion einer mAFP-spezifischen zellulären Immunantwort *in vitro* und im weiteren Verlauf für die Erprobung der Wirkung von kostimulatorischen Signalen auf die Induktion einer mAFP-spezifischen zellulären Immunantwort *in vitro* und *in vivo*.

## 9. Literaturverzeichnis

- Abelev GI, Perova S, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin I. Production of embryonal alpha-globulin by the transplantable mouse hepatomas. *Transplant Bull* **1963**; 1: 174-180.
- Abelev GI, Elgort DA. Alpha-Fetoprotein. In: Holland J, Frei E (Hrsg). *Cancer Medicine*, 2nd Edition. New York, NY, USA: Lea & Febiger, **1982**: 1089-1099.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition. New York: Garland Publishing, Inc, **1994**.
- Alisa A, Ives A, Pathan AA, Navarrete CV, Williams R, Bertolotti A, Behboudi S. Analysis of CD4+ T-Cell responses to a novel alpha-fetoprotein-derived epitope in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **2005**; 11: 6686-6694.
- Armstrong J, Brown RS, Tsugita A. Primary structure and genetic organization of phage T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* **1983**; 11: 7145-7156
- Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* **1997**; 4: 17-25.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **1981**; 2: 1129-1133.
- Bei R, Budillon A, Reale MG, Capuano G, Pomponi D, Budillon G, Frati L, Muraro R. Cryptic epitopes on alpha-fetoprotein induce spontaneous immune responses in hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, and chronic hepatitis patients. *Cancer Res* **1999**; 59: 5471-5474.
- Berg M, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G, Limmer A, Knolle P. Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *Eur J Immunol* **2006**; 36: 2960-2970.
- Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL, Finberg RW. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* **1998**; 72: 415-419.
- Bergstrand CG und Czar B. Demonstration of a new protein fraktion in serum from the human fetus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* **1956**; 8: 174-179.
- Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **1993**; 67: 5911-5921

- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **1979**; 7: 1513–1523.
- Blackburn P, Wilson G, Moore S. Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties. *J Biol Chem* **1978**; 252: 5904-5910.
- Bray F, Guerra Yi M, Parkin DM. The comprehensive cancer monitoring programme in Europe. *Eur J Public Health* **2003**; 13(3 Suppl): 61-66.
- Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, Rimoldi D, Halkic N, Gillet M, Chaubert P, Macdonald HR, Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Immunol* **2005**; 174: 1709-1716.
- Brosius J. Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* **1989**; 8(10):759-777
- Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2005**; 42: 1208-1236.
- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T, Klöppel G. The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* **1989**; 14: 503-513.
- Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Dissette V, Lee E, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* **1999**; 59: 3134-3142.
- Butterfield LH, Ribas A, Meng WS, Dissette VB, Amarnani S, Vu HT, Seja E, Todd K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T-cell responses to HLA-A\*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* **2003**; 9: 5902-5908.
- Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Lee Y, Yang JQ, De la Rocha P, Duran SD, Hernandez J, Seja E, Potter DM, McBride WH, Finn R, Glaspy JA, Economou JS. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* **2006**; 12: 2817-2825.
- Butterfield LH, Ribas A, Potter DM, Economou JS. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol Immunother* **2007**; 56: 1931-1943.
- Calvin NM, Hanawalt PC. High-Efficiency Transformation of Bacterial Cells by Electroporation. *J. Bacteriol* **1988**; 170: 2796-2801.

- Caselmann WH, Alt M. Hepatitis C virus infection as a major risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **1996**; 24(2 Suppl): 61-66.
- Caselmann WH, Meyer M, Kekulé AS, Lauer U, Hofschneider PH, Koshy R. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87: 2970-2974.
- Cassuto E, West SC, Podell J, Howard-Flanders P. Genetic recombination: recA protein promotes homologous pairing between duplex DNA molecules without strand unwinding. *Nucleic Acids Res* **1981**; 9: 4201-4210.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**; 263: 802-805.
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MC, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* **1997**; 336: 1855-1859
- Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2004**; 2: 241-249
- Chi KH, Liu SJ, Li CP, Kuo HP, Wang YS, Chao Y, Hsieh SL. Combination of conformal radiotherapy and intratumoral injection of adoptive dendritic cell immunotherapy in refractory hepatoma. *J Immunother (1997)* **2005**; 28: 129-135.
- Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98: 15191-15196
- Colombo M. Screening of Patients with chronic liver disease. In: Okuda K, Tabor E (Hrsg). *Liver cancer*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone, **1997**: 407-414
- Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst* **1980**; 64: 809-819.
- Darlington GJ. Liver cell lines. *Methods Enzymol* **1987**; 151: 19-38.
- Danthinne X, Imperiale MJ. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* **2000**; 7: 1707-1714.
- Davison E, Kirby I, Whitehouse J, Hart I, Marshall JF, Santis G. Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by alpha(v)beta1 integrin and can be modulated by changes in beta1 integrin function. *J Gene Med* **2001**; 3: 550-559.
- Deugnier Y, Turlin B. Other causes of hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Tabor E (Hrsg). *Liver cancer*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone, **1997**: 97-110.

- Deutsch HF. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* **1991**; 56: 253-312.
- Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **1998**; 75: 347-354.
- Dürr R, Caselmann WH. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg* **2000**; 385: 154-161.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **2004**; 21: 137-148
- El-Refaie A, Savage K, Bhattacharya S, Khakoo S, Harrison TJ, el-Batanony M, Soliman el-S, Nasr S, Mokhtar N, Amer K, Scheuer PJ, Dhillon AP. HCV-associated hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *J Hepatol* **1996**; 24: 277-285.
- El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**; 4: 369-380.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **2007**; 132: 2557-2576.
- Esche C, Loshkin A, Shurin GV, Gastman BR, Rabinovich H, Watkins SC, Lotze MT, Shurin MR. Tumor's other immune Targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* **1999**; 66: 336-344.
- Eulenspiegel T, Schneider C. Immunological research is an efficient procedure for reducing monetary assets. *Arzt u Hund* **2008**; 1: 22-22.
- Evdokimova VN, Liu Y, Potter DM, Butterfield LH. AFP-specific CD4+ helper T-cell responses in healthy donors and HCC patients. *J Immunother (1997)* **2007**; 30: 425-437.
- Falke D. Adeno-Viren. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 4. Auflage. Berlin: Springer **2001**, 625-628.
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **1996**; 7: 215-222.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **2004**; 127(5 Suppl 1): 35-50.
- Ganji P, Nadji M, Albores-Saavedra J, Morales AR. Histologic markers in primary and metastatic tumors of the liver. *Cancer* **1988**; 62: 1994-1998.

- Geissler M, Mohr L, Weth R, Köhler G, Grimm CF, Krohne TU, von Weizsäcker F, Blum HE. Immunotherapy directed against alpha-fetoprotein results in autoimmune liver disease during liver regeneration in mice. *Gastroenterol* **2001**; 121: 931-939.
- Gibbs PE, Zielinski R, Boyd C, Dugaiczuk A. Structure, polymorphism, and novel repeated DNA elements revealed by a complete sequence of the human alpha-fetoprotein gene. *Biochemistry* **1987**; 26: 1332-1343
- Gillespie PG, Hudspeth AJ. Chemiluminescence detection of proteins from single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88: 2563-2567
- Gong J, Chen L, Chen D, Kashiwaba M, Manome Y, Tanaka T, Kufe D. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther* **1997**; 4: 1023-1028.
- González-Carmona MA, Märten A, Hoffmann P, Schneider C, Sievers E, Schmidt-Wolf IG, Sauerbruch T, Caselmann WH. Patient-derived dendritic cells transduced with an  $\alpha$ -fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells. *Liver Int* **2006**; 26: 369-379.
- Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ (Hrsg.). *Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols*. Totowa, NJ, USA: Humana Press, **1991**: 109-128
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci* **1990**; 87: 4645-46459.
- Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* **2000**; 119: 1104-1112.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **1983**; 166: 557-580.
- Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* **2002 a**; 9: 346-355.
- Hanke P, Rabe C, Serwe M, Bohm S, Pagenstecher C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Cirrhotic patients with or without hepatocellular carcinoma harbour AFP-specific T-

- lymphocytes that can be activated in vitro by human alpha-fetoprotein. *Scand J Gastroenterol* **2002**; 37: 949-955.
- Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jessee J, Felgner PL. Transfection with lipofectamine. *Focus* **1993**; 15: 73-79.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generation recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 2509-2514
- Henry SH, Bosch FX, Bowers JC. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. *Adv Exp Med Biol* **2002**; 504: 229-233.
- Hirschowitz EA, Weaver JD, Hidalgo GE, Doherty DE. Murine dendritic cells infected with adenovirus vectors show signs of activation. *Gene Ther* **2000**; 7: 1112-1120.
- Horwitz AS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Hrsg). *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**: 2301-2326.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **1992**; 176: 1693-1702.
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* **1994**; 180: 1849-1860.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**; 85: 9436-9440.
- Iwashita Y, Tahara K, Goto S, Sasaki A, Kai S, Seike M, Chen CL, Kawano K, Kitano S. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* **2003**; 52: 155-161
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchi M. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5<sup>th</sup> edition. New York, NY, USA: Garland Publishing, **2001**.
- Jepsen P, Vilstrup H, Tarone RE, Friis S, Sørensen HT. Incidence rates of hepatocellular carcinoma in the U.S. and Denmark: recent trends. *Int J Cancer* **2007**; 121: 1624-1626.
- Jüngst C, Cheng B, Gehrke R, Schmitz V, Nischalke HD, Ramakers J, Schramel P, Schirmacher P, Sauerbruch T, Caselmann WH. Oxidative damage is increased in

- human liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2004**, 39: 1663-1672
- Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* **2000**; 15: 431-436.
- Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, Kirkwood JM, Lotze MT, Herberman RB. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* **2005**; 5: 1303-1315.
- Kawata A, Une Y, Hosokawa M, Wakizaka Y, Namieno T, Uchino J, Kobayashi H. Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killer cells versus adriamycin alone. *Am J Clin Oncol* **1995**; 18: 257-262
- Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* **2002**; 181-182: 35-38.
- Kioussis D, Eiferman F, van de Rijn P, Gorin MB, Ingram RS, Tilghman SM. The evolution of alpha-fetoprotein and albumin. II. The structures of the alpha-fetoprotein and albumin genes in the mouse. *J Biol Chem* **1981**; 256:1960-1967.
- Knolle PA, Limmer A. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* **2003**; 133: 501-506.
- Kojiro M, Kawano Y, Isomura T, Nakashima T. Distribution of albumin- and/or alpha-fetoprotein-positive cells in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* **1981**; 44: 221-226.
- Korst RJ, Mahtabifard A, Yamada R, Crystal RG. Effect of adenovirus gene transfer vectors on the immunologic functions of mouse dendritic cells. *Mol Ther* **2002**; 5: 307-315.
- Kuang M, Peng BG, Lu MD, Liang LJ, Huang JF, He Q, Hua YP, Totsuka S, Liu SQ, Leong KW, Ohno T. Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **2004**; 10: 1574-1579.
- Kyshe-Andersen J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **1984**; 10: 203-209.
- Laan-Pütsep K, Wigzell H, Cotran P, Gidlund M. Human  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) causes a selective down regulation of monocyte MHC class II molecules without altering other induced or noninduced monocyte markers or functions in monocytoïd cell lines. *Cell Immunol* **1991**; 133: 506-518

- Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* **1999**; 162: 168-175.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227: 680-685.
- Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC 3rd. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* **1998**; 160: 3861-3868.
- Law SW, Dugaiczky A. Homology between the primary structure of alpha-fetoprotein, deduced from a complete cDNA sequence, and serum albumin. *Nature* **1981**; 291: 201-205
- Lee CS. Lymphocytes and their subsets in the peripheral blood of hepatocellular carcinoma patients. *J Formos Med Assoc* **1991**; 90: 626-630.
- Lee WC, Wang HC, Jeng LB, Chiang YJ, Lia CR, Huang PF, Chen MF, Qian S, Lu L. Effective treatment of small murine hepatocellular carcinoma by dendritic cells. *Hepatology* **2001**; 34: 896-905.
- Lee WC, Wang HC, Hung CF, Huang PF, Lia CR, Chen MF. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother (1997)* **2005**; 28: 496-504.
- Lester EP, Miller JB, Baron JM, Yachnin S. Inhibition of human lymphocyte transformation by human alpha-fetoprotein (HAFP): studies on the mode of HAFP action and the role of HAFP polymorphism. *Immunology* **1978**; 34: 189-198.
- Lester EP, Miller JB, Yachnin S. Human alpha-fetoprotein: immunosuppressive activity and microheterogeneity. *Immunol Commun* **1978**; 7: 137-161
- Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* **2006**; 25: 3834-3847.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* **1976**; 17: 62-70.
- Lin TJ, Liao LY, Lin CL, Shih LS, Chang TA, Tu HY, Chen RC, Wang CS. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case report and literature review. *Hepatogastroenterology* **2004**; 51: 579-582.
- Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: Immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* **2002**; 82: 97-130.

- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **2008**; 359: 378-390.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **2003**; 362: 1907-1917
- Lotz JP, Grange JD, Hannoun L, Boudghene F, Amiot X, Lamarque D, Andre T, Estes A, Bellaiche A, Bouleuc C. Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with a combination of human recombinant alpha-2b interferon and doxorubicin: results of a pilot study. *Eur J Cancer* **1994**; 30A: 1319-1325.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **1951**; 193: 265- 275.
- Lu CY, Changelian PS, Unanue ER. Alpha-fetoprotein inhibits macrophage expression of Ia antigens. *J Immunol* **1984**; 132: 1722-1727.
- Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* **1995**; 60: 1539-1545.
- Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* **2007**; 13: 74-81.
- Lygidakis NJ, Kosmidis P, Ziras N, Parissis J, Kyparidou E. Combined transarterial targeting locoregional immunotherapy-chemotherapy for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a new alternative for an old problem. *J Interferon Cytokine Res* **1995**; 15: 467-472
- Ma CK, Zarbo RJ, Frierson HF Jr, Lee MW. Comparative immunohistochemical study of primary and metastatic carcinomas of the liver. *Am J Clin Pathol* **1993**; 99: 551-557.
- Mahadevan M, Liu Y, You, C, Luo R, You H, Mehta JL, Hermonat PL. Generation of robust cytotoxic T-Lymphocytes against postate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus. *Cancer Immunol Immunother* **2007**; 56: 1615-1624.
- Mandelli C, Fraquelli M, Fargion S. Comparable Frequency of hepatocellular carcinoma in in cirrhosis of different aetiology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1994**; 6: 1129-1134
- Mazzolini G, Alfaro C, Sangro B, Feijó E, Ruiz J, Benito A, Tirapu I, Arina A, Sola J, Herraiz M, Lucena F, Olagüe C, Subtil J, Quiroga J, Herrero I, Sádaba B, Bendandi M, Qian C, Prieto J, Melero I. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to

- secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* **2005**; 23: 999-1010.
- Melero I, Duarte M, Ruiz J, Sangro B, Galofré J, Mazzolini G, Bustos M, Qian C, Prieto J. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther* **1999**; 6: 1779-1784.
- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* **1990**; 171: 1753-1771.
- Miller G, Lahrs S, Shah AB, DeMatteo RP. Optimization of dendritic cell maturation and gene transfer by recombinant adenovirus. *Cancer Immunol Immunother* **2003**; 52: 347-358.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tsuji H, Yamashita T, Kaneko S. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **2006**; 118: 1194-1204.
- Murgita RA, Andersson LC, Sherman MS, Bennich H, Wigzell H. Effects of human alpha-fetoprotein on human B and T lymphocyte proliferation in vitro. *Clin Exp Immunol* **1978**; 33: 347-356.
- Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin Exp Immunol* **2007**; 147: 296-305.
- Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, Ogawa H, Yamamoto S, Tani K, Sone S. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* **2001**; 253: 113-124
- Niwa Y, Matsumura M, Shiratori Y, Imamura M, Kato N, Shiina S, Okudaira T, Ikeda Y, Inoue T, Omata M. Quantitation of alpha-fetoprotein and albumin messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **1996**; 23: 1384-1392.
- Noureddini SC, Curiel DT. Genetic targeting strategies for adenovirus. *Mol Pharm* **2005**; 2: 341-347.
- Ohguchi S, Nakatsukasa H, Higashi T, Ashida K, Nouse K, Ishizaki M, Hino N, Kobayashi Y, Uematsu S, Tsuji T. Expression of alpha-fetoprotein and albumin genes in human

- hepatocellular carcinomas: limitations in the application of the genes for targeting human hepatocellular carcinoma in gene therapy. *Hepatology* **1998**; 27: 599-607.
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* **1985**; 56: 918-928.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **2005**; 55: 74-108.
- Peng BG, Liang LJ, He Q, Kuang M, Lia JM, Lu MD, Huang JF. Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 700-704.
- Peng SY, Lai PL, Chu JS, Lee PH, Tsung PT, Chen DS, Hsu HC. Expression and hypomethylation of alpha-fetoprotein gene in unicentric and multicentric human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **1993**; 17: 35-41.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **1992**; 111: 229-233.
- Primack A, Vogel CL, Kyalwazi SK, Ziegler JL, Simon R, Anthony PP. A staging system for hepatocellular carcinoma: prognostic factors in Ugandan patients. *Cancer* **1975**; 5: 1357-1364.
- Regimbeau JM, Colombat M, Mognol P, Durand F, Abdalla E, Degott C, Degos F, Farges O, Belghiti J. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* **2004**; 10(2 Suppl 1): 69-73.
- Rabe C, Lenz M, Schmitz V, Pilz T, Fimmers R, Sauerbruch T, Caselmann WH. An independent evaluation of modern prognostic scores in a central European cohort of 120 patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2003**, 15: 1305-1315.
- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **2001**; 7: 208-215.
- Reiner LR. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell* **2007**; 129: 33-36.
- Reinisch W, Holub M, Katz A, Herneth A, Lichtenberger C, Schoniger-Hekele M, Waldhoer T, Oberhuber G, Ferenci P, Gangl A, Mueller C. Prospective pilot study of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *J Immunother (1997)* **2002**; 25: 489-499

- Ribas A. Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Curr Gene Ther* **2005**; 5: 619-628.
- Ritter M, Ali MY, Grimm CF, Weth R, Mohr L, Bocher WO, Endrulat K, Wedemeyer H, Blum HE, Geissler M. Immunoregulation of dendritic and T cells by alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **2004**; 41: 999-1007.
- Roth MJ, Tanese N, Goff SP. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1985**; 260: 9326-9335.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Hrsg). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, USA: Humana Press, **2000**: 365-386
- Ruoslahti E, Seppälä M. Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv Cancer Res* **1979**; 29: 275-346.
- Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **2006**; 108: 1435-1440.
- Saibara T, Maeda T, Miyazaki M, Onishi S, Yamamoto Y. Depressed immune function in patients with cirrhosis before emergence of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **1993**; 18: 315-319.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Exp Med* **1994**; 179: 1109-1118.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, **1989**.
- Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olagüe C, Sola J, Sádaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* **2004**; 22: 1389-1397.
- Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* **2007**; 56(3):183-191.
- Schmidt EV, Christoph G, Zeller R, Leder P. The cytomegalovirus enhancer: A pan-active control element in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **1990**; 10: 4406-4411.
- Schmidt T, Ziske C, Märten A, Endres S, Tiemann K, Schmitz V, Gorschlüter M, Schneider C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Intratumoral Immunization with Tumor RNA-

- Pulsed Dendritic Cells Confers Antitumor Immunity in a C57BL/6 Pancreatic Murine Tumor Model. *Cancer Res* **2003**; 63: 8962–8967.
- Schumacher L, Ribas A, Dissette VB, McBride WH, Mukherji B, Economou JS, Butterfield LH. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances antigen-specific t-cell responses. *J Immunother* **2004**; 27: 191-200.
- Schurr R, Stölzel U, Schuppan D, Schwertner C, Steinberg J, Scherübl H. Zunahme des hepatozellulären und des intrahepatischen cholangiozellulären Karzinoms im Nordosten Deutschlands. *Dtsch med Wochenschr* **2006**; 131: 1649-1655.
- Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, 4<sup>th</sup> Edition. New York, USA: Wiley & Sons, **2003**.
- Shen FW; Chorney MJ; Boyse EA. Further polymorphism of the Tla locus defined by monoclonal TL antibodies. *Immunogenetics* **1982**; 15: 573-578.
- Shenk TE. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Hrsg). *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**: 2265-2300.
- Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* **2005**; 92: 607-612.
- Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **2004**; 10: 1146-1151.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **1962**; 59: 223-239.
- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M, et al.. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. *Hepatology* **1995**; 22(4 Pt 1): 1027-1033.
- Shouval D. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Tabor E (Hrsg). *Liver cancer*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone, **1997**: 471-480.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **1973**; 137: 1142-1162.
- Stoelben E, Koch M, Hanke S, Lossnitzer A, Gaertner HJ, Schentke KU, Bunk A, Saeger HD. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma confirmed by surgical specimen:

- report of two cases and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* **1998**; 383: 447-452.
- Stuart K, Tessitore J, Huberman M. 5-Fluorouracil and alpha-interferon in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol* **1996**; 19: 136-139
- Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, Wu MH, Chen CJ. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol* **2003**; 157: 674-682.
- Suzuki Y, Zeng CQ, Alpert E. Isolation and partial characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *J Clin Invest* **1992**; 90: 1530-1536.
- Takayama T, Makuuchi M, Sekine T, Terui S, Shiraiwa H, Kosuge T, Yamazaki S, Hasegawa H, Suzuki K, Yamagata M, et al. Distribution and therapeutic effect of intraarterially transferred tumor-infiltrating lymphocytes in hepatic malignancies. A preliminary report. *Cancer* **1991**; 68: 2391-2396.
- Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y; Liver Cancer Study Group of Japan. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* **2006**; 131: 461-469.
- Thomas MB, Abbruzzese JL. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **2005**; 23: 8093-8108.
- Thung SN, Gerber MA. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Tabor E (Hrsg). *Liver cancer*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone, **1997**: 155-163.
- Tokunaga K, Taniguchi H, Yoda K, Shimizu M, Sakiyama S. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal  $\beta$ -actin mRNA. *Nucleic Acids Res* **1986**; 14: 2829.
- Torres JM, Esteban C, Aguilar J, Mishal Z, Uriel J. Quantification of alpha-fetoprotein and transferrin endocytosis by lymphoid cells using flow cytometry. *J Immunol Methods* **1990**; 134: 163-170.
- Trojan J, Hammerstingl R, Strey CW, Vogl TJ, Bechstein W-O, Zeuzem S. Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Dtsch Arztebl* **2007**; 104: A 3326-3333.
- Um SH, Mulhall C, Alisa A, Ives AR, Karani J, Williams R, Bertolotti A, Behboudi S. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *J Immunol* **2004**; 173: 1772-1778.

- Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **1999**; 59: 3064-3067.
- Wang B, He J, Liu C, Chang, LJ. An effective cancer vaccine modality: lentiviral modification of dendritic cells expressing multiple cancer-specific antigens. *Vaccine*. **2006**; 24: 3477-3489.
- Wang Y, Chen H, Wu M, Bao J, Cong W, Wang H. Postoperative immunotherapy for patients with hepatocarcinoma using tumor-infiltrating lymphocytes. *Chin Med J (Engl)* **1997**; 110: 114-117.
- WHO. World Health Report. Geneva: WHO, **2003**
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **1969**; 244: 4406-4412
- Wells JW, Darling D, Farzaneh F, Galea-Lauri J. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scand J Immunol* **2005**; 61: 251-259.
- Wogan GN. Aflatoxin exposure as a risk factor in the etiology of hepatocellular carcinoma. In: Okuda K, Tabor E (Hrsg). *Liver cancer*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone, **1997**: 51-58
- Yap SF, Peh SC. Alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: a serological and histochemical study in Malaysian patients. *Malays J Pathol* **1991**; 13: 115-118.
- Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* **2004**; 10: 1849-1853.
- Zhao L, Mou DC, Leng XS, Peng JR, Wang WX, Huang L, Li S, Zhu JY. Expression of cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **2004**; 10: 2034-2038

## **10. Danksagungen**

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang H. Caselmann aussprechen.

Ich danke dem gesamten Team des Labors 61 für Hilfe, Anleitung und Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Maria-Angeles González-Carmona, meiner Betreuerin. Ferner möchte ich ausdrücklich Dr. Esther Raskopf, Dr. Per Hofmann, Dr. Anni Musch und Annabelle Vogt für Ihre Hilfe danken.

Desweiteren danke ich Dr. Marie von Lilienfeld-Toal für die Einarbeitung in die Flow-Zytometrie.