

Modifikation des Tropismus onkolytischer Adenoviren  
mittels bispezifischer Adapterproteine für die Therapie  
Polysialinsäure-exprimierender Tumoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Univ. Arnold Kloos  
geboren am 25.09.1978 in Hermannstadt

2012

Tag der Promotion: 18.12.2012

Vorsitzender: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Referenten: Prof. Dr. Stefan Kubicka  
Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn  
PD Dr. Florian Kühnel

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
2.1 Adenoviren .....	3
2.2 Adenoviren als gentherapeutische Vektoren.....	5
2.3 Onkolytische Adenoviren .....	7
2.4 Transduktionelles Retargeting adenoviraler Vektoren.....	8
2.5 Epidemiologie und Pathologie von Tumorerkrankungen der Lunge .....	11
2.6 Polysialinsäure als molekulares Angriffsziel in der Tumorthherapie.....	13
2.7 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Generierung des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 Expression des rekombinanten Konstrukts CARsc-pSia .....	18
3.1.2 Charakterisierung des bispezifischen Adapters CARsc-pSia.....	19
<b>3.2 Generierung des trimerisierungsfähigen, bispezifischen Adapters CARsc-pSia....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Charakterisierung trimerisierungsfähiger Adapterproteine.....	24
3.2.2 Effektivitätsvergleich monomerer und trimerisierter Adapterproteine.....	26
<b>3.3 Spezifisches Retargeting solider Tumore <i>in vivo</i></b> .....	<b>27</b>
3.3.1 Untersuchungen zum Retargeting in xenogenen Tumoren des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms und Rhabdomyosarkoms .....	27
<b>3.4 Beeinflussung des natürlichen adenoviralen Tropismus durch das Adapterprotein CARsc-pSia.....</b>	<b>32</b>
3.4.1 Inhibition der rezeptorabhängigen Infektion durch CARsc-pSia.....	32
3.4.2 Hepatisches Detargeting <i>in vivo</i> .....	34
3.4.3 Untersuchungen zur Lebertoxizität .....	36
<b>3.5 Untersuchungen zum spezifischen Retargeting im syngenem Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC).....</b>	<b>38</b>
3.5.1 Charakterisierung und Modifikation der Zelllinie CMT64.....	38
3.5.2 Spezifisches Retargeting onkolytischer Adenoviren zu Lungenkolonien im Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms .....	40
3.5.3 Untersuchungen zur Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immunkompetenten Mäusen .....	46

3.5.4 Untersuchungen zur Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immundefizienten Mäusen .....	51
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>56</b>
4.1 Charakterisierung des bispezifischen Adapters CARsc-pSia.....	57
4.2 Beeinflussung des natürlichen adenoviralen Tropismus durch das Adapterprotein CARsc-pSia.....	62
4.3 Charakterisierung des spezifischen Retargetings zu PolySia-exprimierenden Tumoren .....	65
4.4 Ausblick .....	71
<b>5 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1 Material.....</b>	<b>72</b>
5.1.1 Eukaryotische Zelllinien .....	72
5.1.2 Bakterienstämme .....	73
5.1.3 Mausstämme .....	73
5.1.4 Plasmide .....	73
5.1.5 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide .....	75
5.1.6 Rekombinante Adenoviren.....	78
5.1.7 Oligonukleotide.....	78
5.1.8 Rekombinante Proteine .....	80
5.1.9 Antikörper .....	81
5.1.10 Enzyme.....	81
5.1.11 Molekulargewichtsstandards.....	81
5.1.12 Chemikalien .....	82
5.1.13 Kits .....	83
5.1.14 Geräte und sonstige Materialien.....	84
5.1.15 Nährmedien und Pufferlösungen.....	85
<b>5.2 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>87</b>
5.2.1 Zellkultur.....	87
5.2.2 Einfrieren von Zellen .....	87
5.2.3 Auftauen von Zellen.....	87
5.2.4 Zellkultur primärer Zellen.....	87
5.2.5 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) .....	88
5.2.6 Transiente Transfektion mit Lipofectamine <sup>TM</sup> .....	88
<b>5.3 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>88</b>
5.3.1 Präparation von Proteinextrakten aus Gewebe.....	88
5.3.2 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkultur.....	89
5.3.3 Luciferaseassay .....	89
5.3.4 $\beta$ -Galactosidase-Assay .....	89
5.3.5 Cytochemischer Nachweis von $\beta$ -Galactosidase (X- Gal staining).....	90
5.3.6 Proteinassay nach Bradford.....	90
5.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	90
5.3.8 Western Blot.....	91
5.3.9 Coomassie Brilliant Blue Färbung .....	91

5.3.10	Aufreinigung rekombinanter Adapterproteine .....	91
5.3.11	Enzymatischer Transaminasen Assay .....	92
5.3.12	Histologie .....	92
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>92</b>
5.4.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	92
5.4.2	Transformation elektrokompeter Bakterien .....	93
5.4.3	Vermehrung transformierter Bakterien .....	93
5.4.4	Analytische Plasmidpräparation (Mini-Präp).....	93
5.4.5	Präparative Plasmidpräparation (Midi-/Maxi-Präp) .....	93
5.4.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	94
5.4.7	Agarose Gelelektrophorese .....	94
5.4.8	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Aufreinigung .....	94
5.4.9	Aufreinigung geringer DNA-Mengen.....	94
5.4.10	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	95
5.4.11	Rekombinante DNA Techniken .....	95
<b>5.5</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>97</b>
5.5.1	ELISpot Assay .....	97
5.5.2	FACS Analyse.....	98
5.5.3	Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorantigen.....	98
<b>5.6</b>	<b>Virale Arbeitstechniken .....</b>	<b>98</b>
5.6.1	Retrovirale Transduktion von Zellen .....	98
5.6.2	Präparation adenoviraler DNA.....	99
5.6.3	Präparation adenoviraler Plasmide und infektiöser Viren.....	99
5.6.4	Vermehrung und Präparation von Adenoviren .....	100
5.6.5	Bestimmung des Titers infektiöser Adenoviren.....	100
<b>5.7</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>101</b>
5.7.1	Tumoretablierung .....	101
5.7.2	Dendritische Zellvakzinierung .....	101
5.7.3	Applikation onkolytischer Adenoviren .....	102
5.7.4	<i>In vivo</i> Imaging .....	102
<b>5.8</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>114</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	114
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN .....</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION .....</b>	<b>120</b>

## 1 Zusammenfassung

Die selektive Expression von Polysialinsäure (PolySia) auf verschiedenen hochmalignen und klinisch relevanten Tumorspezies, wie z.B. dem kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*), macht diesen Tumormarker zum hervorragenden Angriffziel für zielgerichtete molekulare Therapien. Mit dem Ziel, eine effektive Tumorthherapie auf der Basis onkolytischer Adenoviren für PolySia-exprimierende Tumoren zu entwickeln, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einsatz bispezifischer Fusionsproteine untersucht, die als ‚Adapter‘ zwischen adenoviralem Capsid und PolySia fungieren und die Affinität des Adenovirus in Richtung Tumor lenken sollen (‚Retargeting‘). Für dieses Fusionsprotein (CARsc-pSia) wurde die lösliche Ektodomäne des CAR-Rezeptors mit einem PolySia-spezifischen scFv-Antikörperfragment (*single chain variable fragment*) kombiniert, die über eine Trimerisierungsdomäne verknüpft wurden. In Zellen mit definiertem PolySia-Status wurde zunächst gezeigt, dass die Komplexierung von Adenoviren mit CARsc-pSia eine PolySia-spezifische Infektion ermöglicht. Zudem erlaubte dies auch *in vitro* eine effiziente Infektion humaner, PolySia-positiver SCLC-, Neuroblastom- und Rhabdomyosarcomzelllinien. In Untersuchungen zur Maskierung des natürlichen Tropismus konnte nicht nur eine CARsc-pSia-abhängige Inhibition des CAR-vermittelten Infektionsweges *in vitro* nachgewiesen werden, sondern CARsc-pSia-komplexierten Adenoviren bewirkten eine deutliche Reduktion von viraler Leberlast und Hepatotoxizität in i.v. infizierten Mäusen. Untersuchungen in Tumormodellen der Nacktmaus zeigten eine signifikante Infektion subkutan implantierter, humaner SCLC und Rhabdomyosarkomen selbst nach intravenöser Gabe komplexierter Adenoviren. Um den Einfluss der Onkolyse-assoziierten, antitumoralen Immunantwort berücksichtigen zu können, wurde die Wirkung des PolySia-spezifischen Retargetings in einem immunkompetenten, orthotopen SCLC-Mausmodell evaluiert, dass durch i.v. Gabe von PolySia-exprimierenden CMT64-Zellen in syngen Mäusen etabliert wurde. Aufgrund der deutlich gesteigerten Infektionseffizienz von Lungentumoren durch PolySia-spezifisches Retargeting wurde nach lokaler Tumorregression auch eine signifikante Verlängerung des Überlebens erzielt. Hierbei war vermutlich die Induktion einer antitumoralen T-Zell-Immunantwort maßgeblich beteiligt, da dieser Therapieerfolg im Nacktmausmodell nicht beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen zeigen, dass das PolySia-spezifische Retargeting onkolytischer Adenoviren eine vielversprechende Option für die gezielte Therapie PolySia-positiver Tumoren darstellt.

Schlagworte: Polysialinsäure, transduktionelles Retargeting, Virotherapie

## Abstract

Polysialic acid (PolySia) represents an excellent tumor-selective target for molecular therapies since it is selectively expressed on several malignant and clinically relevant tumors including Small Cell Lung Cancer (SCLC).

The aim of the present work was to develop an effective, oncolytic adenovirus-based tumor therapy for PolySia-expressing tumors. For this purpose, the use of bispecific fusion proteins was investigated that are able to bind both adenoviral capsids and PolySia thus redirecting adenoviral infection to PolySia expressing tumors. To generate such an adapter molecule, called CARsc-pSia, the soluble ectodomain of the coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) was fused to a PolySia-specific single chain antibody fragment (scFv) via a trimerization motif. By infection experiments in cells with defined PolySia-status using recombinant, purified adapters, a highly PolySia-specific infection of cells by adapter-coated adenoviruses could be demonstrated. Additionally, pretreatment of adenovirus allowed for efficient infection of human, PolySia-positive SCLC-, neuroblastoma-, and rhabdomyosarcoma cell lines. Investigating a possible masking of the natural tropism a CARsc-pSia-dependent inhibition of CAR-mediated adenoviral infection *in vitro* could be demonstrated. Furthermore, use of CARsc-pSia-coated adenoviruses resulted in significant reduction of viral liver load and hepatotoxicity in systemically injected mice. Investigations in nude mice models of human tumors revealed a significant infection of subcutaneously implanted SCLC and rhabdomyosarcoma, respectively, even after systemic administration. In order to examine the effect of oncolysis-associated antitumoral immune responses, PolySia-specific virus retargeting was evaluated in an immunocompetent, orthotopic SCLC model which has been established by intravenous application of PolySia expressing CMT64 cells in syngeneic mice. Increased infection efficacy in lung tumors after PolySia-specific retargeting led to local tumor regression as could be demonstrated by lung histologies. Consequently, PolySia retargeting also significantly improved survival of mice. Presumably, the induction of an antitumoral T-cell mediated immune response largely contributed to this observation, since this therapeutic success could not be confirmed in T-cell deficient nude mice models. In conclusion, these results show that PolySia-specific retargeting of oncolytic adenoviruses represents a promising strategy for targeted therapy of PolySia-positive tumors.

keywords: polysialic acid, transductional retargeting, virotherapy

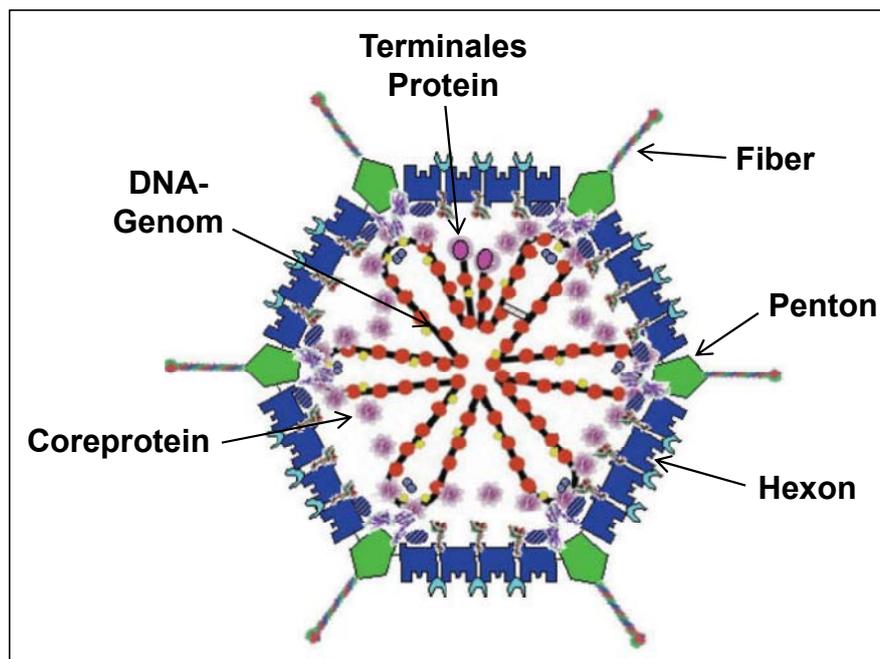
## 2 Einleitung

### 2.1 Adenoviren

Adenoviren gehören zu den am häufigsten eingesetzten viralen Vektoren in der Molekularbiologie, sowie in Gen- und Virotherapie. Adenoviren wurden erstmalig im Jahr 1953 aus Tonsillen und adenoidem Gewebe isoliert und typisiert (Rowe *et al.*, 1953), (Enders *et al.*, 1956). Humane Adenoviren der Gattung *Mastadenovirus* sind aktuell in sieben Viruspezies (HAdV-A bis HAdV-G und die Subspezies B1/B2) mit insgesamt mehr als 55 Serotypen unterteilt. Während die meisten Serotypen mit milden Infektionen der Atemwege assoziiert sind, können Adenoviren auch Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie Keratokonjunktivitis hervorrufen (de Jong, 1996), (Curtis *et al.*, 1998). In immunsupprimierten Patienten, beispielsweise nach Organtransplantation, können adenovirale Infektionen allerdings ein schwerwiegendes klinisches Problem darstellen.

Adenoviren sind unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 90 bis 110 nm. Das adenovirale Genom besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA einer Länge von 36 -38 kb. Ein Nukleoproteinkomplex aus mehreren Proteinen ist mit der DNA assoziiert und bildet das sogenannte Core. Der Corekomplex wird von einem stabilen Proteincapsid ikosaedrischer Struktur umschlossen. Die Hauptkomponenten des aus 252 Capsomeren zusammengesetzten Capsids bilden 240 Hexone, die aus trimerisierten Hexonproteinen bestehen, und 12 Pentone, die an den Eckpunkten des Ikosaeders lokalisiert sind. Interaktionen mit den Proteinen IIIa, VI, VIII und IX tragen zur Stabilisierung des Capsids bei. Die Pentonproteine sind mit Fiberproteinen assoziiert, die aus einem Schaftanteil und einer C-terminalen Knobdomäne bestehen und als homotrimere Struktur antennenähnlich von den Ikosaederecken hervorragen. Bei den meisten Adenoviruspezies erfolgt die Infektion einer Zelle in einem zweistufigen Prozess, wobei der integrinvermittelten Internalisierung des Viruspartikels die Erkennung von primären Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorgeschaltet ist. Im Falle des im Detail sehr gut bekannten Serotyps 5 wird der Infektionsprozess *in vitro* durch die Bindung der Knobdomäne des Fiberproteins an den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) eingeleitet (Bergelson *et al.*, 1997), (Roelvink *et al.*, 1998). CAR ist ein Transmembranprotein, bestehend aus zwei extrazellulären, immunglobulinähnlichen Domänen, einer transmembranen Region und einer cytoplasmatischen Domäne. An der Erkennung und Bindung der adenoviralen Partikel ist ausschließlich die extrazelluläre Domäne beteiligt, während membranständige oder intrazelluläre Bereiche des Rezeptors für diese Funktion entbehrlich zu sein scheinen (Freimuth *et al.*, 1999), (Tomko *et al.*, 2000). Für Spezies B Viren wurden dagegen CD46,

CD80/CD86, Desmoglein-2 und ein bislang noch unbekanntes Glykoprotein als primäre Rezeptoren identifiziert (Gaggar *et al.*, 2003), (Short *et al.*, 2006), (Wang *et al.*, 2011). Es konnte auch gezeigt werden, dass einige Adenoviren der Spezies D an Sialinsäuren auf der Oberfläche von Zielzellen binden (Arnberg *et al.*, 2002), (Nilsson *et al.*, 2011). Adenoviren binden über Fiberknob mit hoher Affinität an den primären Rezeptor und leiten danach ihre endozytotische Aufnahme in Zielzellen über eine schwächere Interaktion des Arginin-Glycin-Aspartat Motifs (RGD) des Pentonbaseproteins mit zellulären  $\alpha\beta 1$ -,  $\alpha\beta 3$ -,  $\alpha\beta 5$ - oder  $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen ein (Li *et al.*, 2001), (Wickham *et al.*, 1993), (Salone *et al.*, 2003).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur eines adenoviralen Partikels**

(verändert nach Russell, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. J.Gen.Virol. 2009, 90, 1-20 DOI 10.1099/vir.0.003087-0)

Obwohl die Vorgänge einer adenoviralen Infektion von Zellen *in vitro* sehr gut charakterisiert sind, sind die Mechanismen der Virusaufnahme *in vivo* erst teilweise aufgeklärt. Seit längerem ist bekannt, dass Adenoviren, die ins vaskuläre System gelangen, einen ausgeprägten Hepatotropismus aufweisen. Versuche zur Inhibition dieses adenoviralen Hepatotropismus durch Ablation der CAR- und Integrinbindefähigkeit haben gezeigt, dass *in vivo* möglicherweise CAR-unabhängige Infektionsmechanismen dominieren (Akiyama *et al.*, 2004). Im vaskulären System können Adenoviren mit verschiedenen Komponenten des Blutes wie natürlichen Antikörpern, Proteinen des Komplementsystems, Koagulationsfaktoren, Erythrozyten sowie Zellen des Immunsystems interagieren. In ersten Studien wurde von einer moderater Bindung des Komplement Bindeproteins 4 (C4BP) und des Koagulationsfaktors IX

(FIX) an Fiber berichtet (Shayakhmetov *et al.*, 2005). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Blutfaktoren VII, IX, X und Protein C mit dem adenoviralen Protein Hexon interagieren und nach Bindung an das Protein LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) die Transduktion von Hepatozyten vermitteln (Shayakhmetov *et al.*, 2005), (Waddington *et al.*, 2008). In strukturellen Analysen stellte sich FX als besonders effektiver Mediator heraus, der über eine glutamatreiche, konservierte Domäne (GLA-Domäne) eine hochaffine Bindung mit den hypervariablen Regionen 5 und 7 (HVR5, HVR7) des Hexonproteins eingeht (Kalyuzhniy *et al.*, 2008), (Alba *et al.*, 2009). Im Blut zirkulierende Serotyp 5 Adenoviren werden durch natürliche IgM Antikörper und Komponenten des Komplementsystems opsoniert und können anschließend über Bindung an den humanen Komplement Rezeptor 1 (hCR1) und CAR an Erythrozyten haften (Carlisle *et al.*, 2009). Ein Großteil systemischer Adenoviren wird im Lebergewebe durch dort sesshafte Makrophagen, sogenannten Kupffer-Zellen, aufgenommen und degradiert (Tao *et al.*, 2001), (Lieber *et al.*, 1997), (Manickan *et al.*, 2006). Als Mechanismus zur Aufnahme der Viren wurden unter anderem Interaktionen der Partikel mit dem Komplement-Rezeptor 3 (CR3) und die Bindung an Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche der Kupffer-Zellen identifiziert (Xu *et al.*, 2008), (Khare *et al.*, 2012), (Haisma *et al.*, 2009). Weiterhin können zirkulierende Adenoviren eine Bindung mit Thrombozyten eingehen, die dann zu einer P-Selektin- und von-Willebrand-Faktor-abhängigen Komplexierung mit Leukozyten führt. Solche Komplexe werden anschließend durch Komponenten des Retikuloendothelialen Systems degradiert (Othman *et al.*, 2007). Diese vielfältigen Interaktionen zwischen Blutfaktoren, Vektoren und Leberzellen tragen nicht nur zu einer adenoviralen Leberschädigung sowie einer potenten inflammatorischen Immunantwort bei, sie begrenzen auch die Effektivität adenoviraler Vektoren in der Gentherapie und stellen eine wichtige Hürde für die systemische Applikation therapeutischer Adenoviren in der klinischen Anwendung dar.

## 2.2 Adenoviren als gentherapeutische Vektoren

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, die aufgrund ihrer natürlichen Beschaffenheit als DNA-Transfersysteme zu Zielzellen sehr gut geeignet sind. Diese Eigenschaft macht sie zu einem attraktiven Werkzeug in gentherapeutischen und onkolytischen Ansätzen, wo sie als Vehikel zum Gentransfer zum Einsatz kommen. Virale Vektoren auf Basis humaner Adenoviren werden bereits in präklinischen und klinischen Studien zu gen- und tumortherapeutischen Zwecken verwendet. Dabei kommen häufig Vektoren zum Einsatz, die

sich vom Adenovirus des Subtyps 5 (Ad5) ableiten, da sie im Vergleich zu anderen Viren erhebliche Vorteile aufweisen. Die Biologie der Adenoviren ist relativ gut verstanden und die Präparation und Konservierung hoher Virustiter der relativ gering pathogenen Ad5-Partikel ist technisch leicht möglich (Graham and Prevec, 1995). Verglichen mit RNA-Viren gewährleistet das adenovirale Genom eine hohe genetische Stabilität und erlaubt die Insertion großer Fragmente heterologer DNA. Weiterhin kann durch adenovirale Vektoren eine hohe Transduktionsrate in einem breiten Spektrum sich teilender und ruhender Zellen erreicht werden. Im Gegensatz zu Retroviren integriert adenoviral eingeschleuste DNA nicht ins Genom der Zielzellen, was das Risiko einer Insertionsmutagenese minimiert, jedoch nur eine transiente Expression der eingeschleusten, heterologen Gene erlaubt. Das gentherapeutische Potential von Adenoviren konnte im Mausmodell durch Messung supraphysiologischer Mengen des Transgens  $\alpha$ 1-Antitrypsin nach intravenöser Injektion eines Ad5 Vektors gezeigt werden. (Morrall *et al.*, 1998). Ein erheblicher Nachteil adenoviraler Vektoren ist die Induktion einer starken humoralen und zellulären Immunantwort nach systemischer Applikation (Yang *et al.*, 1994), (Santra *et al.*, 2005). Die hohe Immunogenität der Vektoren sowie eine bereits existierende Immunität gegen das Virus erschweren eine wiederholte Anwendung und reduzieren die Effektivität solcher gentherapeutischer Ansätze. Die auftretende Vektorimmunität verhinderte die klinisch effiziente Anwendung eines adenoviralen Vektors, der erstmalig zur Gentherapie der humanen zystischen Fibrose im Lungenepithel eingesetzt wurde (Zabner *et al.*, 1993). In anfänglichen gentherapeutischen Strategien wurden nicht-replikationsfähige Vektoren der ersten Generation eingesetzt, die durch Deletionen in der E1- und E3-Region des adenoviralen Genoms Insertionen transgener DNA von bis zu 8 Kb zulassen. Mit Vektoren der zweiten Generation, die neben den Deletionen in Region E1 und E1/E3 auch genetische Modifikationen in den Bereichen E2 oder E4 besitzen, konnte eine verlängerte Transgenexpression mit reduzierter Immunantwort erreicht werden (Engelhardt *et al.*, 1994), (Armentano *et al.*, 1997), (Armentano *et al.*, 1999), (Gao *et al.*, 1996). Drittgenerationsvektoren bzw. helferabhängige Vektoren (*helper-dependent*, HD) besitzen als virale Restsequenzen lediglich die ITRs (*inverted terminal repeats*) und das Verpackungssignal ( $\psi$ ). Adenovirale HD-Vektoren können bis zu 36 kb fremder DNA aufnehmen und zeichnen sich durch eine lange Transgenexpression sowie eine geringe Toxizität und Immunogenität aus (Kochanek *et al.*, 1996), (Fisher *et al.*, 1996), (Schiedner *et al.*, 1998).

Erste Strategien in der Tumorgentherapie beinhalteten den Transfer von sogenannten „Suizidgenen“, die nach ihrer Expression nichttoxische Substanzen (*prodrugs*) in zelltoxische

Derivate umwandeln und auf diese Weise den Zelltod initiieren. Ein zusätzlicher Effekt ergibt sich hierbei durch die Verteilung der aktivierten, cytotoxischen Substanz auf nicht transduzierte Nachbarzellen (Bystander-Effekt), was auch zur Abtötung von Zielzellen führt, die ursprünglich nicht transduziert wurden. Zu den Suizidgenen zählt die Herpes Simplex Thymidinkinase (HSVtk), die das Substrat Ganciclovir durch Phosphorylierung in ein toxisches Nukleosidanalogen umwandelt und den Zelltod durch Inhibition der DNA-Synthese einleitet. Ein weiteres Suizidgen kodiert für die Cytosin-Deaminase aus *Escherichia coli*, die 5-Fluorocytosin zum Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) umsetzt. Diese Therapieansätze zeigten zwar antitumorale Wirkung, die Effektivität war jedoch aufgrund der unzureichenden Transduktionsrate des Tumorgewebes nicht ausreichend (Moolten *et al.*, 1990).

### 2.3 Onkolytische Adenoviren

Die Generierung replikationsfähiger, onkolytischer Adenoviren eröffnete neue Perspektiven für die Therapie solider Tumoren. Erste selektiv replizierende Vektoren basieren auf der genetischen Deletion von viralen Genbereichen, die für die Vermehrung von Adenoviren in normalen Zellen essentiell sind. Dadurch wird die virale Replikation von tumorspezifischen Funktionen abhängig, die den Verlust dieser viralen Proteine kompensieren können. Produkte der adenoviralen Gene E1B und E1A sind in der Lage, durch Bindung und Inhibition zellulärer Tumorsuppressoren wie p53 und Rb1 Apoptosekontrolle und Zellzyklusarrest zu überwinden. Die Deletion des E1B-55K-Gens führte zur Entwicklung von ONYX-015, dessen Replikation aufgrund der ausbleibenden Inaktivierung von p53 in normalen Zellen gehemmt wird (Bischoff *et al.*, 1996). Die beabsichtigte Selektivität des Vektors ONYX-015 für Tumorzellen, die einen Funktionsverlust von p53 aufweisen, ist allerdings umstritten (Rothmann *et al.*, 1998). Onyx-015 gilt aber als erstes tumor-selektiv replizierendes Adenovirus, das in etlichen klinischen Studien untersucht wurde. In diesen erwies sich Onyx-015 als sicher, wurde gut toleriert und erzielte zumindest in Kombination mit Chemotherapie auch tumortherapeutische Wirkung (Aghi and Martuza, 2005).

Durch Deletion der E1A-Region, deren Produkt mit dem Zellzyklus regulierenden Protein Rb1 interagiert, wurde ein weiteres onkolytisches Adenovirus entwickelt, dessen Replikation auf Tumorzellen mit einem defekten Rb-Signalweg beschränkt ist (Heise *et al.*, 2000). Eine weitere, gängige Methode zur Generierung tumorselektiver, onkolytischer Vektoren ist der Ersatz viraler Promotoren, die die Expression replikationsessentieller Gene (wie z.B. E1A)

kontrollieren durch heterologe Promotoren, die selektiv in Tumorzellen aktiviert sind. Diese Modifikationen des viralen Tropismus sind klassische Beispiele für das sogenannte transkriptionelle Targeting von Viren. Im Bereich des transkriptionellen Targetings werden unter anderem Promotoren von bekannten Tumormarkern eingesetzt. Es wurden Vektoren unter der Kontrolle von Promotoren für das Karzinoembryogene Antigen (CEA) oder das Prostata-spezifische Antigen (PSA) zur Therapie des Kolorektalen Karzinoms bzw. des Prostatakarzinoms entwickelt (Li *et al.*, 2003), (Rodriguez *et al.*, 1997). Besondere Attraktivität für die klinische Anwendung haben Promotoren die gewebsübergreifend in einem möglichst breiten Spektrum von Krebsarten aktiv sind, wie beispielsweise die Promotoren für die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), Survivin oder Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Wirth *et al.*, 2003), (Zhang *et al.*, 2009), (Davydova *et al.*, 2004), (Nettelbeck *et al.*, 2003). Eine Herausforderung in der Tumorthherapie mit onkolytischen Adenoviren stellt allerdings nach wie vor eine ausreichende Transduktion des Tumorgewebes nach systemischer Applikation dar, wobei das gesunde Gewebe möglichst wenig belastet werden soll.

## **2.4 Transduktionelles Retargeting adenoviraler Vektoren**

Methoden, die eine effektive Maskierung des natürlichen Tropismus und die gleichzeitige selektive Transduktion spezifischer Zell- und Gewebstypen gewährleisten, sind für den klinischen Erfolg adenoviraler Gen- und Tumortherapiestrategien von maßgeblicher Bedeutung. Insbesondere Anwendungen onkolytischer Adenoviren für die Therapie metastasierter Neoplasien erfordern eine intravenöse Applikation und somit eine möglichst gezielte Infektion der Tumorzellen. Die Modifikation des Tropismus von therapeutischen Viren durch Methoden des transduktionellen Retargetings könnte zur Optimierung tumorspezifischer, onkolytischer Therapien entscheidend beitragen. Um die unerwünschten Wechselwirkungen mit Blutkomponenten des Wirtes zu umgehen und die häufig schwache Expression von CAR auf therapeutisch relevantem Zielgewebe zu kompensieren, wurden verschiedene Methoden des CAR-unabhängigen Tropismus entwickelt, die sich auf transiente oder stabile Modifikationen der adenoviralen Capsidkomponenten beziehen (transduktionelles Retargeting). Möglichkeiten hierfür sind durch die genetische Inkorporation von Liganden, das Einbringen von Strukturkomponenten alternativer Serotypen oder Spezies, der chemischen Modifikation des Capsids und der Komplexierung mit molekularen Adapterproteinen gegeben.

Bei der genetischen Integration heterologer Peptidliganden in virale Capsidproteine muss beachtet werden, dass die Struktur des Capsidproteins nicht destabilisiert und der Ligand auf der Oberfläche des Capsids präsentiert wird, sodass nur wenige Positionen für eine solche Modifikation in Frage kommen. In oberflächenexponierten Bereichen der Fiberknob-Domäne (C-Terminus, HI loop) konnten Polylysinpeptide (K7) oder RGD-Sequenzen inkorporiert werden, um eine CAR-unabhängige Infektion über HSPGs bzw. Integrine zu ermöglichen (Wickham *et al.*, 1996), (Bouri *et al.*, 1999), (Krasnykh *et al.*, 1998), (Wu *et al.*, 2002), (Belousova *et al.*, 2002). Insertionen heterologer Peptide in andere Capsidkomponenten wie Penton, Hexon oder Protein IX erweiterten den Tropismus adenoviraler Vektoren (Wickham *et al.*, 1995), (Wickham *et al.*, 1997), (Wu *et al.*, 2005), (Dmitriev *et al.*, 2002). Der Austausch der Knobdomäne oder des ganzen Fiberproteins stellt eine vielversprechende Option für umfassende Veränderungen des Vektortropismus dar. Für eine stabile Zusammensetzung und effektive Propagation der Viren ist allerdings die komplexe Struktur der Fiber bzw. der Fiberproteinuntereinheiten von zentraler Bedeutung. Es ist allerdings gezeigt worden, dass Teile der Fiber durch heterologe Trimerisierungsdomänen, abgeleitet vom Glykoprotein des Moloney murinen Leukämievirus (Mo-MuLV), dem Rheovirus  $\sigma 1$  Protein, dem Fibrinprotein des Bakteriophagen T4 oder einem Peptid des humanen Lungensurfactant Proteins D (NRP) ersetzt werden können (van Beusechem *et al.*, 2000), (Schagen *et al.*, 2006), (Krasnykh *et al.*, 2001), (Magnusson *et al.*, 2001). In unterschiedlichen Retargetingstrategien werden diese Strukturmodule als Ausgangsgerüst für die Fusion mit Peptidliganden, aber auch größerer Moleküle wie die Immunglobulin-bindende Z-Domäne des *Staphylococcus aureus* Protein A und der humane CD40 Ligand, genutzt (Belousova *et al.*, 2008), (Volpers *et al.*, 2003), (Korokhov *et al.*, 2003), (Henning *et al.*, 2002), (Henning *et al.*, 2005), (Belousova *et al.*, 2003). Genetische Modifikationen führten auch zur Generierung chimärer Vektoren, die Fiberproteine oder einzelne Domänen des Strukturproteins wie Knob oder den Schaftanteil anderer adenoviraler Serotypen oder Spezies enthalten. Durch den Einsatz der Chimären HAd5/3 und HAd5/35 wurde beispielsweise die Transduktion primärer Melanomzellen erhöht und antitumorale Effekte in einem *in vivo* Modell des Zervixkarzinoms erzielt (Volk *et al.*, 2003), (Ni *et al.*, 2006).

Die Änderung des viralen Tropismus kann auch durch eine chemische Modifikation des adenoviralen Capsids erfolgen. Umfangreiche Möglichkeiten ergeben sich durch das genetische Einbringen reaktiver Cysteinreste an bestimmten Positionen der Capsidstruktur, die eine definierte Kopplung mit spezifischen Liganden erlaubt (Kreppel *et al.*, 2005). Auf der Capsidoberfläche adenoviraler Partikel befindet sich eine erhebliche Anzahl funktioneller

Aminogruppen, die leicht durch chemische Liganden mit Akzeptorfunktion modifiziert werden können (Fasbender *et al.*, 1997). Eine kovalente Ummantelung der Vektoren durch aktivierte Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycol (PEG) konnte auf diese Weise erfolgreich realisiert werden. Der entstehende Polymermantel maskiert das Capsid und schützt die Vektoren vor unerwünschten Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen wie Koagulationsfaktoren oder neutralisierenden Antikörpern sowie natürlichen Rezeptoren auf Normalepithelien (Chillon *et al.*, 1998), (De *et al.*, 2005), (O'Riordan *et al.*, 1999), (Hofherr *et al.*, 2007), (Fisher *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird die Serumhalbwertszeit der viralen Vektoren verlängert und der natürliche Tropismus modifiziert (Green *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das Anfügen synthetischer Polymere allgemein zu einer starken Inhibition der Leberinfektion führen kann (Wortmann *et al.*, 2008), (Hofherr *et al.*, 2008), (Doronin *et al.*, 2009). Andererseits kann der Einsatz von PEGs definierter Länge zu einer Erhöhung der hepatischen Transduktionsrate führen, da ein Abfangen der Vektoren durch Kupffer-Zellen verhindert wird (Prill *et al.*, 2011). Weiterhin werden polymermodifizierte Viruskomplexe als Basis für ein zielgerichtetes Retargeting zu Tumorzellen genutzt (Corjon *et al.*, 2008), (Delgado *et al.*, 1996). Durch das direkte Anfügen von Liganden wie FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) und EGF (*epidermal growth factor*) konnte eine CAR-unabhängige Infektion von Tumorzellen erzielt werden (Lanciotti *et al.*, 2003), (Morrison *et al.*, 2008).

Das Retargeting adenoviraler Vektoren durch Inkorporation hochaffiner Antikörperdomänen hat sich als kaum durchführbar erwiesen. Limitierende Faktoren dafür sind die Größe von Antikörpern sowie eine inkorrekte Faltung aufgrund der reduzierenden Bedingungen im Zellkern während des Zusammenbaus adenoviraler Vektoren. Um diese Inkompatibilität zu umgehen, besteht die Möglichkeit der Verwendung bifunktionaler Fusionsproteine, die eine effektive Beschichtung der Viren ermöglichen. Die als Adapter zwischen Virus und Zelloberfläche fungierenden, rekombinanten Moleküle bestehen aus einer capsidbindenden Domäne und einer zweiten Domäne zur spezifischen Bindung definierter Oberflächenstrukturen auf Zielzellen. Als capsidbindende Domäne können gegen diverse Capsidstrukturen gerichtete scFv-Antikörperfragmente (*single chain variable fragment*) oder die fiberbindende, sekretorische Ektodomäne des adenoviralen Rezeptors CAR (*soluble CAR* bzw. sCAR) zum Einsatz kommen. Durch die Fusion der genannten Domänen an ein breites Spektrum anderer scFv-Fragmente wurden sogenannte Diabodies und sCAR-scFv Adapterproteine zum spezifischen Retargeting onkolytischer Adenoviren generiert. Es konnte gezeigt werden, dass bispezifische Diabodies den Vektortropismus effektiv zu therapeutisch

relevanten Rezeptoren wie humanes Endoglin (CD105), Prostata-spezifisches Membran Antigen (PSMA) und Karzinoembryogenes Antigen (CEA) dirigieren (Nettelbeck *et al.*, 2001), (Kraaij *et al.*, 2005), (Korn *et al.*, 2004). Erfolgreiches *in vivo* Retargeting bei CEA-exprimierenden Tumoren und eine Reduktion der viralen Lebertransduktion konnte nach Beschichtung onkolytischer Adenoviren mit sCAR-scFv-Adapterproteinen in einem xenogenen Modell des Kolorektalen Karzinoms (CRC) erreicht werden (Li *et al.*, 2007). In anderen Studien wurde die Transduktion EGF-Rezeptor-exprimierender Zellen und das spezifische Retargeting adenoviraler Vektoren zu dem Onkoprotein c-erbB-2 durch bispezifische Adapterproteine vermittelt (Dmitriev *et al.*, 2000), (Kashentseva *et al.*, 2002). Eine weitere Strategie zur Veränderung der adenoviraler Transduktion stellen Adapterproteine dar, die aus der Fusion der Hexon-bindenden GLA-Domäne des Koagulationsfaktors FX und sc-Fv Fragmenten resultieren. Die Komplexierung von GLA-scFv Fusionsproteinen mit Adenoviren ermöglichte nach Retargeting der Tumormarker HER-2/neu oder EGFR eine effektive Infektion von Tumorzellen *in vitro* und im Mausmodell (Chen *et al.*, 2010).

Transduktionelles Retargeting stellt einen wichtigen Aspekt in der Virotherapie von Tumoren dar. Die Modifikation therapeutischer Vektoren ermöglicht nicht nur die selektive Infektion von Tumorzellen, sie erhöht auch die biologische Sicherheit der eingesetzten Adenoviren. Die Entwicklung neuer Möglichkeiten des Retargetings adenoviraler Vektoren zu vielversprechenden Tumormarkern trägt zur weiteren Optimierung der onkolytischen Tumorthherapie bei.

## 2.5 Epidemiologie und Pathologie von Tumorerkrankungen der Lunge

In Deutschland stellen Tumoren der Lunge sowohl bei Frauen als auch bei Männern die dritthäufigste Krebserkrankung dar. Aktuell sind pulmonale Tumorerkrankungen die häufigste krebisbedingte Todesursache bei Männern und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen. Prognosen zufolge werden dieses Jahr erneut rund 33.000 Männer und über 17.000 Frauen an Lungenkrebs erkranken. Der Tabakkonsum gilt nach wie vor als Hauptursache für Lungenkrebs. Desweiteren gehören zu den Risikofaktoren für die Entstehung bösartiger Lungentumoren kanzerogene Stoffe wie Asbest, Quarzstaub, das Edelgas Radon, aber auch Schadstoffe aus der Luft wie Dieselruß und Feinstaub (RKI und GEKID, Zentrum für Krebsregisterdaten, Ausgabe 2008).

Die histomorphologische Klassifizierung unterscheidet bei pulmonalen Tumoren das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) und die vier Hauptgruppen

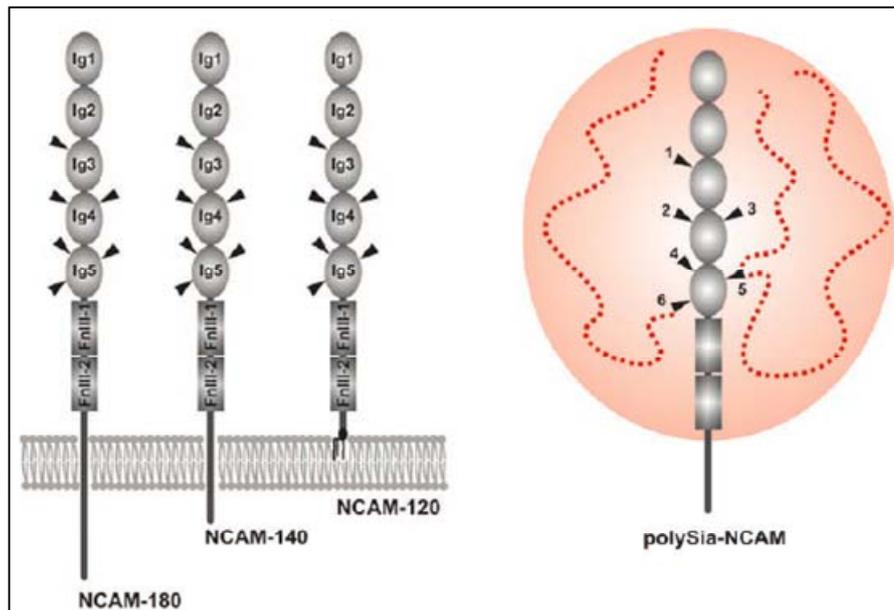
nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome, kombinierte adenosquamöse Karzinome). Beide Tumorgruppen sind mit einer äußerst ungünstigen Prognose assoziiert, da in den meisten Fällen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die Tumorausbreitung unter Bildung von Metastasen weit fortgeschritten ist. Die Histologie und das Tumorstadium sind für die Prognose und Therapie von bösartigen Lungentumoren entscheidend. Nichtkleinzellige Lungenkarzinome werden in den frühen Stadien I und II aufgrund der geringen Chemo- und Strahlensensibilität operativ behandelt. Bei fortgeschrittenen Stadien (IIIA und IIIB) sind Operation mit Nachbestrahlung oder eine alleinige Strahlentherapie etablierte Therapieformen. Bei kleinzelligen Lungenkarzinomen wird aufgrund der hohen Proliferationsrate und der Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung eine kombinierte Chemotherapie als bevorzugte Behandlungsmethode durchgeführt. Dabei werden die Protokolle ACO (Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin) und PE (Cisplatin bzw. Carboplatin, Etoposid) oder Kombinationen dieser Substanzen als Standardtherapie eingesetzt. Nach Beendigung der Chemotherapie erfolgt in der Regel eine Radiotherapie. Trotz einem anfänglichen guten Therapieansprechen kommt es bei der überwiegenden Anzahl der Patienten selbst nach Tumorremission zu einem Rezidiv, das in der Regel palliativ behandelt wird.

Neuere Möglichkeiten zur Behandlung pulmonaler Tumoren, basierend auf molekularbiologischen Therapiestrategien zielen auf die Inhibition der Angiogenese, die Inhibition der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (EGF, VEGF), die Induktion von Apoptosemechanismen und schließen den Einsatz einer Antikörpertherapie ein. Therapieansätze mit monoklonalen Antikörpern und Inhibitoren der autokrinen Wachstumsstimulation, die gegen Faktoren wie GRP (*gastrin releasing peptide*) oder dem Onkogen c-Kit und SCF (*stem cell factor*) gerichtet sind, zeigten zunächst eine vielversprechende Wirkung (Chaudhry *et al.*, 1999), (Krystal *et al.*, 2001), (Litz *et al.*, 2004). Trotz einiger weniger vielversprechender Studien ist die klinische Weiterentwicklung neuer Verfahren zur Therapie bösartiger Lungentumoren eher enttäuschend verlaufen. Bei gentherapeutischen Strategien stellt ein effektiver Transport der therapeutischen Vektoren zu den Zielzellen immer noch eine immense Hürde dar. Die Entwicklung optimierter Vektorsysteme und neuer Retargetingkonzepte sind notwendig, um eine Verbesserung des Therapieausgangs alternativer Strategien zu erreichen.

## 2.6 Polysialinsäure als molekulares Angriffsziel in der Tumorthherapie

Polysialinsäure (PolySia) ist eine saure Zuckerstruktur, die als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM entwicklungsabhängig exprimiert wird (s. Abb. 2). Polysialinsäure ist ein unverzweigtes Homopolymer aus N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure), wobei die einzelnen Zuckerreste durch  $\alpha$ 2,8-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. PolySia stellt hierdurch eine für Vertebraten sehr ungewöhnliche Zuckerstruktur dar. Das Glykoprotein NCAM, ein Mitglied der Superfamilie der Immunglobuline und Trägermolekül der Polysialylierung, ist über diverse Wechselwirkungen mit anderen Faktoren an der Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte beteiligt. Die Polysialylierung von NCAM wird durch die Expression von Sialinsäuretransferasen streng reguliert, die auf Gewebe während der Embryonal- und frühen postnatalen Gehirnentwicklung sowie im adulten Gehirn ausschließlich in den Bereichen synaptischer Plastizität und neuraler Neubildung beschränkt ist (Gascon *et al.*, 2007), (Hildebrandt *et al.*, 2007). NCAMs können in ihrer polysialylierten Form eine oder mehrere PolySia-Ketten tragen. Die spezifische, posttranslationale Polysialylierung wird durch die zwei am Golgi lokalisierten Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV katalysiert. Durch den Prozess der Polysialylierung werden die adhäsiven Eigenschaften des Trägermoleküls NCAM in ihr Gegenteil verkehrt. Die negativ geladene Zuckerstruktur verfügt über ein elektrostatisch stark abstoßendes Moment und bewirkt eine Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakten (Johnson *et al.*, 2005), (Yang *et al.*, 1992). Die Polysialylierung von NCAM verstärkt somit die zelluläre Beweglichkeit und Plastizität und spielt somit eine wichtige Rolle bei Differenzierungsvorgängen während der Embryogenese sowie bei der Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (Lackie *et al.*, 1991), (Rutishauser, 2008).

PolySia wird entwicklungsabhängig und gewebespezifisch exprimiert und kann in den meisten ausdifferenzierten Geweben nicht mehr nachgewiesen werden. In etlichen humanen Tumoren neuroendokrinen Ursprungs wie dem Wilms-Tumor, dem Neuroblastom, dem Rhabdomyosarkom und dem kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) findet jedoch eine erneute Expression der PolySia statt (Roth *et al.*, 1988), (Glick *et al.*, 1991), (Gluer *et al.*, 1998a), (Gluer *et al.*, 1998b), (Miyahara *et al.*, 2001), (Takamatsu *et al.*, 1994).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der drei bedeutendsten Isoformen des NCAM und die polysialylierte Form von NCAM**

Die extrazelluläre Domäne von NCAM besteht aus zwei Fibronektin Typ III-Domänen (FnIII) und fünf immunglobulinähnlichen Domänen (Ig1-5). Die transmembranären Formen NCAM-180 und -140 unterscheiden sich in der Länge ihrer zyttoplasmatischen Domäne, wobei NCAM-120 über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) mit der Membran verbunden ist. Alle Isoformen können an zwei N-Glykosylierungsstellen der Ig5-Domäne  $\alpha$ 2,8-verknüpfte Polysialinsäuren tragen, die den hydrodynamischen NCAM-Radius erweitern (entnommen aus *Polysialylation of NCAM*, Hildebrandt *et al.* 2010, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 663, DOI 10.107/978-1-4419-1170-4\_6).

Polysialyliertes NCAM kann zudem auch auf der Oberfläche von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und multiplen Myelomen nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 2000), (Kaiser *et al.*, 1996). Im Bereich der Tumorbilogie stellt PolySia einen wichtigen klinischen Aspekt dar, da eine enge Korrelation zwischen der Expression von PolySia und der Malignität des Tumors existiert. Es wird angenommen, dass die antiadhäsiven Eigenschaften von PolySia eine Auflockerung der Zellverbände bewirken und somit die Metastasierung begünstigen (Scheidegger *et al.*, 1994), (Seidenfaden *et al.*, 2003), (Perl *et al.*, 1999). Die durch Polysialylierung erreichte Abschirmung tumorspezifischer Antigene auf der Zelloberfläche könnte zudem Tumorgewebe und Metastasen vor einer antitumoralen Immunantwort schützen.

Aufgrund der tumorfördernden Eigenschaften stellt PolySia einen ungünstigen Diagnose- und Prognosefaktor dar. Die hochselektive Expression auf malignen Tumoren macht PolySia zu einem hervorragend geeigneten Angriffsziel für gezielte molekulare Tumorthérapien.

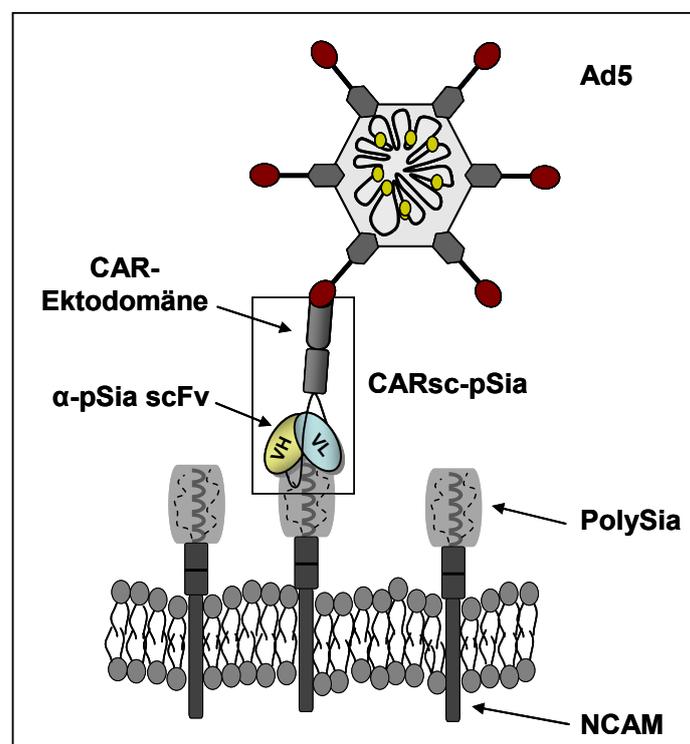
## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Nutzung onkolytischer Adenoviren in der Tumorthherapie stellt eine vielversprechende, alternative Behandlungsmöglichkeit dar, die jedoch noch hinsichtlich Tumorselektivität und therapeutischer Effizienz optimiert werden muss. Zur Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit ist die Weiterentwicklung von Konzepten, die eine gezielte Infektion der Tumoren ermöglichen, daher dringend erforderlich.

Die selektive Expression von Polysialinsäure auf der Oberfläche von klinisch-relevanten, malignen Tumoren ermöglicht die Entwicklung gezielter, onkolytischer Therapien. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer therapeutischen Strategie zur Behandlung von PolySia-exprimierenden Tumoren mittels PolySia-spezifischem Retargeting von onkolytischen Adenoviren. Hierzu sollte ein bispezifisches Fusionsprotein zur Komplexierung adenoviraler Vektoren generiert werden, dass durch eine hohe Bindungsaffinität zum adenoviralen Capsid einerseits und dem Tumormarker PolySia andererseits als Adapter wirkt und die effektive Infektion PolySia-spezifischer Zellen gewährleistet. Die Charakterisierung der Funktionalität und Spezifität der generierten Adapterproteine sollte zunächst in Zellen mit definiertem PolySia-Status getestet werden. Weiterhin sollte die Übertragbarkeit der adaptervermittelten, gezielten Infektion *in vitro* auf PolySia-exprimierende Tumorzellen humanen Ursprungs untersucht werden. Als ein Hauptaspekt der PolySia-spezifischen Retargetingstrategie sollte im Tierversuch die Möglichkeit evaluiert werden, eine spezifische Infektion subkutan xenotransplantierte, PolySia-exprimierende Tumoren auch nach intravenöser Gabe adaptermodifizierter Adenoviren zu erreichen. Die Infektionseffizienz der Subkutantumoren *in vivo* sollte unter anderem durch Biolumineszenzmessungen visualisiert und durch quantitative Messmethoden bestätigt werden. Die Beeinflussung des natürlichen adenoviralen Hepatotropismus durch die Adapterkomplexierung des Capsids sollte durch Ermittlung der hepatischen Viruslast und der virusvermittelten Lebertoxizität untersucht werden. Da die Bedeutung der im Rahmen der viralen Onkolyse induzierten antitumoralen Immunantwort zunehmend erkannt wird, sollte das PolySia-spezifische Retargeting onkolytischer Adenoviren auch in einem immunkompetenten, orthotopen Modell des SCLC untersucht werden. Die Bedeutung der onkolyseinduzierten antitumoralen Immunantwort sollte durch vergleichende Untersuchungen der therapeutischen Effizienz in immunkompetenten bzw. T-Zell-defizienten Mäusen charakterisiert und anhand von Lungenhistologien und Überlebensanalysen dargestellt werden.

### 3 Ergebnisse

Der Begriff „transduktionelles Retargeting“ beschreibt die gezielte Veränderung des Tropismus viraler Vektoren zu definierten Oberflächenmolekülen auf Zielzellen. Dieser Vorgang wird unter anderem durch das Beschichten viraler Partikel mit bispezifischen Fusionsproteinen bewerkstelligt, die aus zwei miteinander fusionierten Bindungsdomänen zusammengesetzt sind. Eine Domäne bindet hierbei an virale Hüll- oder Capsidproteine, während die zweite Bindungsdomäne definierte Oberflächenstrukturen auf Tumorzellen bindet. Bispezifische Fusionsproteine erfüllen gewissermaßen die Funktion eines Adapters zwischen viralen Vektoren und definierten Tumorstrukturen. In dieser Arbeit wurde das spezifische Retargeting onkolytischer Adenoviren des Serotyps 5 (Ad5) zu dem Tumormarker Polysialinsäure (PolySia) auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen untersucht. Zur Erkennung polysialylierter Tumoren wurde das Adapterprotein CARsc-pSia generiert. Das zugrunde liegende Prinzip der spezifischen Tumorerkennung durch CARsc-pSia-modifizierte Adenoviren ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.



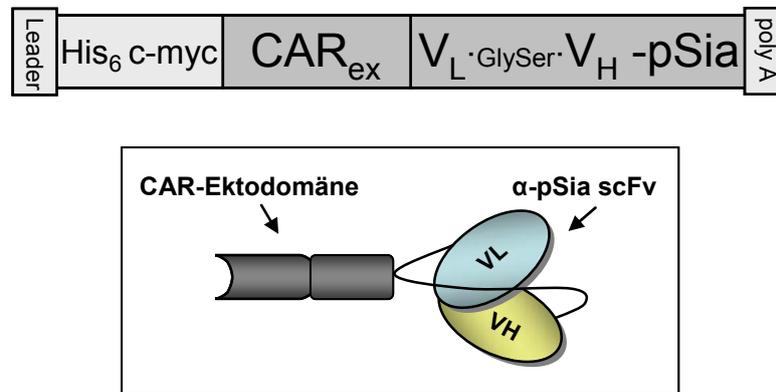
**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Retargetings adenoviraler Partikel zu polysialylierten Oberflächen auf Tumorzellen durch das Adapterprotein CARsc-pSia**

Adenoviren werden vor der systemischen Applikation mit dem Adapter CARsc-pSia beschichtet. Die Beschichtung ermöglicht die spezifische Bindung der Partikel an PolySia auf der Oberfläche von Tumorzellen und die gezielte Infektion polysialylierter Tumorzellen.

### 3.1 Generierung des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia

Das gezielte Retargeting onkolytischer Adenoviren zu polysialylierten Tumorzellen sollte durch das Beschichten der Viren mit dem bispezifischen Adapterprotein CARsc-pSia erreicht werden. Die spezifische Bindung an PolySia sollte durch ein scFv-Antikörperfragment (*single chain variable fragment*) vermittelt werden, das Polysialinsäuren auf den in der Zellmembran verankerten neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAMs) spezifisch erkennt. Als Ausgangspunkt zur Generierung des scFv-Fragments wurde der murine, monoklonale Antikörper mAb 735 verwendet, ein IgG2a Isotyp, der gegen alpha (2-8) Polysialinsäuren gerichtet ist (Frosch *et al.*, 1985), (Klebert *et al.*, 1993). Nach Isolierung und reverser Transkription der gesamten mRNA der anti-PolySia Antikörper-exprimierenden Hybridomzelllinie 735, konnten die variablen Regionen der leichten und schweren Kette (Fragmente V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub>) durch spezifische Primer in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Als N-Terminus des scFv-Fragments wurde die variable Region V<sub>L</sub> ausgewählt, die aus den ersten 117 Aminosäuren der leichten Antikörperkette zusammengesetzt ist. Der variable Bereich V<sub>H</sub> sollte C-terminal angehängt werden und besteht aus den ersten 116 Aminosäuren der schweren Kette des Antikörpers mAb 735. Die beiden variablen Domänen V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> sind über einen synthetischen Peptidlinker miteinander verbunden, der aus einer 15 Aminosäuren langen, repetitiven Sequenz von Glycin- und Serinresten in der Reihenfolge (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> besteht. Um die Bindung an adenovirale Vektoren zu ermöglichen, wurde das rekombinante anti-PolySia scFv-Fragment mit der Ektodomäne des Coxsackievirus- und Adenovirus Rezeptors (CARex) fusioniert. Das gewährleistet die bispezifischen Bindungseigenschaften rekombinanter CARsc-pSia-Fusionsproteine durch die effektive Erkennung sowohl der Knob Domäne adenoviraler Fiberproteine, als auch polysialylierter Zelloberflächen. Das Einfügen einer Sequenz in das Konstrukt, die für sechs Histidine und den sogenannten *myc-tag* (His-*myc-tag*) codiert, sollte die Aufreinigung und Detektion der exprimierten Adapterproteine ermöglichen. In Vorexperimenten wurde festgestellt, dass die Position der genannten *tag*-Sequenz erhebliche Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Adapter nach ihrer Aufreinigung hat. Das Anhängen des His-*myc-tags* an den C-Terminus des anti-PolySia scFv-Fragments führte zu einem Funktionsverlust der antigenbindenden Eigenschaft dieser Domäne nach Aufreinigung an Ni-Festphasen (Daten nicht gezeigt). Durch die Umpositionierung der *tag*-Sequenz vor die CAR-Ektodomäne werden die bispezifischen Bindungseigenschaften der Fusionsproteine zu Ad5-Vektoren und zu Polysialinsäuren nicht beeinflusst. Das Adapterprotein CARsc-pSia wurde daraufhin so konzipiert, dass vom N- zum C-Terminus folgende Domänen inkorporiert sind: das 24 Aminosäuren lange *Leader-*

Signalpeptid des Rezeptors CAR einschließlich der Spaltstelle, eine His-myc-*tag*-Sequenz, die sekretorische Ektodomäne des adenoviralen Rezeptors (CAR<sub>ex</sub>) und das scFv-Fragment aus mAb 735. Den Aufbau und eine schematische Darstellung des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia zeigt Abbildung 4.

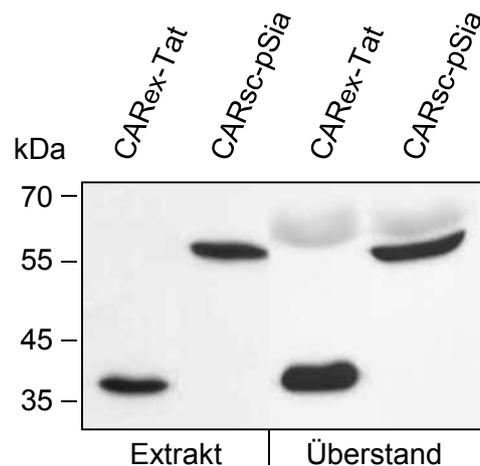


**Abbildung 4: Aufbau und schematische Darstellung des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia**

CARsc-pSia ist aus der Ektodomäne des adenoviralen Rezeptors CAR und dem scFv-Fragment des monoklonalen anti-PolySia Antikörpers 735 zusammengesetzt. Zur spezifischen Aufreinigung und Detektion enthält das Adapterprotein einen His-myc-*tag* am N-Terminus.

### 3.1.1 Expression des rekombinanten Konstrukts CARsc-pSia

Die angegebenen Domänen des rekombinanten Adaptermoleküls CARsc-pSia wurden für nachfolgende Untersuchungen in ein Expressionsplasmid eingefügt. Zunächst wurde die Expressionsfähigkeit der generierten CARsc-pSia-Sequenz nach transienter Transfektion in der Zelllinie 293 getestet. Die Expressionsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einer Western Blot-Analyse untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde das Expressionsplasmid des bereits charakterisierten und vergleichbar strukturierten Adapters CAR<sub>ex</sub>-Tat transfiziert. Das Fusionsprotein CAR<sub>ex</sub>-Tat besteht aus der Ektodomäne des Rezeptors CAR und einer Arginin- und Lysinreichen, polybasischen Peptidsequenz des Proteins Tat (*transactivator of transcription*) aus dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Die genannte Proteindomäne erlaubt nach unspezifischer Bindung an Säugerzellen die rezeptorunabhängige Aufnahme von Tat und wird als Protein Transduktions Domäne (PTD) gekennzeichnet.



**Abbildung 5: Expression des rekombinanten Adapterproteins CARsc-pSia**

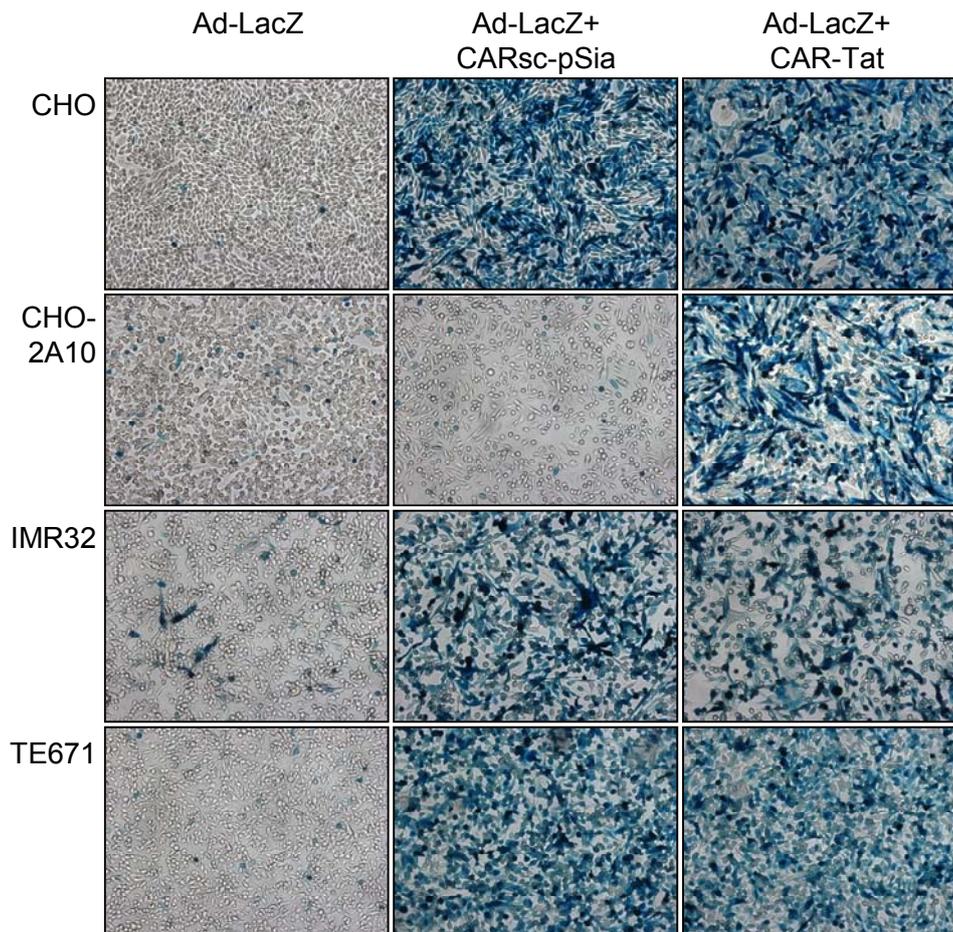
293 Zellen wurden mit jeweils 1 µg Expressionsplasmid der CARsc-pSia Sequenz und CAR-Tat Plasmid transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Proteinproben aus Zellextrakt und direkt aus Zellüberstand per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mittels eines anti-c-myc Antikörpers dargestellt.

Die Spezifität des anti-c-myc Antikörpers wird durch das Adapterprotein CAR<sub>ex</sub>-Tat gezeigt, das als Nachweiskontrolle aufgetragen wurde. Weiterhin stellt das Ergebnis die Expressionsfähigkeit der transfizierten CARsc-pSia-Konstrukte dar. Nach Auftrennung im SDS-Gel konnten exprimierte CARsc-pSia-Proteine erwartungsgemäß als Bande etwas oberhalb der berechneten molekularen Masse von 56 kDa detektiert werden. Durch den sekretorischen Charakter der eingebauten CAR-Ektodomäne werden CARsc-pSia-Adapter aus der Zelle ausgeschleust und sind daher auch im Zellüberstand nachweisbar.

### 3.1.2 Charakterisierung des bispezifischen Adapters CARsc-pSia

Nach erfolgter Expression sollte der Adapter CARsc-pSia aufgrund seiner bispezifischen Bindungsaffinität eine starke Interaktion zu adenoviralen Fiberproteinen und zu Polysialinsäuren auf der Oberfläche von Tumorzellen ermöglichen. Zur funktionellen Untersuchung des CARsc-pSia-vermittelten Retargetings von Ad5-Vektoren zu PolySia wurden im Infektionsversuch die CAR-negative, aber PolySia-positive Hamsterzelllinie CHO sowie die zu CHO isogene, PolySia-negative Mutante CHO-2A10 ausgewählt (Eckhardt *et al.*, 1995), (Windfuhr *et al.*, 2000). CHO-Zellen sind aufgrund der fehlenden CAR-Expression durch Ad5-Viren nicht infizierbar, sollten aber anhand ihrer polysialylierten Zelloberfläche permissiv für CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren sein. CHO-2A10-Zellen sind durch unbehandelte und CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren per se nicht infizierbar, da sie weder CAR noch PolySia exprimieren. Um eine unspezifische Infektion sämtlicher Zellen zu

demonstrieren wurde zusätzlich der zuvor beschriebene Adapter CAR-Tat als Positivkontrolle eingesetzt. Zur Darstellung der Übertragbarkeit des spezifischen Retargetings wurden im Infektionsversuch auch die humanen Tumorzelllinien TE671 und IMR32 verwendet. Vor der Infektion der beschriebenen Zellen erfolgte die Beschichtung der Ad5-Partikel durch eine Inkubation in Adapter-haltigem Zellüberstand. Das Ergebnis der Infektion mit beschichteten und unbehandelten Ad-LacZ-Viren ist in Abbildung 6 dargestellt.

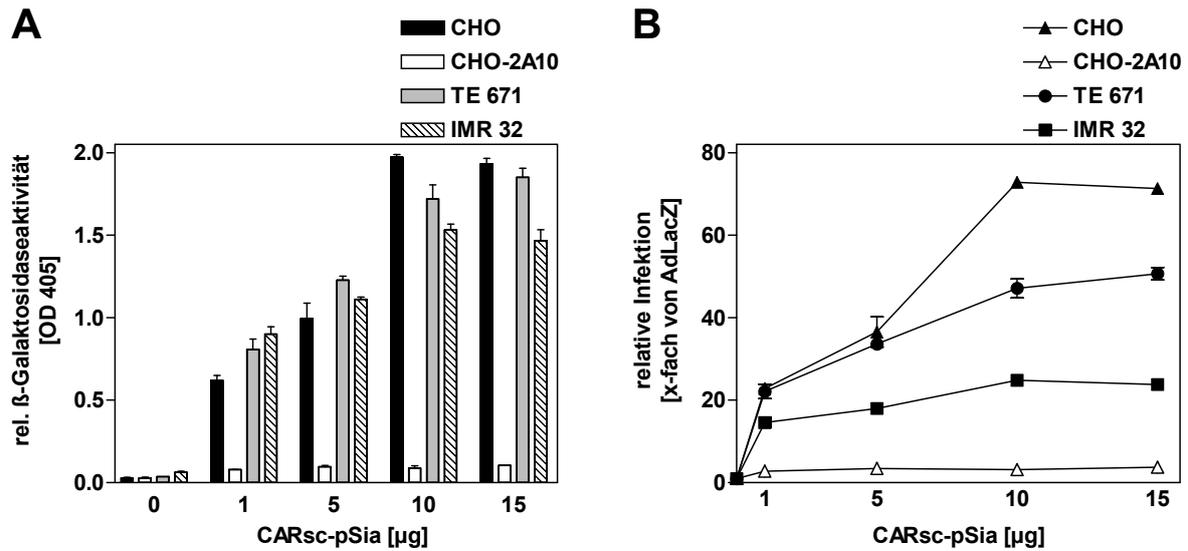


**Abbildung 6: CARsc-pSia vermittelt eine spezifische adenovirale Infektion PolySia-exprimierender Zellen**

Das Beschichten der Ad-LacZ-Partikel mit den Adapterproteinen CARsc-pSia und CAR<sub>ex</sub>-Tat erfolgte durch Inkubation in adapterhaltigen Überständen aus transfizierten 293-Zellen für 40 Minuten bei 4°C. Infiziert wurden die Zelllinien CHO, CHO-2A10, IMR32 und TE671 mit unbehandelten und adapterbeschichteten Ad-LacZ-Partikeln mit einer MOI von 25. Nach einer Infektionszeit von 30 Minuten und anschließendem Mediumwechsel folgte eine Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in adenoviral infizierten Zellen wurde cytochemisch nachgewiesen.

Alle untersuchten Zelllinien sind aufgrund des fehlenden Rezeptors CAR durch unbehandelte Ad5-Vektoren nicht infizierbar. Die Beschichtung der Viren mit dem Adapterprotein CARsc-pSia führt zu einer effektiven Infektion PolySia-positiver Zellen. Das wird in den infizierten Zelllinien CHO, TE671 und IMR32 durch die qualitative Darstellung der Enzymaktivität adenoviral eingeschleuster  $\beta$ -Galaktosidase angezeigt. In der nicht polysialylierten Zelllinie CHO-2A10 konnte nach Beschichtung der Viren mit CARsc-pSia keine adenovirale Infektion detektiert werden. Wie bereits erwähnt, vermittelt der Adapter CAR<sub>ex</sub>-Tat eine Infektion epithelialer Zellen ohne spezifische Erkennung eines Rezeptors. Erwartungsgemäß konnte in allen getesteten CAR-negativen, PolySia-positiven Zellen und in der CAR- und PolySia-negativen Zelllinie CHO-2A10 eine Infektion durch CAR<sub>ex</sub>-Tat beschichtete Ad-LacZ-Partikel nachgewiesen werden. Die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die Behandlung des Adenovirus Ad-LacZ mit bispezifischen CARsc-pSia-Adapterproteinen zu einer CAR-unabhängigen, aber PolySia-spezifischen Infektion von Zielzellen führt.

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit Überständen aus Transfektionsansätzen durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung des CARsc-pSia-vermittelten Retargetings und der spezifischen Infektion polysialylierter Zellen wurden definierte Mengen an Fusionsproteinen eingesetzt. Zur stabilen Transduktion einer Produktionszelllinie wurde die CARsc-pSia-Sequenz in ein retrovirales Expressionssystem integriert. Das ermöglichte eine effiziente Aufreinigung produzierter CARsc-pSia-Proteine aus Überständen und Extrakten transduzierter Zellen mittels Affinitätschromatographie. In einem weiteren Infektionsversuch mit den zuvor untersuchten Zelllinien wurden Ad-LacZ-Viren mit unterschiedlichen Mengen des aufgereinigten Adapterproteins CARsc-pSia beladen. Die quantitative Auswertung der Infektionsreihe zeigt Abbildung 7.



### Abbildung 7: Quantitative Analyse des CARsc-pSia-vermittelten Retargetings in PolySia-exprimierenden Zellen

Vor der Infektion wurden jeweils  $8 \times 10^6$  infektiöse Ad-LacZ-Partikel mit definierten Mengen an aufgereinigten CARsc-pSia Proteinen für 40 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  beladen. Zur Infektion wurden CARsc-pSia-beschichtete Viren sowie unbehandelte Viren eingesetzt. Die Zelllinien CHO, CHO-2A10, IMR32 und TE671 wurden anschließend mit der angegebenen Virusmenge für 30 Minuten inkubiert. Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität aus Zellextrakt erfolgte 48 Stunden nach Infektion.

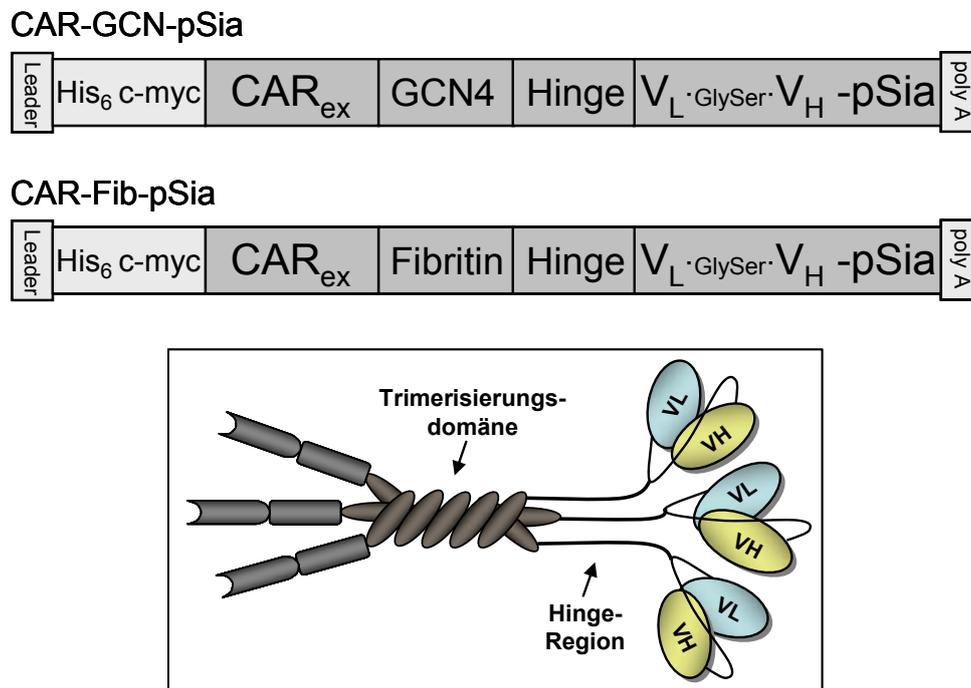
Die Erhöhung der Menge der eingesetzten Fusionsproteine bei gleicher Viruslast resultiert in der Steigerung der Infektionseffizienz. Das ist aus der Messung der Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in den infizierten Zellen (Abb.7A) und der daraus abgeleiteten relativen Infektion bezogen auf den Infektionsansatz mit unbehandelten Adenoviren (Abb.7B) ersichtlich. Ein Sättigungseffekt der eingesetzten Virusmenge konnte beim Einsatz von  $10 \mu\text{g}$  CARsc-pSia erreicht werden. Ausgehend von der vorhandenen Anzahl an viralen Partikeln, befinden sich in einem Infektionsansatz  $9,6 \times 10^8$  adenovirale Fiberproteine als potentielle Bindungsstellen für CARex-Domänen der Adapterproteine. Obwohl die Affinität zwischen der Knobdomäne des adenoviralen Fiber-Proteins und dem Rezeptor CAR als hoch eingestuft wird, besteht im Konzentrationsbereich der beobachteten optimalen Infektionseffizienz ungefähr ein  $10^4$ -facher Überschuss an CARsc-pSia-Adapter. Ähnliche Mengenverhältnisse mit aufgereinigten bispezifischen Fusionsproteinen wurden bereits in Infektionsstudien mit den Adaptern CAR<sub>ex</sub>-Tat und CAR<sub>ex</sub>-VP22 beobachtet (persönliche Kommunikation mit PD. Dr. Florian Kühnel).

## 3.2 Generierung des trimerisierungsfähigen, bispezifischen Adapters

### CARsc-pSia

Das bispezifische Adapterprotein CARsc-pSia wurde für erste Funktionsversuche als Monomer konzipiert. In einer Vergleichsstudie monomerer und trimerisierter Strukturen des bispezifischen Fusionsproteins sCARfC6.5 konnte eine Erhöhung der Bindungsaffinität trimerisierter Adapter zu Knob festgestellt werden (Kashentseva *et al.*, 2002). Durch eine Trimerisierung sollte auch die Bindungsfähigkeit des Adapters CARsc-pSia verstärkt und somit das spezifische Retargeting verbessert werden. Um die Bildung von CARsc-pSia-Homotrimeren zu ermöglichen, wurden zwei verschiedene Möglichkeiten zur Modifikation des Konstrukts in Betracht gezogen. Zum einen wurde die C-terminal lokalisierte Trimerisierungsdomäne des Proteins Fibrin aus dem Bakteriophagen T4 eingesetzt. Durch Inkorporation dieses 30 Aminosäuren langen, konservierten Polypeptids sollten CARsc-pSia Monomere nach ihrer Expression zu Trimeren aggregieren (Tao *et al.*, 1997), (Strelkov *et al.*, 1996). Aus dem in der Hefe vorkommende Transkriptionsfaktor GCN4 wurde die Isoleucin Variante des Leucin-Zipper-Bereichs als alternative Möglichkeit zur Ausbildung trimerer Strukturen ausgewählt (Kim *et al.*, 2002), (Harbury *et al.*, 1993). Als Verbindungssequenz zwischen der Trimerisierungsdomäne aus Fibrin oder GCN4 und dem anti-pSia scFv-Fragment diente eine prolinreiche, 22 Aminosäuren lange Gelenkregion (*hinge*-Region). Die konservierte *hinge*-Region kommt in Immunglobulinen vor, wo sie eine Verbindung zwischen dem antigenbindenden Fragment (Fab) und dem restlichen konstanten Bereich der schweren Ketten (Fc) bildet. Die *hinge*-Region verknüpft über kovalente Disulfidbrücken die Antikörperfragmente Fab und Fc zu der typischen Ypsilon-ähnlichen Form und verleiht Immunglobulinen dadurch einen zusätzlichen flexiblen Charakter. Die Trimerisierungsdomänen aus Fibrin bzw. GCN4 und die Gelenkregion *hinge* wurden aus Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion synthetisiert und miteinander fusioniert. In einem weiteren Konstruktionsansatz konnte das rekombinante Polypeptid aus Fibrin bzw. GCN4 und *hinge*-Region zwischen die Ektodomäne des adenoviralen Rezeptors (CARex) und dem scFv-Fragment in die Sequenz des Adapters CARsc-pSia integriert werden. Die auf diese Weise modifizierte CARsc-pSia Expressionskassette beinhaltet vom N- zum C-Terminus folgende Domänen: das 24 Aminosäuren lange *Leader*-Signalpeptid des Rezeptors CAR einschließlich der Spaltstelle, eine His- myc- tag- Sequenz, die sekretorische Ektodomäne CARex, die Trimerisierungsdomäne des Proteins GCN4 oder Fibrin mit *hinge* Region und das scFv-Fragment des anti-PolySia Antikörpers 735. Zur besseren Übersicht wird der

Aufbau der modifizierten Konstrukte CAR-GCN-pSia und CAR-Fib-pSia sowie eine graphische Darstellung trimerisierter Adapterproteine in Abbildung 8 gezeigt.

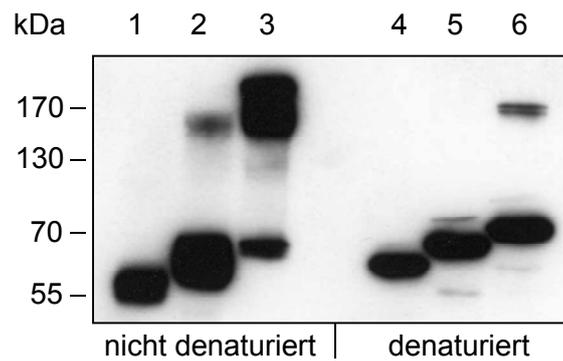


**Abbildung 8: Aufbau und schematische Darstellung des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia mit verschiedenen Trimerisierungsmotifen und *hinge*-Region**

Die Ektodomäne des adenoviralen Rezeptors CAR ist über ein Trimerisierungsmotif mit dem scFv-Fragment des monoklonalen anti-PolySia Antikörpers 735 verbunden. Als Trimerisierungsdomänen wurden Polypeptidsequenzen aus den Proteinen Fibritin und GCN4 an die Gelenkregion *hinge* der Immunglobuline angefügt. Die schematische Darstellung zeigt bispezifische CARsc-pSia Adapterproteine in der trimerisierten Form.

### 3.2.1 Charakterisierung trimerisierungsfähiger Adapterproteine

Die Charakterisierung der modifizierten Adapterproteine nach der Integration rekombinanter Trimerisierungsdomänen aus den Proteinen Fibritin (CAR-Fib-pSia) bzw. GCN4 (CAR-GCN-pSia) erfolgte in einer Western Blot-Analyse. Untersucht wurden die Expressionsfähigkeit sowie die Fähigkeit zur Ausbildung trimerer Strukturen der veränderten Adapterproteine im Vergleich zum ursprünglichen monomeren Konstrukt CARsc-pSia. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Gelaufftrennung mit nicht denaturierten und denaturierten Fusionsproteinen.



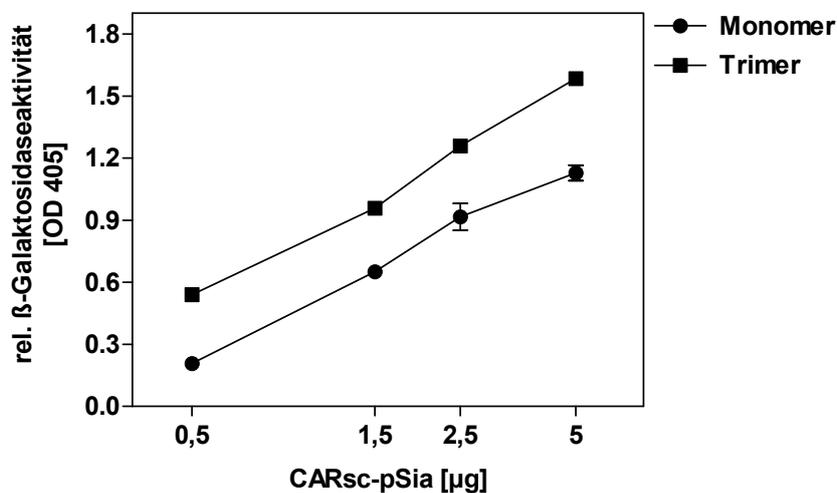
**Abbildung 9: Charakterisierung rekombinanter CARsc-pSia-Fusionsproteine nach Integration der Trimerisierungsdomänen und der *hinge*-Region**

293 Zellen wurden mit der Expressionskassette des monomeren Adapterproteins CARsc-pSia (Proben 1 und 4), sowie mit den modifizierten Konstrukten CAR-GCN-pSia (Proben 2 und 5) und CAR-Fib-pSia (Proben 3 und 6) transfiziert. Die nach 48 Stunden aus Zellextrakt isolierten Fusionsproteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und durch einen anti-c-myc-Antikörper im Western Blot detektiert. Aufgetragen sind jeweils denaturierte und nicht denaturierte Proben der verschiedenen CARsc-pSia-Adapter.

Die Inkorporation der rekombinanten Fragmente GCN4-*hinge* und Fibrin-*hinge* in die CARsc-pSia Sequenz hat eine Erhöhung der molekularen Masse des ursprünglichen Adapterproteins CARsc-pSia um 5 bzw. 8 kDa zur Folge. Dieser Unterschied ist nach Denaturierung der Proteinproben in einem Vergleich der modifizierten Fusionsproteine CAR-GCN-pSia (Probe 5) und CAR-Fib-pSia (Probe 6) in ihrer monomeren Form mit dem Adapter CARsc-pSia (Probe 4) deutlich erkennbar. Zur Darstellung trimerisierter Adapterstrukturen wurden die entsprechenden Proteinproben nicht aufgeköcht und ohne Reduktionsmittel auf das Gel aufgetragen. Verglichen mit den zuvor denaturierten Proteinen ist eine Fraktion mit deutlich erhöhtem Molekulargewicht zu erkennen. Das ist in der Proteinprobe mit CAR-Fib-pSia-Adapter (Probe 3) durch die Detektion einer stark erhöhten Proteinbande dargestellt. Die Inkorporation des Polypeptids aus Fibrin resultiert demzufolge in einer effizienten Trimerisierung der exprimierten Fusionsproteine. CAR-GCN-pSia-Adapterproteine, die eine Trimerisierungssequenz aus GCN4 beinhalten (Probe 2), können dagegen kaum zu stabilen, trimeren Strukturen aggregieren, da in dieser Probe eine detektierte erhöhte Proteinbande nur schwach erkennbar ist. Die Banden denaturierter und nicht denaturierter CAR-GCN-pSia-Proteine befinden sich hauptsächlich auf gleicher Laufhöhe (Proben 2 und 5). Als Vergleichskontrolle wurde auch hier das nicht denaturierte, monomere CARsc-pSia-Adaptermolekül eingesetzt (Probe 1). Zusammenfassend demonstriert das Ergebnis die effektive und stabile Ausbildung einer trimeren Konformation exprimierter CAR-Fib-pSia-Fusionsproteine aufgrund der integrierten Fibrin-Domäne.

### 3.2.2 Effektivitätsvergleich monomerer und trimerisierter Adapterproteine

Untersuchungen zur Darstellung der erwarteten Verbesserung des spezifischen Retargetings durch trimerisierte Adapter wurden daraufhin mit dem Konstrukt CAR-Fib-pSia durchgeführt. Bispezifische Fusionsproteine monomerer und trimerer Struktur wurden anhand ihres His-myc-tags aus stabil transduzierten Produktionszelllinien aufgereinigt und in definierten Mengen zur Beschichtung adenoviraler Vektoren eingesetzt. Ein direkter Vergleich beider Adapterstrukturen erfolgte im Infektionsversuch mit der zuvor beschriebenen Zelllinie CHO. In Abbildung 10 ist die Fähigkeit monomerer und trimerisierter CARsc-pSia-Adapter dargestellt, eine PolySia-spezifische Infektion der Zellen zu ermöglichen.



**Abbildung 10: Adenovirale Infektion durch monomere und trimerisierte CARsc-pSia Adapterproteine**

Vor der Infektion wurden adenovirale Vektoren mit dem Adapterprotein CARsc-pSia in monomerer bzw. trimerisierter Form in den Konzentrationen 0,5 $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$ , 2,5 $\mu\text{g}$  und 5 $\mu\text{g}$  beschichtet. Infiziert wurden CHO-Zellen mit jeweils  $8 \times 10^6$  infektiösen Ad-LacZ-Partikeln für 30 Minuten. Dargestellt ist die Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase aus Zellextrakt 48 Stunden nach der Infektion.

Die dargestellte Infektion nicht permissiver CHO-Zellen nach Beschichtung adenoviraler Partikel mit dem monomeren Adapter CARsc-pSia wurde bereits in Abschnitt 3.1.2 charakterisiert. Die Beschichtung der eingesetzten Viren mit der entsprechenden Menge an trimerisierten Fusionsproteinen führt zu einer Verbesserung der Infektion von CHO-Zellen. Die beobachtete signifikante Steigerung der Infektion kann womöglich auf eine effizientere Beschichtung der Viren durch trimerisierte CARsc-pSia-Adapter zurückgeführt werden. Die postulierte gleichzeitige Bindung von drei CAR-Molekülen an die adenovirale Fiber-Knob-Domäne sollte beim Einsatz trimerisierter CARsc-pSia-Adapter im Vergleich zu monomeren

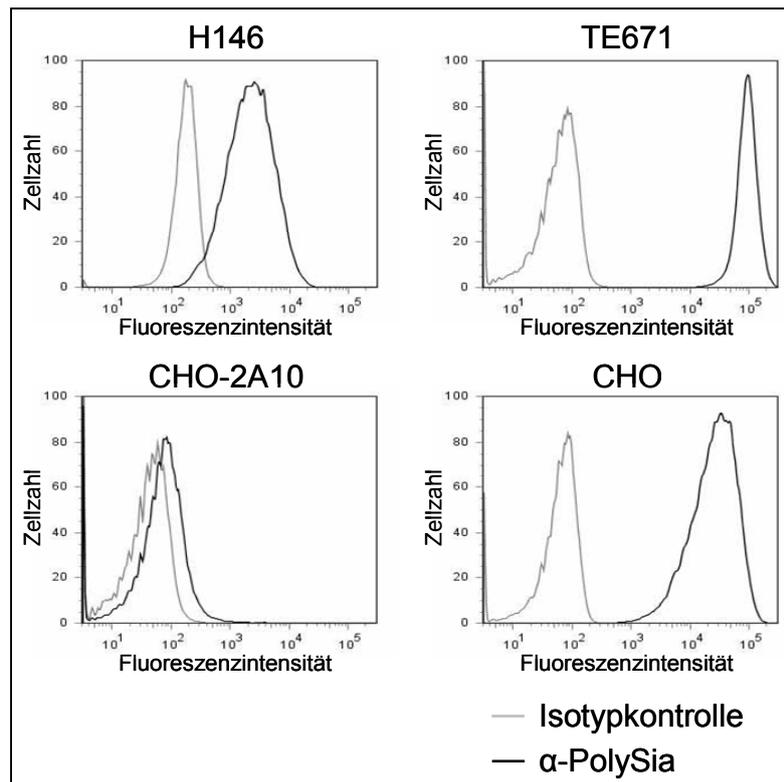
Adapter eine stabilere Virus-Adapter-Interaktion ermöglichen. Weiterhin könnte die effektive Zusammenlagerung zu CARsc-pSia-Trimeren zu einer solideren Struktur führen und einen höheren Schutz vor Degradierung gewährleisten. Für nachfolgende *in vitro* und *in vivo* Experimente kamen aufgrund der gesteigerten Infektionseffizienz ausschließlich aufgereinigte, trimerisierungsfähige Adapterproteine zum Einsatz, die aus Gründen der Vereinfachung weiterhin als CARsc-pSia bezeichnet werden.

### **3.3 Spezifisches Retargeting solider Tumore *in vivo***

Eine große Herausforderung in der Tumorthherapie durch onkolytische Adenoviren stellt die gezielte Infektion von malignem Gewebe nach systemischer Applikation dar. Durch das ubiquitäre Vorkommen des adenoviralen Rezeptors CAR auf Epithelien können intravenös verabreichte Adenoviren eine Vielzahl von Zielgeweben infizieren und schädigen. Das führt zu unerwünschten Nebeneffekten wie das Auslösen einer viralen Hepatotoxizität und einer starken Immunantwort gegen das eingesetzte Virus. Des Weiteren kann eine drastische Verringerung der therapeutischen Effizienz onkolytischer Adenoviren die Folge sein, da nach systemischer Gabe nur eine unzureichend geringe Anzahl an Viruspartikeln das Tumorgewebe erreicht. Durch die Beschichtung der Viren mit bispezifischen Fusionsproteinen sollen diese Hürden umgangen werden. Wie zuvor gezeigt wurde, ermöglichen CARsc-pSia-Adapter nach Bindung an adenovirale Vektoren eine gezielte und effiziente Infektion von PolySia-exprimierenden Tumorzellen *in vitro*. Der geänderte Tropismus zu einem definierten Zielgewebe sollte zudem das Sicherheitsprofil systemisch applizierter Vektoren erhöhen und die Toxizität und Immunogenität eines adenoviralen Therapieansatzes reduzieren.

#### **3.3.1 Untersuchungen zum Retargeting in xenogenen Tumoren des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms und Rhabdomyosarkoms**

Das spezifische Retargeting onkolytischer Adenoviren zu polysialyliertem Tumorgewebe sollte zunächst in murinen Xenotransplantationsmodellen humaner Tumoren untersucht werden. Zur Etablierung solider Tumoren wurden die Zelllinie H146 des humanen, kleinzelligen Lungenkarzinoms und TE671-Zellen des humanen Rhabdomyosarkoms ausgewählt. Beide Zelllinien erwiesen sich in Vorversuchen mit unbehandelten Adenoviren als nicht infizierbar. Das Vorhandensein von PolySia auf der Oberfläche der Zellen wurde zunächst mittels einer FACS-Analyse untersucht, die in Abbildung 11 dargestellt ist.



**Abbildung 11: Expression von Polysialinsäuren auf den Zelllinien H146 und TE671**

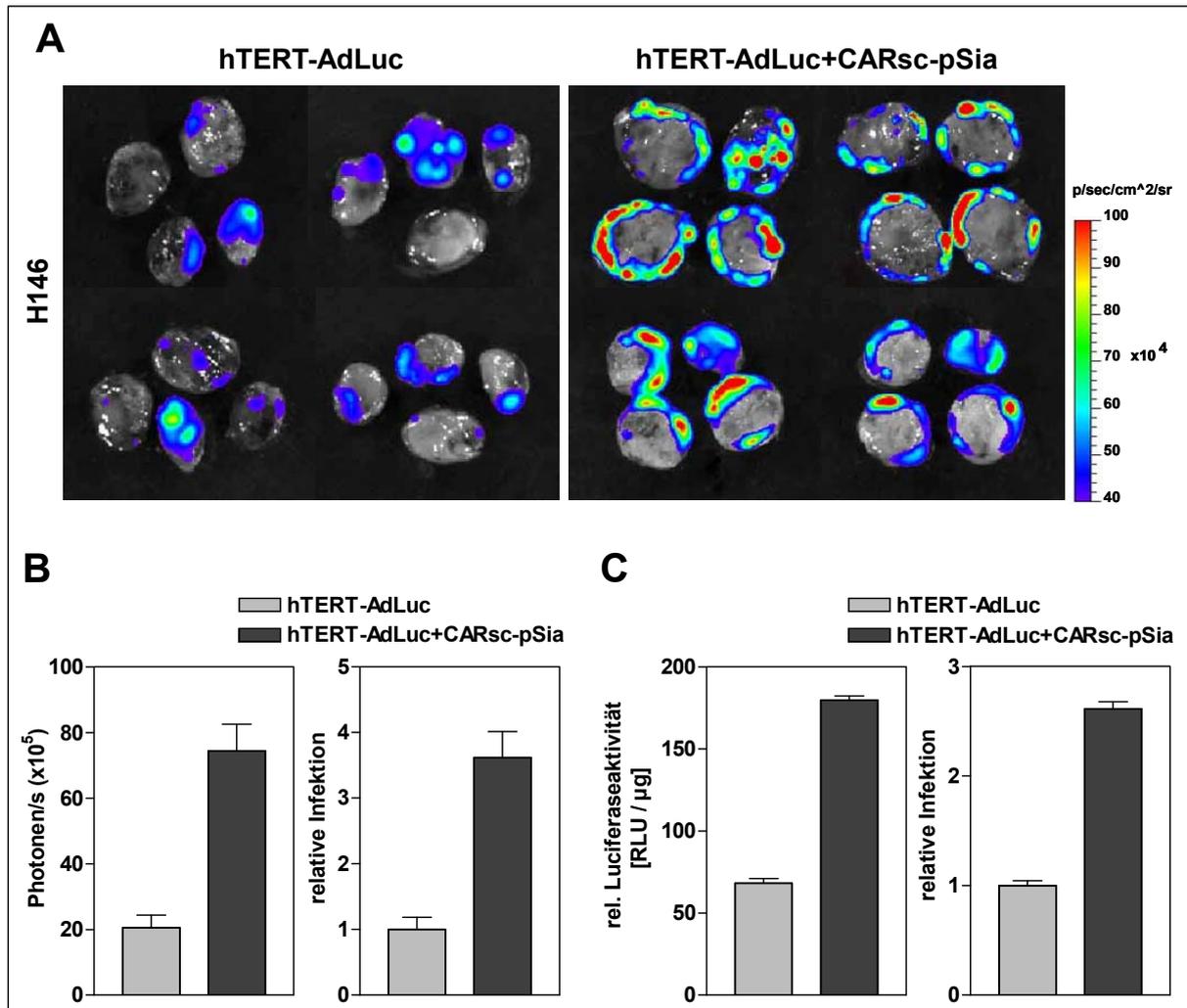
Zur Untersuchung der PolySia-Expression wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen der dargestellten Linien H146, TE671 CHO und CHO-2A10 mit dem anti-PolySia-Antikörper 735 detektiert. Das Ergebnis der FACS-Analyse wird in Histogrammen angezeigt.

Als Kontrollen wurden die bereits charakterisierte polysialylierte Zelllinie CHO und die PolySia-negative Mutante CHO-2A10 eingesetzt. Die dargestellten Histogramme zeigen eine hohe Expression von PolySia auf den Zelllinien H146 und TE671. Im Vergleich zur kleinzelligen Lungenkarzinomlinie H146 weisen die Rhabdomyosarkomzellen TE671 einen höheren Grad der Polysialylierung auf ihrer Oberfläche auf. Aufgrund der ausreichenden PolySia-Expression wurden beide Zelllinien für Untersuchungen zum spezifischen Retargeting als geeignet angesehen.

Zur Etablierung der nachfolgend beschriebenen Tumormodelle wurden die Flanken von Nacktmäusen mit jeweils  $1 \times 10^7$  H146- bzw. TE671-Zellen subkutan inokuliert. Bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 5 mm erfolgte die systemische Applikation des Luciferase-exprimierenden, onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc in beiden Mausgruppen. Untersuchungen zur gezielten Infektion subkutaner Tumoren des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms und des humanen Rhabdomyosarkoms nach Behandlung der Versuchstiere mit unbeschichteten und CARsc-pSia-beschichteten hTERT-AdLuc-Partikeln wurden zwei Tage nach der Virusinjektion durchgeführt.

Adenoviral infizierte Areale im subkutanen kleinzelligen Lungenkarzinom werden in Abbildung 12A durch die optische Darstellung der gemessenen Biolumineszenz

wiedergegeben. Zur genaueren Charakterisierung infizierter Bereiche wurden vor der Messung alle Tumoren explantiert und in etwa 1,5 mm dicken Sektionen aufgetrennt. Nach einer systemischen Applikation unbehandelter hTERT-AdLuc-Viren können innerhalb des Tumorgewebes kaum infizierte Bereiche nachgewiesen werden. Das wird durch eine sehr schwache Biolumineszenz in den explantierten Tumoren angezeigt. Im Versuchsansatz mit CARsc-pSia-komplexierten Partikeln ist eine effektive Infektion der subkutanen H146 Lungenkarzinome durch eine starke Biolumineszenz erkennbar, die hauptsächlich auf die Randbereiche der Tumorsektionen beschränkt ist. Durch den Einsatz der Adapter konnte dabei eine mehr als dreifache Erhöhung der Lumineszenz erreicht werden. Das wird in Abbildung 12B durch die direkte Messung der Photonenemission aus den abgebildeten Tumorsektionen dargestellt. Die in Abbildung 12C dargestellte Quantifizierung der Enzymaktivität adenoviral eingeschleuster Luciferase aus H146-Tumorextrakt bestätigt diese Beobachtung. Nach Behandlung der Tiere mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren konnte in homogenisierten Tumoren dieser Versuchsgruppe eine Erhöhung der Luciferaseaktivität im gleichen Ausmaß detektiert werden.

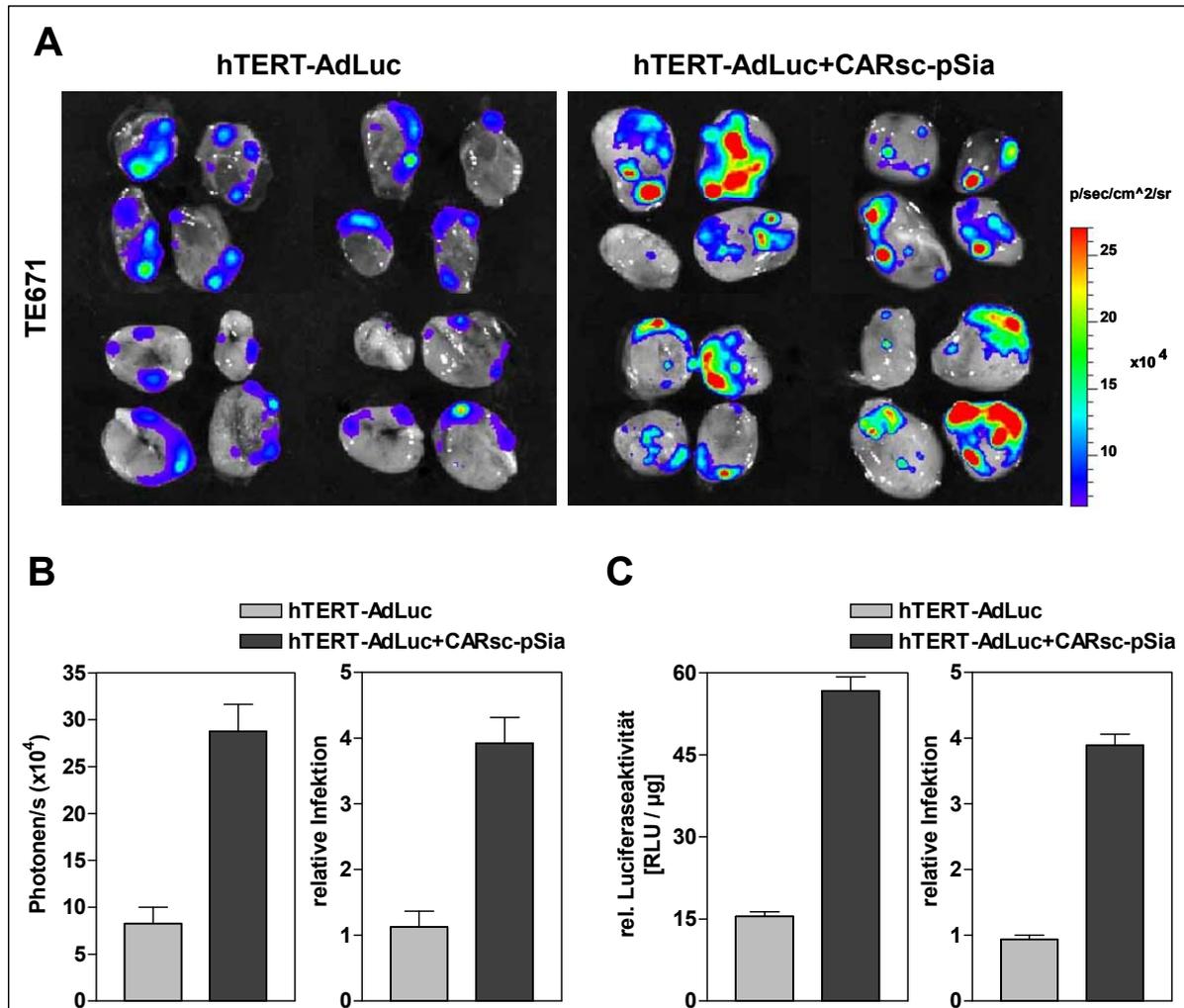


**Abbildung 12: Der Adapter CARsc-pSia ermöglicht effektives Retargeting des onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc zu subkutanen Tumoren des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms.**

Die systemische Applikation von  $8 \times 10^8$  infektiösen onkolytischen Adenoviren pro Maus erfolgte nach Erreichen der vorgeschriebenen Tumorgöße. Dabei kamen unbehandelte und mit CARsc-pSia beschichtete hTERT-AdLuc Viren zum Einsatz. Infizierte Bereiche in explantierten H146-Tumoren werden durch Illustration der Biolumineszenz im IVIS (*In Vivo Imaging System*) qualitativ wiedergegeben. Tumorbereiche mit starker Luciferaseaktivität werden als rote Flächen angezeigt. Dargestellt sind repräsentative Tumorsektionen von jeweils vier Tieren pro Gruppe (A). Desweiteren ist die Messung der Photonenermission in infizierten Arealen der Tumorsektionen (B) und die Quantifizierung der Luciferaseaktivität aus Tumorextrakten dargestellt (C). Alle Messungen wurden 48 Stunden nach Virusgabe durchgeführt.

Untersuchungen zur PolySia spezifischen Infektion subkutaner Tumoren des humanen Rhabdomyosarkoms wurden nach dem gleichen methodischen Muster ausgewertet. Die in Abbildung 13A dargestellte Biolumineszenz in explantierten und in Sektionen aufgeteilten Rhabdomyosarkome zeigt deutlich, dass das Beladen der Viren mit dem Adapter CARsc-pSia eine effiziente Infektion ermöglicht. Das wird im Vergleich mit Tumorsektionen, die durch unbeschichtete hTERT-AdLuc-Partikel kaum infiziert wurden, anhand der Messung der

Photonenemission in einer vierfach höheren Biolumineszenz angezeigt. Die quantitative Bestimmung der Luciferaseaktivität aus homogenisierten Tumorextrakten korreliert mit diesem Ergebnis und zeigt ebenfalls eine vierfache Erhöhung der Enzymaktivität in subkutanen Tumoren nach Behandlung der Mäuse mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren. Die Ergebnisse beider durchgeführten Messungen sind in Abbildung 13B und 13C dargestellt.



**Abbildung 13: Der Adapter CARsc-pSia ermöglicht effektives Retargeting des onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc zu subkutanen Tumoren des humanen Rhabdomyosarkoms.**

Nach Erreichen der vorgeschriebenen Tumorgröße wurden die Versuchstiere mit jeweils  $8 \times 10^8$  infektiösen Partikeln unbeschichteter und mit CARsc-pSia-beschichteter hTERT-AdLuc-Viren behandelt. Dargestellt ist die im IVIS gemessene Biolumineszenz in Tumorsektionen aus jeweils vier verschiedenen H146-Tumorexplantaten pro Mausgruppe (A), die Messung der Photonemission der abgebildeten Tumorsektionen (B) und die Quantifizierung der Luciferaseaktivität aus Tumorhomogenat (C) 48 Stunden nach Virusgabe.

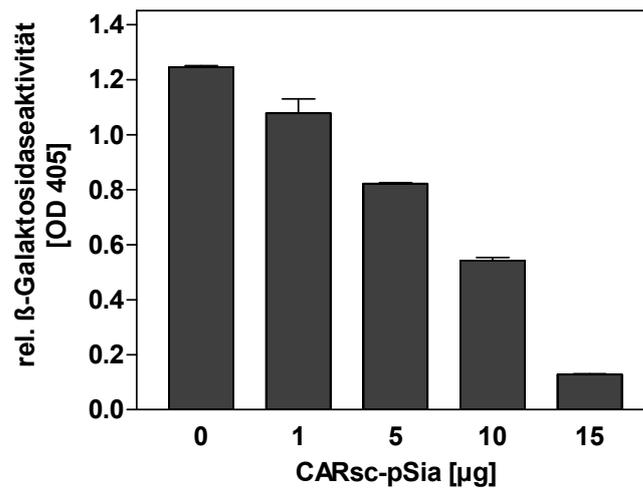
Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass die Modifikation adenoviraler Vektoren durch das Adapterprotein CARsc-pSia eine spezifische Infektion polysialylierter, subkutaner Tumoren nach systemischer Applikation vermittelt. Beim Vergleich der untersuchten Tumormodelle sind jedoch Unterschiede im Infektionsmuster erkennbar. Während innerhalb der Rhabdomyosarkome adenovirale Infektionsherde im gesamten Tumorgewebe verteilt sind, werden subkutane H146-Lungenkarzinome nur im Randbereich infiziert. Diese Beobachtung erklärt sich durch Unterschiede in der Vaskularisierung der beiden Tumormodelle und durch das Auftreten zentral lokalisierter Nekrosen innerhalb der H146-Tumoren.

### **3.4 Beeinflussung des natürlichen adenoviralen Tropismus durch das Adapterprotein CARsc-pSia**

Den existierenden Literaturdaten und den bislang gewonnenen Erkenntnissen aus eigenen Versuchen kann entnommen werden, dass die Beschichtung mit bispezifischen Fusionsproteinen den natürlichen Tropismus adenoviraler Vektoren stark beeinflusst. Im Prozess des transduktionellen Retargetings wird die spezifische Infektion von Zielzellen durch den gerichteten Tropismus Adapter-beladener Ad5-Partikel initiiert. Die Bindung von CARsc-pSia an das adenovirale Fiberknob sollte auch Auswirkungen auf die CAR-abhängige Infektion haben. Der Einfluss einer Beschichtung mit CARsc-pSia auf das natürliche Infektionsmuster von Ad5-Vektoren wird nachfolgend *in vitro* und im Mausmodell untersucht.

#### **3.4.1 Inhibition der rezeptorabhängigen Infektion durch CARsc-pSia**

Zunächst wurde untersucht, ob die Beschichtung von Adenoviren mit CARsc-pSia-Fusionsproteinen den Eintritt in Zellen hemmt, die permissiv für unbeschichtete Viren sind. Die Bindung des adenoviralen Proteins Fiber-Knob an den Rezeptor CAR ist essentiell für die Initiation einer Infektion von Zielzellen *in vitro*. Infektionsversuche wurden aufgrund der hohen CAR-Expression in der PolySia-negativen, hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 durchgeführt. Hierzu wurden unbehandelte und mit definierten Mengen an CARsc-pSia-beladene Adenoviren eingesetzt. Das Ergebnis in Abbildung 14 zeigt die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase als Indikator für die Infektionseffizienz.



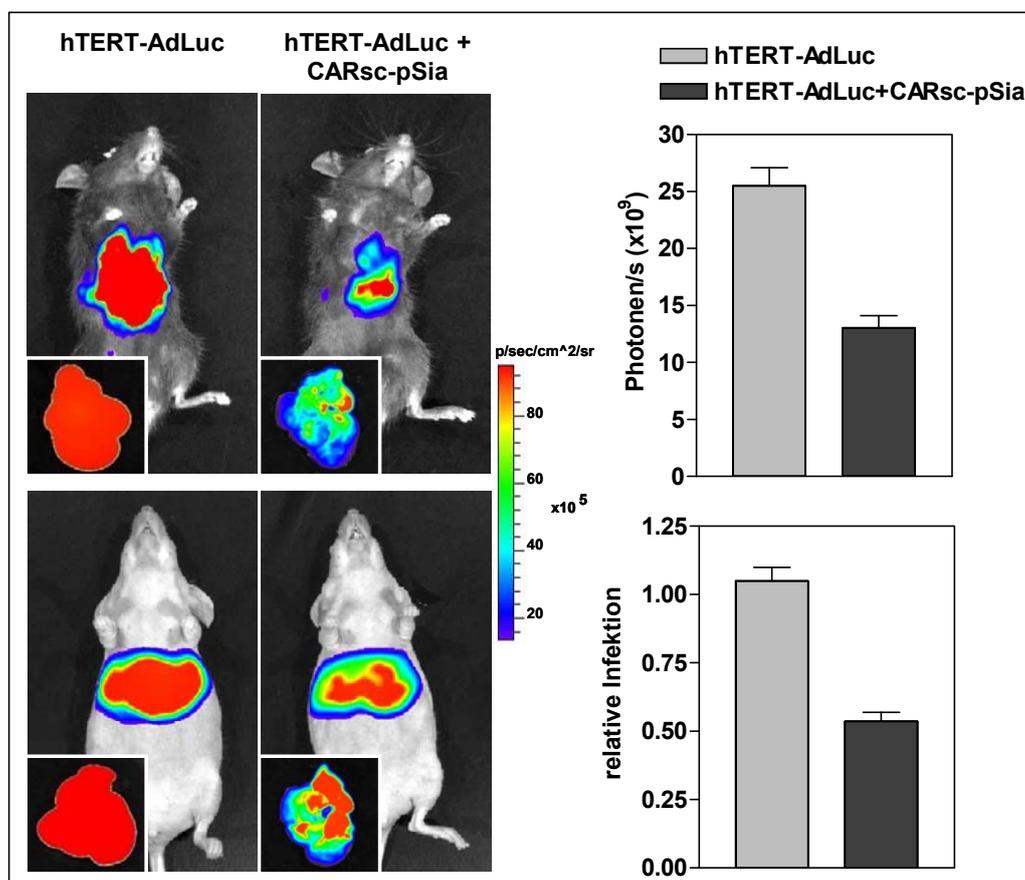
**Abbildung 14: Die Zugabe des Adapterproteins CARsc-pSia inhibiert konzentrationsabhängig die adenovirale Infektion CAR-positiver Zellen.**

Die Beschichtung von jeweils  $8 \times 10^6$  infektiösen Ad-LacZ-Partikeln mit den angegebenen Konzentrationen an CARsc-pSia-Adapter erfolgte für 40 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$ . Infiziert wurde die CAR-positive und PolySia-negative Zelllinie HepG2 für 20 Minuten. Als positive Infektionskontrolle diente ein Ansatz mit unbehandelten adenoviralen Partikeln. Gemessen wurde die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase aus Zellextrakt 48 Stunden nach der Infektion.

Die Inkubation mit unbeschichteten Ad-LacZ-Partikeln führt erwartungsgemäß zu einer effektiven, CAR-abhängigen Infektion der Zelllinie HepG2. Die Beschichtung der angegebenen Virusmenge mit  $5 \mu\text{g}$  aufgereinigten CARsc-pSia-Adapter zeigt schon einen deutlichen Rückgang der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Beim Einsatz von  $10 \mu\text{g}$  Adapterprotein wurde nur noch die Hälfte der Enzymaktivität des unbehandelten Infektionsansatzes detektiert. Bei Zugabe einer Menge von  $15 \mu\text{g}$  CARsc-pSia konnte eine erhebliche Abnahme der enzymatischen Aktivität auf etwa 10% des Ausgangsniveaus gemessen werden. Das Ergebnis verdeutlicht die effektive Inhibition der CAR-abhängigen, adenoviralen Infektion nach Beschichtung der eingesetzten Viren mit CARsc-pSia-Adapterproteinen. Die Erhöhung der Konzentration an Adapter resultiert in einer Verbesserung des Detargeting-Effektes. Eine ausreichende Menge an Adapter kann durch Bindung der viralen Knob-Domäne zu einer Maskierung der eingesetzten Ad-Luc-Partikel führen. Dieser Vorgang behindert die natürliche Interaktion der Adenoviren mit den CAR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und ist eine Erklärung für die beobachtete Inhibition der Infektion.

### 3.4.2 Hepatisches Detargeting *in vivo*

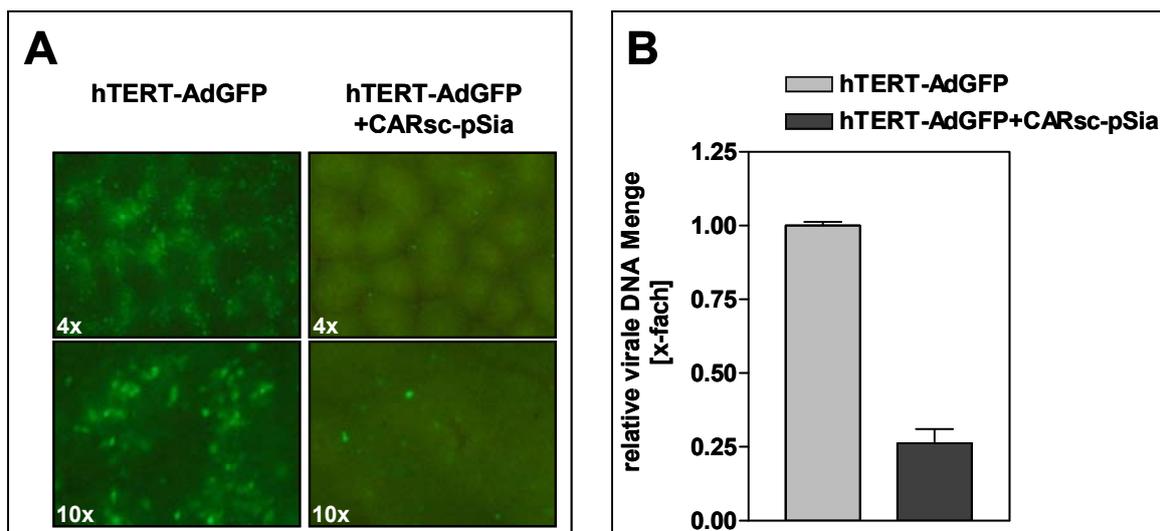
Unbehandelte Adenoviren weisen nach intravenöser Administration im Mausmodell einen extrem hohen Hepatropismus auf, was eine starke Infektion von Hepatozyten zur Folge hat. Die in der Zellkultur beobachtete Inhibition der CAR-abhängigen Infektion durch beschichtete Adenoviren wurde im Mausmodell anhand von Infektionsversuchen mit dem onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc untersucht. Nach intravenöser Administration unbehandelter und mit CARsc-pSia-beladener Partikel wurde die Infektionseffizienz in den Lebern der untersuchten Tiergruppen, wie in Abbildung 15 dargestellt, anhand der Luciferaseaktivität charakterisiert.



**Abbildung 15: Die Beschichtung onkolytischer Adenoviren mit dem Adapterprotein CARsc-pSia führt nach systemischer Applikation zu einem effektiven hepatischen Detargeting in Mäusen.**

C57 Bl/6- und NMRI nu/nu-Mäuse wurden jeweils  $8 \times 10^8$  infektiöse Partikel des Luciferase-exprimierenden, onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc intravenös appliziert. Die systemische Infektion erfolgte mit CARsc-pSia beschichteten und mit unbehandelten Adenoviren. Zwei Tage nach der Virusinjektion wurden die Mäuse nach intraperitonealer Gabe des Substrats D-Luciferin unter Narkose im IVIS untersucht. Repräsentativ dargestellt ist die *in vivo* Biolumineszenz in Mäusen und isolierten Lebern sowie die Quantifizierung der Luciferaseaktivität in den Lebern mittels Messung der Photonenermission.

Bedingt durch ihren natürlichen Hepatropismus, akkumulieren unbehandelte Adenoviren nach intravenöser Injektion bevorzugt in der Leber. Die daraus resultierende, effektive Transduktion von Hepatozyten wird in Abbildung 15 durch Darstellung einer hohen *in vivo* Biolumineszenz in lebenden Mäusen und explantierten Lebern verdeutlicht. Nach Beschichtung der Adenoviren mit Adapterproteinen konnte ein starker Rückgang der optisch dargestellten Luciferaseaktivität beobachtet werden. Die Messung der Photonenemission in explantierten Lebern zeigt eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität um etwa 50% in der Mausgruppe an, die mit CARsc-pSia-beladenen hTERT-AdLuc-Viren behandelt wurden. Zur Untersuchung der Veränderung des Hepatropismus durch den Adapter CARsc-pSia wurde in einem weiteren, analog dem zuvor beschriebenen durchgeführten Mausversuch das onkolytische Adenovirus hTERT-AdGFP eingesetzt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der infizierten Lebern und Ergebnisse zur Quantifizierung viraler DNA aus Lebergewebe werden in Abbildung 16 gezeigt.



**Abbildung 16: CARsc-pSia Adapterproteine inhibieren den natürlichen Tropismus adenoviraler Vektoren zu Hepatozyten.**

NMRI nu/nu-Mäuse wurden mit jeweils  $8 \times 10^8$  infektiösen hTERT-AdGFP-Partikeln, die das Reportergen GFP (*green fluorescent protein*) enthalten, intravenös behandelt. Die GFP-Expression in der Leber wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Organs 48 Stunden nach systemischer Applikation CARsc-pSia-beschichteter und unbehandelter Adenoviren untersucht (A). Die Isolierung der DNA aus Lebergewebe erfolgte sechs Stunden nach Behandlung der Mäuse mit unbeschichteten und CARsc-pSia-beschichteten Viren. Der Gehalt an viraler DNA wurde über spezifische Hexon Primer und Sonde mittels qPCR bestimmt und über zelluläre 18S DNA abgeglichen (B).

Die Expression des viralen Markergens GFP deutet auf eine effektive Infektion der Leber durch unbehandelte hTERT-AdGFP-Viren hin. Beim Betrachten der mikroskopischen Aufnahmen kann eine starke GFP-Expression in Hepatozyten in der unmittelbaren Umgebung

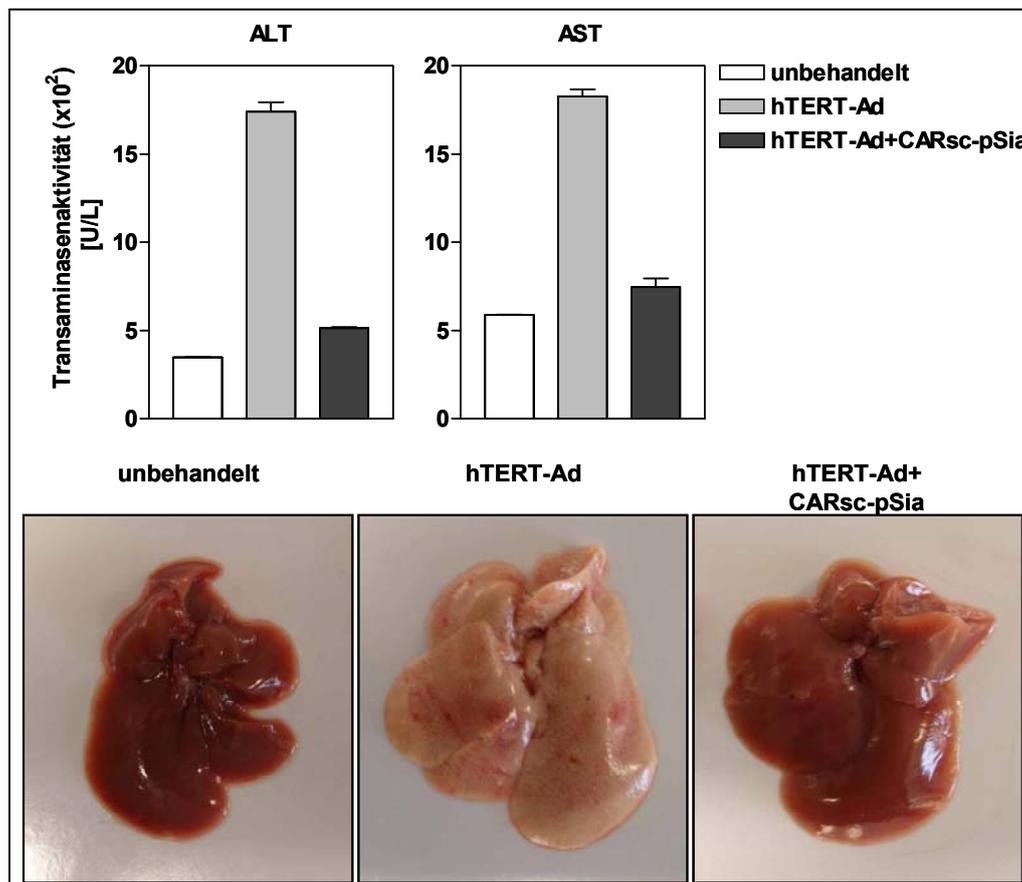
der periportalen Felder (Glisson'sche Trias) beobachtet werden. Da die adenovirale Infektion in Richtung der Zentralvene abschwächt, entsteht das in Abbildung 16A dargestellte typische hexagonale Infektionsmuster. Durch die Beschichtung der Adenoviren mit Adapterproteinen wird die Infektion der Leber nach systemischer Administration inhibiert. Dieses effektive, durch das Fusionsprotein CARsc-pSia-vermittelte Detargeting wird ebenfalls in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 16A anhand der stark abgeschwächten GFP-Expression belegt. Die in Abbildung 16B dargestellte Quantifizierung adenoviraler Hexon-DNA aus isolierter DNA der Leber bestätigt diese Beobachtung und korreliert mit dem in Abbildung 15 gemessenen Rückgang der Luciferaseaktivität. Nach Beschichtung adenoviraler Partikel mit CARsc-pSia wird im Vergleich zu Infektionsansätzen mit unbehandelten Viren nur noch ungefähr ein Viertel des relativen Gehaltes an viraler Hexon-DNA im Lebergewebe detektiert. In den durchgeführten Experimenten konnte nach Modifikation mit CARsc-pSia-Adapter eine deutliche Reduktion des adenoviralen Hepatropismus der eingesetzten onkolytischen hTERT-AdLuc- und hTERT-AdGFP-Partikeln *in vivo* nachgewiesen werden. Obwohl die adenovirale Infektion der Leber im Mausmodell auch durch andere Faktoren eingeleitet wird, kann das beobachtete Detargeting mit der Fähigkeit der Adapter, potentielle CAR-Bindestellen zu blockieren und dadurch die Rezeptor-vermittelte Infektion zu verringern, erklärt werden.

### 3.4.3 Untersuchungen zur Lebertoxizität

Die hohe Transduktionsrate des Lebergewebes nach systemischem Einsatz adenoviraler Vektoren kann einen dosisabhängigen, hepatotoxischen Effekt verursachen. Die Leberschädigung ist auf die direkte zytotoxische Wirkung replizierender Partikel und auf die induzierte antivirale Immunantwort zurückzuführen.

Wie zuvor beschrieben, konnte beim Einsatz Adapter-beschichteter Vektoren eine Reduktion der Leberinfektion beobachtet werden. Das hepatische Detargeting sollte auch eine Auswirkung auf die adenoviral induzierte Lebertoxizität aufweisen. Daraufhin wurde der toxische Effekt nach intravenöser Injektion unbehandelter und CARsc-pSia-beschichteter hTERT-Ad-Partikel in den Lebern immunkompetenter Mäusen untersucht. Der Grad der Leberschädigung 48 Stunden nach Virusgabe wird in Abbildung 17 durch Messung der Transaminasenaktivität aus Blutproben und durch Darstellung explantierter Organe angezeigt. Die stark erhöhte Aktivität der Aminotransferasen AST und ALT im Blutserum von Mäusen, die mit unbeschichteten Adenoviren behandelt wurden, deuten auf eine massive Leberschädigung durch die Zerstörung einer großen Anzahl von Leberzellen hin. Bei der

Auswertung entnommener Organe dieser Versuchsgruppe wird die ausgeprägte Lebertoxizität durch einen deutlichen sichtbaren Farbverlust des gesamten Organs dargestellt. Auch die intravenöse Applikation der gleichen Virusmenge CARsc-pSia beladener hTERT-Ad-Partikel führt zu einer signifikanten Erhöhung der AST- und ALT-Aktivität. Ein Vergleich der explantierten Lebern zeigt jedoch, dass das Ausmaß der Leberschädigung in diesem Infektionsansatz relativ gering ist. Mäuse ohne Virustherapie dienten als Kontrollgruppe und zeigten erwartungsgemäß einen unauffälligen Leberbefund ohne Hinweise auf toxische Effekte. Die Ergebnisse belegen, dass nach systemischer Applikation CARsc-pSia-beladener Ad5-Vektoren die durch das Virus ausgelöste Lebertoxizität stark reduziert wird. Im Rahmen einer systemischen Tumorthherapie mit CARsc-pSia-modifizierten, onkolytischen Adenoviren wäre nach den gewonnenen Erkenntnissen eine Erhöhung der Virusdosis durchaus möglich.



**Abbildung 17: Die Beschichtung mit dem Adapter CARsc-pSia verringert die adenoviral induzierte Lebertoxizität in Mäusen.**

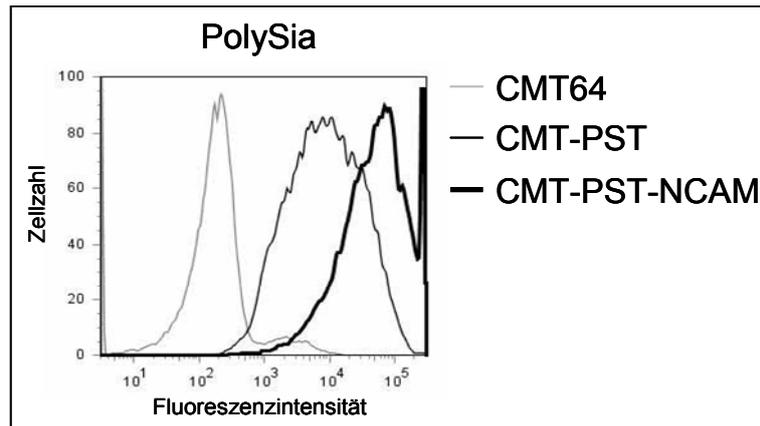
In Gruppen zu vier Tieren wurden C57/Bl6-Mäuse mit jeweils  $8 \times 10^8$  infektiösen Partikeln des replikativen Adenovirus hTERT-Ad in unbeschichteter und CARsc-pSia-beschichteter Form intravenös behandelt. 48 Stunden nach der systemischen Virusapplikation erfolgte zur Charakterisierung der Hepatotoxizität die Aktivitätsmessung der Aminotransferasen AST und ALT aus dem Blutserum der untersuchten Mäuse. Repräsentativ dargestellt sind auch explantierte Organe aus den jeweiligen Versuchsgruppen.

### 3.5 Untersuchungen zum spezifischen Retargeting im syngenem Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC)

Gezieltes Retargeting und Infektion solider Tumoren durch systemisch applizierte onkolytische Adenoviren wurde im Vorfeld an xenogenen, subkutanen Tumormodellen des humanen Rhabdomyosarkoms und des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms in immundefizienten Nacktmäusen gezeigt. Die durch den Adapter CARsc-pSia vermittelte, spezifische Infektion PolySia-exprimierender Tumoren sollte darüber hinaus auch in einem syngenem Tumormodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immunkompetenten Mäusen untersucht werden. Zur Etablierung syngener Tumorkolonien in der Lunge wurde die murine Zelllinie CMT64 ausgewählt, die ursprünglich aus einem spontan entstandenen, alveolaren Lungenkarzinom einer C57BL/129-SvEv-F1-Maus isoliert wurde und in der Literatur als Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms SCLC beschrieben ist (Franks *et al.*, 1976), (Alimonti *et al.*, 2000). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass in murinen CMT64-Zellen eine funktionierende Replikation und Propagation humaner Ad5-Vektoren stattfindet (Hallden *et al.*, 2003). Somit war die Möglichkeit gegeben, das spezifische Retargeting und die Therapie des SCLC durch CARsc-pSia-beschichtete, onkolytische Adenoviren in immunkompetenten Mäusen zu untersuchen.

#### 3.5.1 Charakterisierung und Modifikation der Zelllinie CMT64

In vorangegangenen adenoviralen Infektionsversuchen und FACS-Analysen konnte festgestellt werden, dass die Zelllinie CMT64 nicht die PolySia-Expression humaner polysialylierter Tumorzellen aufweist. Der niedrige PolySia-Status der Zellen ist auf einen Mangel an membrangebundenen NCAM-Proteinen oder auf eine fehlende Expression der für den Prozess der Polysialylierung benötigten Polysialyltransferasen zurückzuführen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde der Grad der Polysialylierung in CMT64 durch eine stabile Transduktion der murinen Polysialyltransferase PST (*alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 4*, ST8SiaIV) und des murinen NCAM-180 erneut charakterisiert. Dadurch sollte eine mit den zuvor untersuchten humanen Tumorzellen vergleichbare Expression von PolySia erreicht werden. Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Abbildung 18 dargestellt.

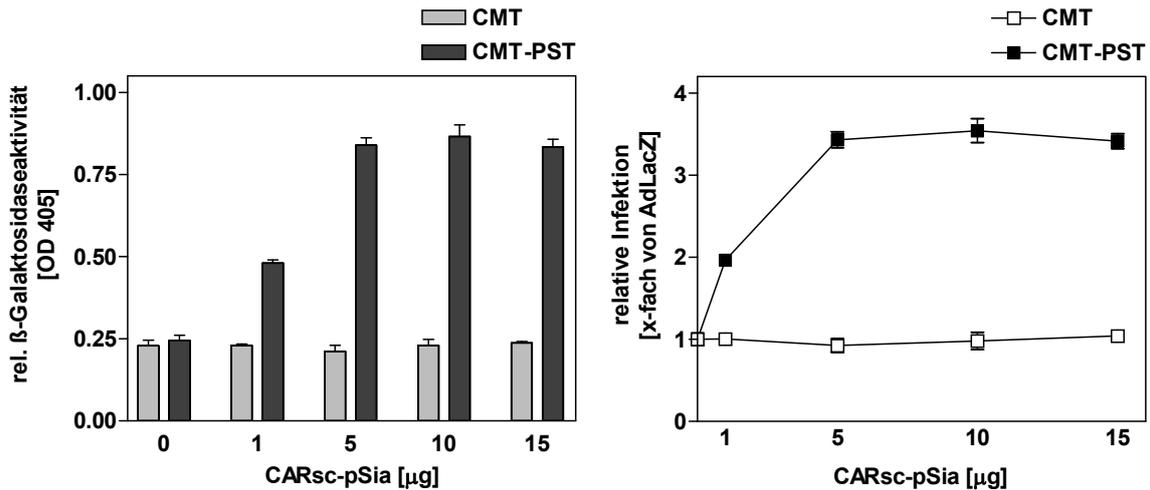


**Abbildung 18: Untersuchung zur Expression von PolySia in der Zelllinie CMT64 nach Transduktion der Polysialyltransferase PST und des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM-180**

CMT64-Zellen wurden mit den Expressionskassetten des murinen NCAM-180 oder der murinen PST retroviral transduziert. Nach stabiler Expression der integrierten Konstrukte wurde der PolySia-Status der Zellen in einer FACS-Analyse durch Detektion mit dem monoklonalen anti-PolySia Antikörper 735 untersucht.

Das dargestellte Histogramm verdeutlicht, dass die untersuchte Zelllinie CMT64 eine nur gering polysialylierte Oberfläche aufweist. Das alleinige Einschleusen von NCAM-180 Konstrukten führt nicht zu einer Erhöhung des PolySia-Niveaus der Zellen. Ein starker Anstieg von PolySia auf der Zelloberfläche von CMT64 kann jedoch nach retroviraler Transduktion der Expressionskassette des Enzyms PST nachgewiesen werden. Das Glykoprotein NCAM ist dementsprechend in CMT64-Zellen vorhanden, die membrangebundenen Proteine sind aber aufgrund der fehlenden Transferaseaktivität nicht polysialyliert. Erst durch die enzymatische Aktivität der eingeschleusten PST wird endogen exprimiertes NCAM durch Polysialylierung posttranslational modifiziert. Der höchste Grad an PolySia wurde nach stabiler Expression beider Komponenten auf der Oberfläche der untersuchten CMT64-Zellen detektiert. Die heterologe Expression der Transferase PST konnte somit als Schlüsselschritt für die Polysialylierung von CMT64-Zellen identifiziert werden. Für nachfolgende Versuche wurden PST-exprimierende CMT-PST-Zellen verwendet, da sie die erforderliche Veränderung gegenüber der Wildtypelinie CMT64 auf ein Minimum beschränken.

Anschließend wurde die PolySia-spezifische Infektion in CMT64- und PST-exprimierenden CMT-PST-Zellen untersucht. Nach Infektion mit CARsc-pSia-beschichteten und mit unbehandelten Ad-LacZ-Partikeln wurde die Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase aus Zellextrakt gemessen. Die Auswertung des Experiments ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: CARsc-pSia-vermittelte Infektion der Zelllinie CMT-PST nach stabiler Expression der Polysialyltransferase PST**

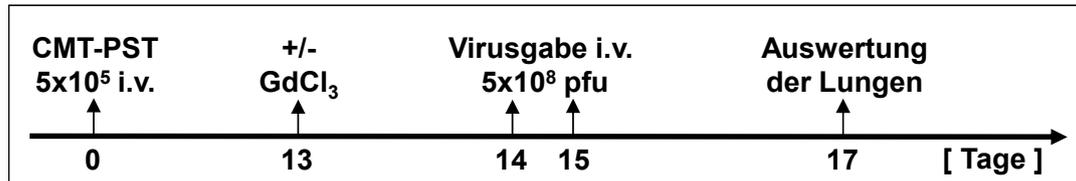
Die Zelllinien CMT64 und PST-exprimierende CMT-PST wurden mit  $8 \times 10^6$  infektiösen Partikel des Adenovirus Ad-LacZ für 20 Minuten inkubiert. Als Infektionsansatz wurden unbehandelte Viren und mit CARsc-pSia-Adapterproteinen in Konzentrationen von 1 µg, 5 µg, 10 µg und 15 µg beladene Viren verwendet. Die Messung der Aktivität des adenoviral eingeschleusten Enzyms β-Galaktosidase aus Zellextrakt erfolgte 48 Stunden nach Infektion.

Die adenovirale Infektion in der leicht permissiven Zelllinie CMT64 wird nach Beschichtung der Viren mit CARsc-pSia nicht verbessert. Aufgrund der geringen PolySia-Expression konnte in dieser Zelllinie auch nach Erhöhung der Konzentration an Adapter keine Steigerung oder Erniedrigung der Infektionseffizienz im Vergleich zu unbehandelten Adenoviren detektiert werden. Dagegen steigt in der Zelllinie CMT-PST die Enzymaktivität der eingeschleusten β-Galaktosidase nach Infektion mit beladenen Adenoviren mit zunehmender Menge an eingesetzten Adapterproteinen. Ein Sättigungseffekt wird ab einem Einsatz von 5 µg CARsc-pSia bei einer 3,5-fachen Erhöhung der Infektionseffizienz verzeichnet.

### 3.5.2 Spezifisches Retargeting onkolytischer Adenoviren zu Lungenkolonien im Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms

Die erfolgreiche Transduktion und stabile Expression der Polysialyltransferase PST ermöglicht das spezifische Retargeting CARsc-pSia-beschichteter Adenoviren zu polysialylierten CMT-PST-Zellen. Da nach erfolgtem Retargeting auch eine Propagation humaner Adenoviren in dieser Zelllinie möglich ist, wurden CMT-PST-Zellen zur Etablierung eines syngen SCLC Modells in den Lungen immunkompetenter C57/Bl6-Mäusen verwendet. Durch intravenöse Verabreichung von  $5 \times 10^5$  vereinzelt CMT-PST-Zellen wurde das Anwachsen von einzelnen Tumorknoten des kleinzelligen Lungenkarzinoms induziert.

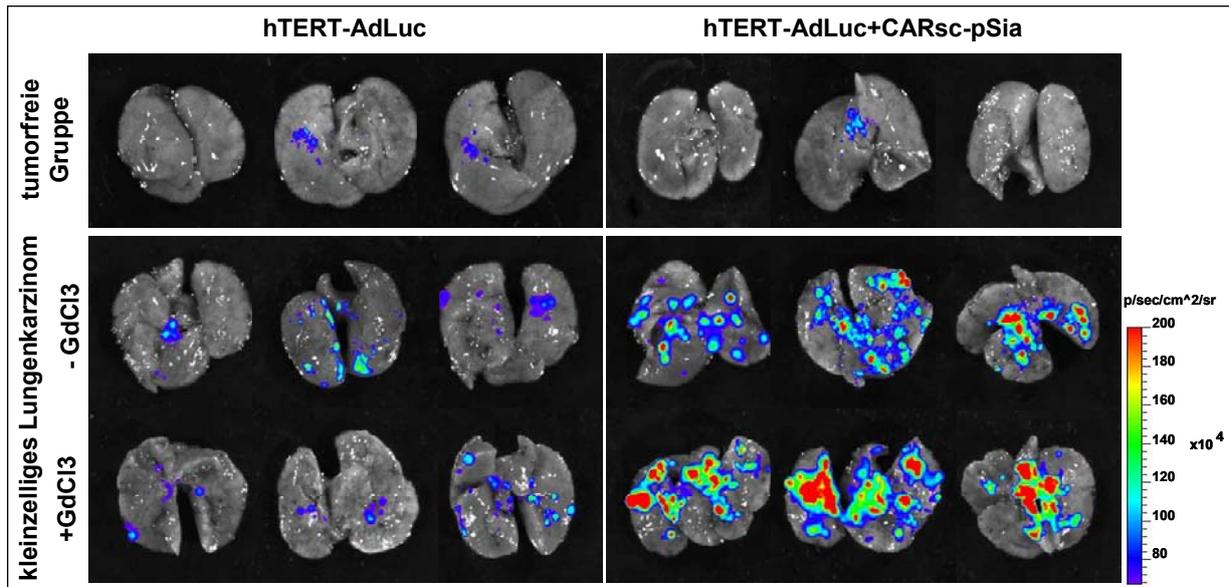
Die injizierten Zellen siedeln sich in der Lunge der Maus an und können innerhalb weniger Tage schnell wachsende Tumoren ausbilden. Untersuchungen zur gezielten Infektion polysialylierter Kolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms wurden mit den onkolytischen Adenoviren hTERT-AdLuc und hTERT-AdGFP durchgeführt. Es ist bekannt, dass nach einer systemischen Applikation ein erheblicher Anteil aller injizierten Ad5-Vektoren beim Passieren der Leber von der dort sesshaften Makrophagenpopulation, den sogenannten Kupffer-Zellen, aufgenommen und neutralisiert wird (Alemany *et al.*, 2000). Zur Messung des spezifischen Retargetings von Tumorzellen ist das Vorhandensein eines gewissen Titers von Adenoviren vorteilhaft. Um eine zur Detektion ausreichende Viruslast und eine gewisse Persistenz der Vektoren zu gewährleisten, kann ihre Aufnahme und Degradation durch ein selektives Ausschalten der Kupffer-Zellen unterbunden werden. In nachfolgenden Experimenten wurde die selektive Depletion der Kupffer-Zellen durch eine einmalige Injektion von  $\text{GdCl}_3$  30 Stunden vor der Virusgabe in den Versuchsmäusen eingeleitet. Untersuchungen zur Darstellung des PolySia-spezifischen Retargetings onkolytischer Adenoviren zu etablierten CMT-PST-Lungenkolonien wurde daraufhin im Tierversuch nach folgendem Zeitschema durchgeführt:



**Abbildung 20: Zeitschema zur Untersuchung des PolySia-spezifischen Retargetings onkolytischer Adenoviren zu syngenem Lungentumoren im Mausversuch**

Zur Etablierung von syngenem Tumorkolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms wurden immunkompetenten Mäusen  $5 \times 10^5$  vereinzelte CMT-PST-Zellen intravenös verabreicht. Zur gezielten Infektion der Lungentumore erfolgte die systemische Applikation CARsc-pSia-beladener, onkolytischer Adenoviren jeweils an Tag 14 und Tag 15 nach Zellgabe. Als Vergleichsgruppe wurden Mäuse mit unbeschichteten Adenoviren gleicher Menge behandelt. Die Depletion der Kupffer-Zellen in einer Gruppe der Versuchsmäuse wurde durch eine Injektion  $\text{GdCl}_3$  30 h vor der ersten Virusgabe durchgeführt. 48 h nach der letzten Virusgabe wurden die Lungen der behandelten Versuchstiere ausgewertet.

Die CARsc-pSia-vermittelte Infektion polysialylierter Tumorzellen in der Lunge wurde zunächst mit dem onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc untersucht. In Abbildung 21 sind explantierte Lungen von Mäusen der untersuchten Gruppen nach Messung im IVIS angezeigt.



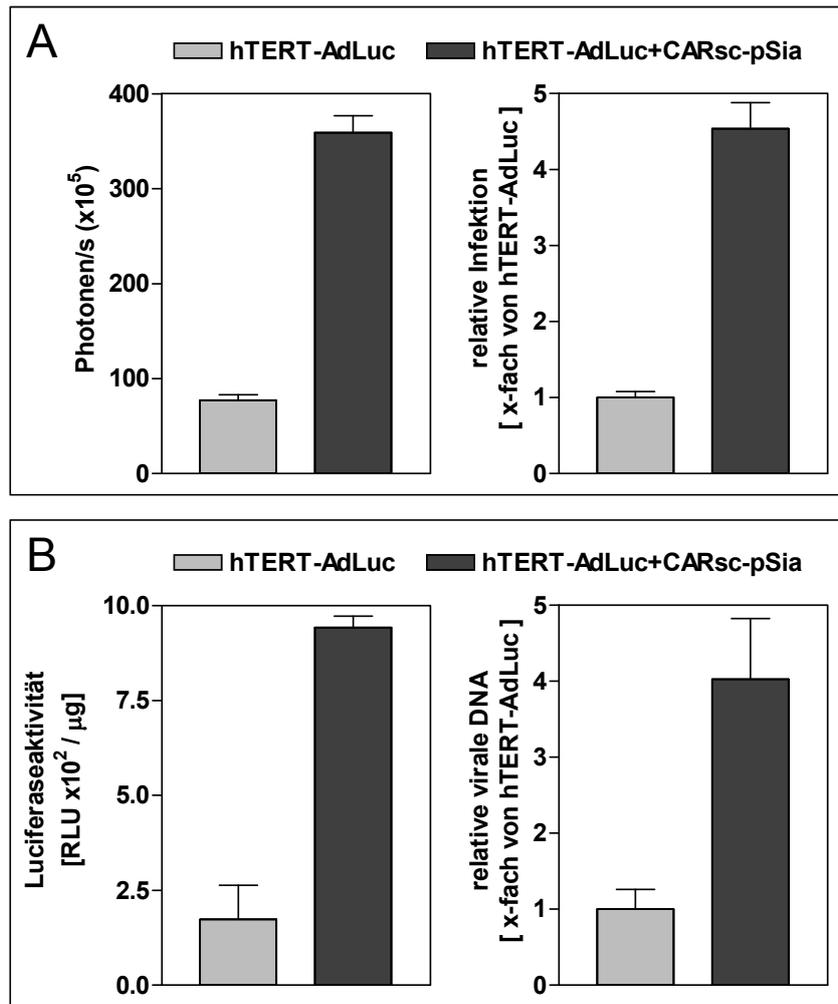
**Abbildung 21: Der bispezifische Adapter CARsc-pSia ermöglicht spezifisches Retargeting onkolytischer Adenoviren zu syngenem Kolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms**

Die systemische Applikation von  $5 \times 10^8$  infektiösen Partikel des Luciferase-exprimierenden, onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc erfolgte jeweils an Tag 14 und Tag 15 nach Etablierung der Lungenkolonien. Dabei wurden unbehandelte und mit CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren eingesetzt. Zur Depletion der Kupffer-Zellen erfolgte die intravenöse Injektion von  $GdCl_3$  30 h vor der Virusgabe. Als direkte Kontrolle dienten tumorfreie Mäuse, denen jeweils beide adenoviralen Infektionsansätze injiziert wurden. In allen Gruppen wurde den Mäusen 48 h nach der zweiten Virusgabe das Substrat Luciferin intraperitoneal verabreicht. Infizierte Bereiche in den isolierten Lungen werden nach Messung im IVIS durch Darstellung der Biolumineszenz angezeigt.

Nach systemischer Applikation des Luciferase-exprimierenden Adenovirus hTERT-AdLuc wird die Aktivität des Enzyms in infizierten Bereichen der explantierten Lungen durch eine qualitative Darstellung der Biolumineszenz veranschaulicht. Wie in Abbildung 21 dargestellt, kann eine effektive Infektion verschiedener Lungenbereiche lediglich in denjenigen Mäusen detektiert werden, die mit CARsc-pSia-beschichteten hTERT-AdLuc-Viren behandelt wurden. Adenoviral infizierte Lungenareale sind hier teilweise voneinander abgegrenzt und durch eine starke Biolumineszenz dargestellt. Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit  $GdCl_3$  unterstützt diesen gezielten Infektionsprozess. In Mäusen mit selektiv depletierten Kupffer-Zellen konnte nach Applikation beschichteter Adenoviren die Infektionseffizienz des Lungengewebes gesteigert werden. Das wird in dieser Gruppe durch die Detektion großflächigerer Lumineszenzareale gleicher Intensität in den Lungen dargestellt. Isolierte Lungen aus Mäusen, die mit unbeschichteten adenoviralen Partikeln behandelt wurden, zeigen dagegen nur eine sehr geringe Aktivität der viral eingeschleusten Luciferase. Dies lässt sich sowohl bei Mäusen mit zuvor depletierten, als auch mit nicht depletierten Kupffer-Zellen beobachten. Die wenigen, vereinzelt lumineszierenden Bereiche in den Lungen dieser

Gruppen sind auf eine schwache, PolySia-unabhängige Infektion zurückzuführen. Diese unspezifischen Infektionsherde sind durch eine sehr geringe Biolumineszenz wiedergegeben. Als zusätzliche Kontrollgruppe wurden tumorfreie C57/Bl6-Mäuse ausgewählt, die mit jeweils beschichteten und unbeschichteten hTERT-AdLuc-Viren zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt wurden. In dieser Kontrollgruppe konnte nach Applikation beider adenoviraler Infektionsansätze keine Biolumineszenz in den explantierten Lungen beobachtet werden. Die dargestellten Ergebnisse deuten an, dass es nach einer systemischen Applikation in geringem Ausmaß auch zu einer unspezifischen Infektion im Lungengewebe oder in den etablierten CMT-PST-Lungenmetastasen kommen kann. Eine genaue histologische Einordnung der infizierten Bereiche in den Lungen erlauben die in Abbildung 21 dargestellten Lumineszenzaufnahmen jedoch nicht.

Zusätzlich zur qualitativen Darstellung der Biolumineszenz wurden noch weitere Methoden zur genauen Quantifizierung des infizierten Lungengewebes durchgeführt. Zum einen wird die Aktivität der eingeschleusten Luciferase anhand der Photonenemission in lumineszierenden Arealen der in Abbildung 21 dargestellten gesamten Lungen gemessen. Das Ergebnis dieser Messung und die daraus resultierenden Unterschiede in der Infektion sind in Teil A der Abbildung 22 angezeigt. Des Weiteren sind in Abbildung 22B die Quantifizierung der Luciferaseaktivität und der Gehalt an adenoviraler DNA aus Gesamthomogenat der untersuchten Lungen abgebildet. Für die angegebenen Untersuchungen wurde Lungengewebe aus Versuchsmäusen mit depletierten Makrophagen verwendet.



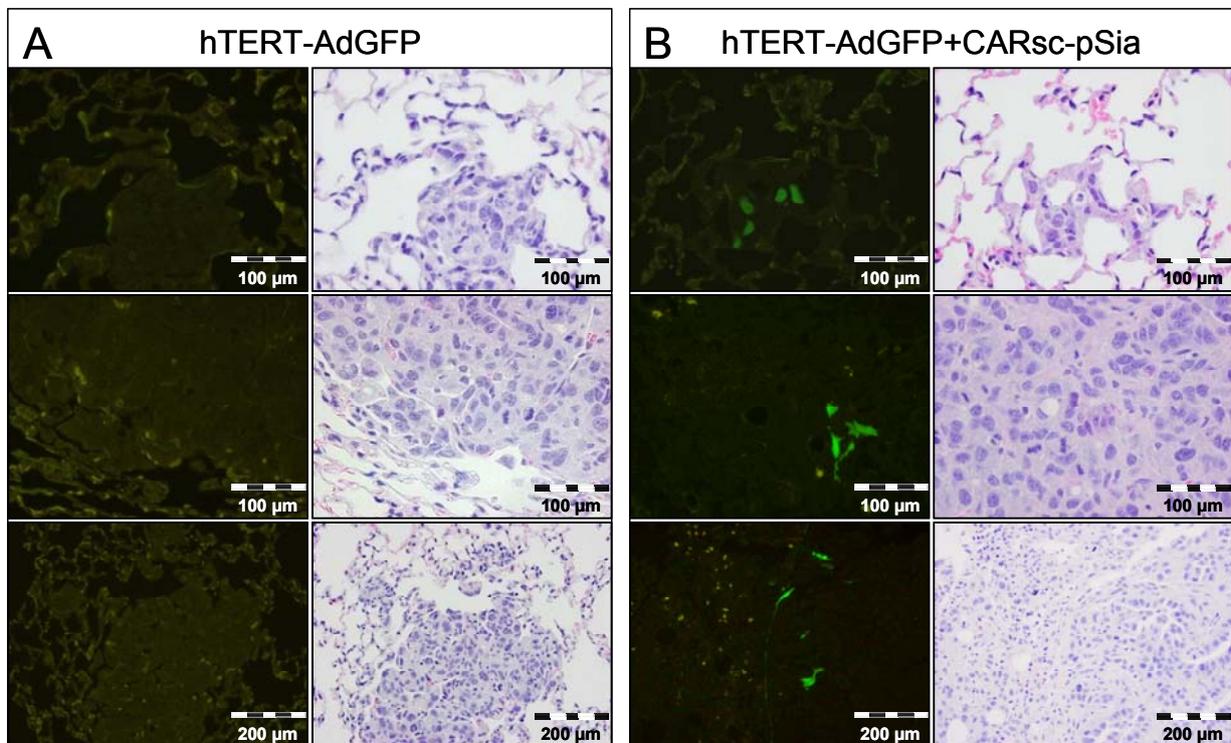
**Abbildung 22: Darstellung des CARsc-pSia-vermittelten Retargetings zu Lungenkolonien durch Quantifizierung der Luciferaseaktivität und Bestimmung der adenoviralen DNA aus isolierten Lungen**

Die Messung der Photonenemission lumineszierender Lungenareale in explantierten Lungen erfolgte im IVIS 48 h nach der zweiten systemischen Applikation des onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc (A). Zur Quantifizierung der Enzymaktivität mittels Luciferaseassay wurde ein Gesamtextrakt der untersuchten Lungen verwendet. Der relative Gehalt adenoviraler DNA wurde aus Gesamt-DNA der homogenisierten Lungen bestimmt. Der Abgleich erfolgte über zelluläre 18S-DNA (B).

Die Quantifizierung lumineszierender Bereiche in den untersuchten Lungen zeigt eine deutlich höhere Photonenemission in den Lungen der Mäuse an, die mit CARsc-pSia-beschichteten hTERT-AdLuc-Viren behandelt wurden. Der gemessene Wert in Abbildung 22A entspricht einer mehr als vierfachen Erhöhung der Biolumineszenz im Vergleich zu den Lungen der Mäuse, denen unbehandelte Adenoviren appliziert wurden. Dieses Ergebnis wird durch die Aktivitätsmessung der Luciferase aus Lungenextrakt und die Detektion adenoviraler Hexon-DNA aus isolierter DNA der Lunge in Abbildung 22B untermauert. In beiden durchgeführten Messungen konnten sowohl eine vierfach höhere Luciferaseaktivität als auch ein vierfach höherer Gehalt an adenoviraler DNA in den Lungen nach systemischer Infektion

mit beschichteten Adenoviren detektiert werden. Die Korrelation aller erhaltenen Messergebnisse verdeutlicht, dass die Vorbehandlung onkolytischer Adenoviren mit dem bispezifischen Adapterprotein CARsc-pSia eine spezifische Infektion PolySia-exprimierender Lungenschnitte ermöglicht.

In einem weiteren Versuchsansatz zur direkten Darstellung der spezifischen Infektion polysialylierter Lungenschnitte des gleichen Tumormodells wurde das onkolytische Adenovirus hTERT-AdGFP verwendet. Die Expression des adenoviralen Markergens GFP erlaubt eine eindeutige Zuordnung des infizierten Lungengewebes. Infizierte Tumorzellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms sind in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Lungenschnitten in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Darstellung der gezielten Infektion von CMT-PST-Lungenschnitten durch CARsc-pSia-beschichtete, onkolytische hTERT-AdGFP-Viren.**

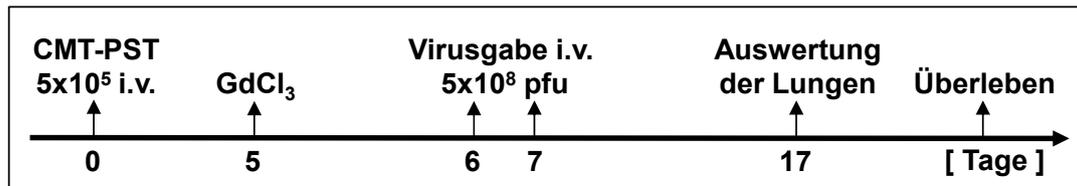
Nach Etablierung der Kolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms erfolgte die systemische Administration von jeweils  $5 \times 10^8$  infektiösen Partikel des onkolytischen Adenovirus hTERT-AdGFP. Appliziert wurden an Tag 14 und Tag 15 unbehandelte und mit dem Adapter CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren. 48 h nach der zweiten Virusgabe wurden zur histologischen Versuchsauswertung Lungenschnitte angefertigt. Die gezielte Infektion von Lungenschnitten ist in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Lungenschnitten wiedergegeben. Zur besseren Veranschaulichung sind H&E-gefärbte Histologien der gleichen Schnittbereiche dargestellt.

Nach einer systemischen Applikation unbehandelter adenoviraler Partikel sind nahezu keine infizierten Tumorzellen in den Lungenschnitten zu erkennen. In den Lungen von Versuchstieren, die mit CARsc-pSia-modifizierten Adenoviren behandelt wurden, konnten hingegen Infektionsereignisse in CMT-PST-Tumoren unterschiedlicher Größe detektiert werden. Der Vergleich identischer Lungenbereiche nach H&E-Färbung und nach Darstellung im Fluoreszenzmikroskop lässt erkennen, dass die Expression des adenoviral eingeschleusten Markers GFP ausschließlich in angewachsenen Lungentumoren detektiert wird. Eine Infektion von gesundem Lungengewebe lässt sich weder durch unbehandelte, noch durch CARsc-pSia-beschichtete hTERT-AdGFP-Partikel nach intravenöser Injektion beobachten. Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei den in Abbildung 21 gezeigten, lumineszierenden Bereichen in den explantierten Lungen um hTERT-AdLuc-infizierte CMT-PST-Lungentumoren handelt.

In den dargestellten Ergebnissen wird verdeutlicht, dass das bispezifische Adaptermolekül CARsc-pSia auch im syngenem Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms die gezielte Infektion etablierter Tumorzellen durch systemisch applizierte Adenoviren vermittelt.

### **3.5.3 Untersuchungen zur Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immunkompetenten Mäusen**

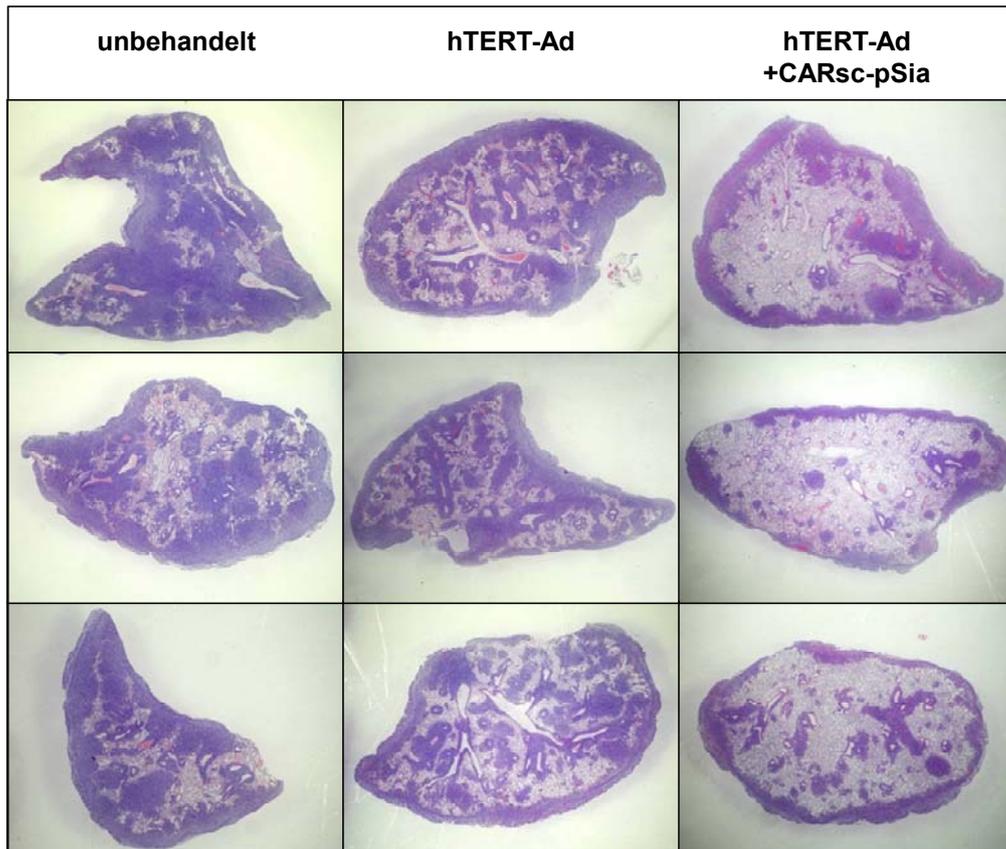
Wie zuvor gezeigt, führt effektives Retargeting onkolytischer Adenoviren durch den Adapter CARsc-pSia zu der selektiven Infektion polysialylierter Tumoren. In den Kapiteln 3.3.1 und 3.5.2 wird erläutert, dass CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren in der Lage sind, solide, subkutane Tumoren und auch multilokuläre Lungentumoren selektiv zu infizieren. Die therapeutische Wirksamkeit onkolytischer Adenoviren nach ihrer Beschichtung mit dem Adapter CARsc-pSia wurde daraufhin an dem syngenem CMT-PST-Tumormodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immunkompetenten C57/Bl6-Mäusen untersucht. Als direkte Vergleichsgruppe wurden Mäuse mit unbeladenen Adenoviren als Therapieansatz behandelt. Nach Etablierung von CMT-PST-Lungenkolonien erfolgte der Therapieversuch nach folgendem Zeitschema:



**Abbildung 24: Versuchsaufbau zur Therapie von CMT-PST-Lungentumoren durch CARsc-pSia-beschichtete Adenoviren im immunkompetenten Mausmodell**

Lungenkolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms wurden durch eine intravenöse Gabe von  $5 \times 10^5$  CMT-PST-Zellen in immunkompetenten Mäusen etabliert. 30 h vor der ersten Applikation des therapeutischen Adenovirus hTERT-Ad wurden die Mäuse zur Depletion der Kupffer-Zellen mit einer einmaligen Injektion  $GdCl_3$  behandelt. Zur Therapie der etablierten Lungenkolonien wurden an den Tagen 6 und 7 jeweils  $5 \times 10^8$  mit CARsc-pSia-beschichtete oder unbeschichtete infektiöse Partikel intravenös verabreicht. Zur histologischen Auswertung erfolgte am Tag 17 die Entnahme der Lungen. Im Überlebensversuch wurde das Experiment bei erkennbarer Belastung der Tiere aufgrund des schnellen Wachstums der Lungentumoren nach festgelegten Kriterien beendet.

Zur Untersuchung einer adenoviralen Therapie des SCLC-Tumormodells erfolgte wie im Versuchsaufbau beschrieben sechs Tage nach Injektion der CMT-PST-Zellen die systemische Applikation des selektiv replizierenden, onkolytischen Adenovirus hTERT-Ad (Wirth *et al.*, 2003). In Gruppen zu sechs Tieren wurden C57/Bl6-Mäuse jeweils mit unbeladenen und mit CARsc-pSia-beladenen Partikeln behandelt. Als Kontrollgruppe dienten Versuchstiere ohne Virustherapie. Eine Steigerung der Infektion polysialylierter Tumorzellen durch CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren konnte nach selektiver Depletion der Kupffer-Zellen in Mäusen (Kap. 3.5.2, Abbildung 21) erreicht werden. Daraufhin wurde zur Verbesserung des Therapieeffektes Versuchstieren 30 Stunden vor Beginn der Virotherapie  $GdCl_3$  injiziert. Die Viruslast in den behandelten Tieren beider Gruppen wurde zusätzlich durch eine zweite hTERT-Ad-Injektion der gleichen Virusmenge an Tag 7 erhöht. Zur histologischen Auswertung erfolgte die Entnahme der Lungen adenoviral therapierter Versuchstiere der verschiedenen Gruppen an Tag 17 nach Applikation der Tumorzellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine beginnende Verschlechterung des Zustands einiger Tiere der nicht therapierten Versuchsgruppe festgestellt werden. In Abbildung 25 sind Lungenhistologien der unbehandelten Kontrollgruppe, sowie der mit unbeschichteten und CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren behandelten Mausgruppen im Überblick dargestellt.



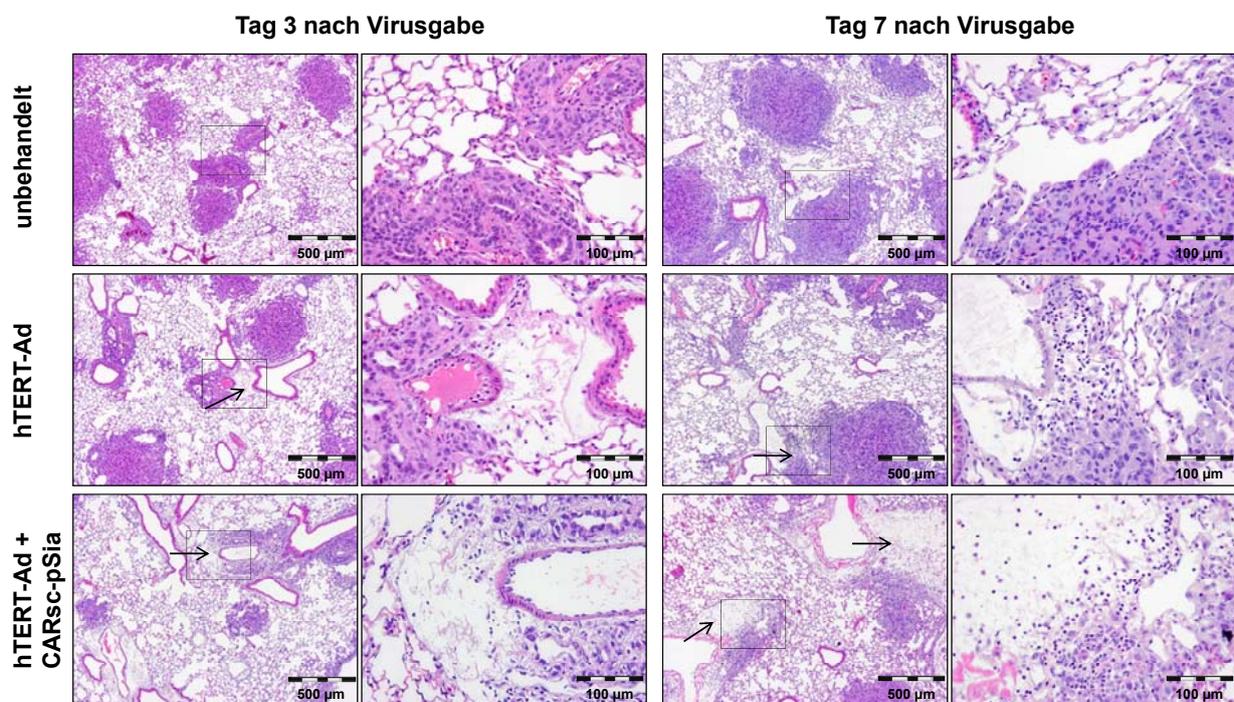
**Abbildung 25: Inhibition des Tumorwachstums nach Virotherapie mit CARsc-pSia-beladenen onkolytischen Adenoviren im syngenem Tumormodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms**

Lungen der untersuchten Mausgruppen wurden an Tag 17 nach intravenöser Applikation von  $5 \times 10^5$  CMT-PST-Zellen entnommen. Zur Darstellung der Tumorkolonien wurden Paraffinschnitte der isolierten Lungen angefertigt, die anschließend einer H&E-Färbung unterzogen wurden. Makroskopischen verglichen werden repräsentative Lungenschnitte aus zwei Therapieversuchen mit jeweils sechs Tieren.

In den dargestellten Lungenhistologien sind erhebliche Unterschiede zwischen den untersuchten Mausgruppen erkennbar. In der virusfreien Kontrollgruppe haben sämtliche Tiere innerhalb der kurzen Zeitspanne von 17 Tagen nach intravenöser Verabreichung der CMT-PST-Zellen in der gesamten Lunge Zellkolonien ausgebildet, was auf den malignen Charakter der kleinzelligen Lungenkarzinomlinie zurückzuführen ist. Die Behandlung der Mäuse mit zwei Injektionen unbeladener hTERT-Ad-Partikel zeigte eine geringe therapeutische Wirksamkeit. Im Vergleich zur Tumorgöße in den Kontrollmäusen, lässt sich in dieser Gruppe eine geringe Abnahme des Umfangs der zahlreich vorhandenen Lungenkolonien erkennen. Besonders die Randbereiche des Lungengewebes sind mit einer homogenen Schicht Tumorzellen bewachsen. Ein signifikanter Rückgang von CMT-PST-Lungenkolonien kann jedoch in den Lungen der Mausgruppe beobachtet werden, die eine Virotherapie mit CARsc-pSia-komplexierten, onkolytischen Adenoviren bekommen hat. In

den Lungenschnitten dieser Gruppe ist eine Regression der Tumorkolonien weitestgehend innerhalb des Lungenepithels erkennbar. Beim Betrachten der Lungenhistologien fällt auch hier auf, dass die Ränder der Lungen, ähnlich wie in den anderen Gruppen, fast vollständig mit Tumorzellen ausgekleidet sind. Die Randbereiche des Lungenepithels werden demzufolge durch systemisch applizierte Adenoviren nicht in dem Maße infiziert, um einen therapeutischen Effekt auslösen zu können.

In einer weiteren Versuchsreihe zur Charakterisierung der adenoviral induzierten Tumorreduktion wurden Lungenhistologien zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Ein repräsentativer Vergleich der nach zuvor beschriebenem Versuchsaufbau behandelten Tiergruppen an Tag 3 sowie eine Woche nach systemischer Virusapplikation wird in Abbildung 26 gezeigt.



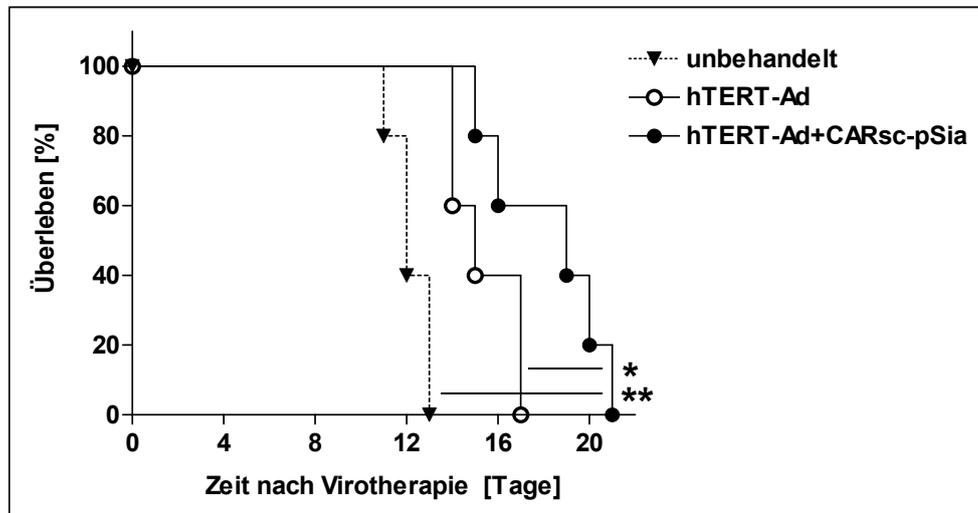
**Abbildung 26: Die Infektion von CMT-PST-Lungentumoren durch CARsc-pSia-modifizierte Adenoviren verursacht Tumorlyse und Infiltration von Leukozyten in immunkompetenten Mäusen.**

C57/Bl6-Mäuse wurden nach zuvor beschriebenem Therapieschema behandelt. Lungen der verschiedenen Tiergruppen wurden drei Tage sowie eine Woche nach systemischer Virusapplikation entnommen. Zur histologischen Auswertung wurden Lungenschnitte mit anschließender H&E-Färbung angefertigt. Dargestellt sind repräsentative, mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Versuchsgruppen.

In den histologischen Lungenschnitten im linken Teil der Abbildung 26 sind adenoviral infizierte Bereiche als kleine, lysierte Flächen dargestellt, die drei Tage nach der Zellinfektion aufgrund des fortgeschrittenen Replikationszyklus der Viren entstehen. Die beobachtete

Zelllyse innerhalb der etablierten Tumorkolonien ist nur in adenoviral therapierten Tieren aufzufinden. In Lungenhistologien von Mäusen, die mit unbeschichteten Partikeln behandelt wurden, können vereinzelte Lysebereiche mit geringem Umfang detektiert werden. Diese Beobachtung kann damit begründet werden, dass die Zelllinie CMT-PST im geringen Maße auch für unbeschichtete adenovirale Vektoren permissiv ist. Nach Administration CARsc-pSia-beschichteter Adenoviren wird die spezifische Infektionsrate polysialylierter CMT-PST-Zellen jedoch gesteigert. In den Lungen dieser Versuchsgruppe sind im Durchschnitt größere, lysierte Areale innerhalb der Tumorkolonien auffindbar. In lysierten Tumorflächen beider adenoviral therapierten Versuchsgruppen sind zudem auch Leukozyten detektierbar, die teilweise auch nicht zerstörte Bereiche des Tumors infiltrieren. Eine Woche nach intravenöser Injektion der Viren können ebenfalls lysierte Tumorbereiche in den Lungen der untersuchten Mäuse beobachtet werden. Wie im rechten Teil der Abbildung 26 dargestellt, sind die zerstörten Areale innerhalb der kleinzelligen Karzinomkolonien deutlich größer und weisen eine höhere Anzahl an infiltrierenden Leukozyten auf. Der effektivste Rückgang von Tumorzellen konnte auch zu diesem Zeitpunkt in den Lungen von Mäusen beobachtet werden, die zur Therapie mit CARsc-pSia-modifizierten Adenoviren behandelt wurden. In den Lungen der unbehandelten Kontrollgruppe sind weder drei Tage nach Virusgabe, noch zu dem späteren Zeitpunkt der Untersuchung virusbedingte, lysierte Bereiche innerhalb der Tumorkolonien erkennbar.

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Inhibition des rapiden Wachstums syngener CMT-PST-Lungenkolonien nur durch eine adenovirale Infektion von Tumorarealen innerhalb der Lungen initiiert wird. Eine dafür ausreichende Infektion wird nur erreicht, wenn therapeutische Partikel vor ihrer Applikation mit CARsc-pSia-Adapter beladen werden. Diese Beobachtung wurde bereits in den Abbildungen 21 und 23 dargestellt und bestätigt erneut, dass bispezifische CARsc-pSia-Adapter eine gezielte Infektion polysialylierter Tumorzellen nach spezifischem Retargeting ermöglichen. Die Effektivität der onkolytischen Tumorthherapie durch Adenoviren im Tumormodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms wird anhand einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier in Abbildung 27 angezeigt.



**Abbildung 27: Überlebenskurve immunkompetenter Mäuse mit kleinzelligem Lungenkarzinom nach Virotherapie mit CARsc-pSia-beladenen und unbeladenen onkolytischen Adenoviren**

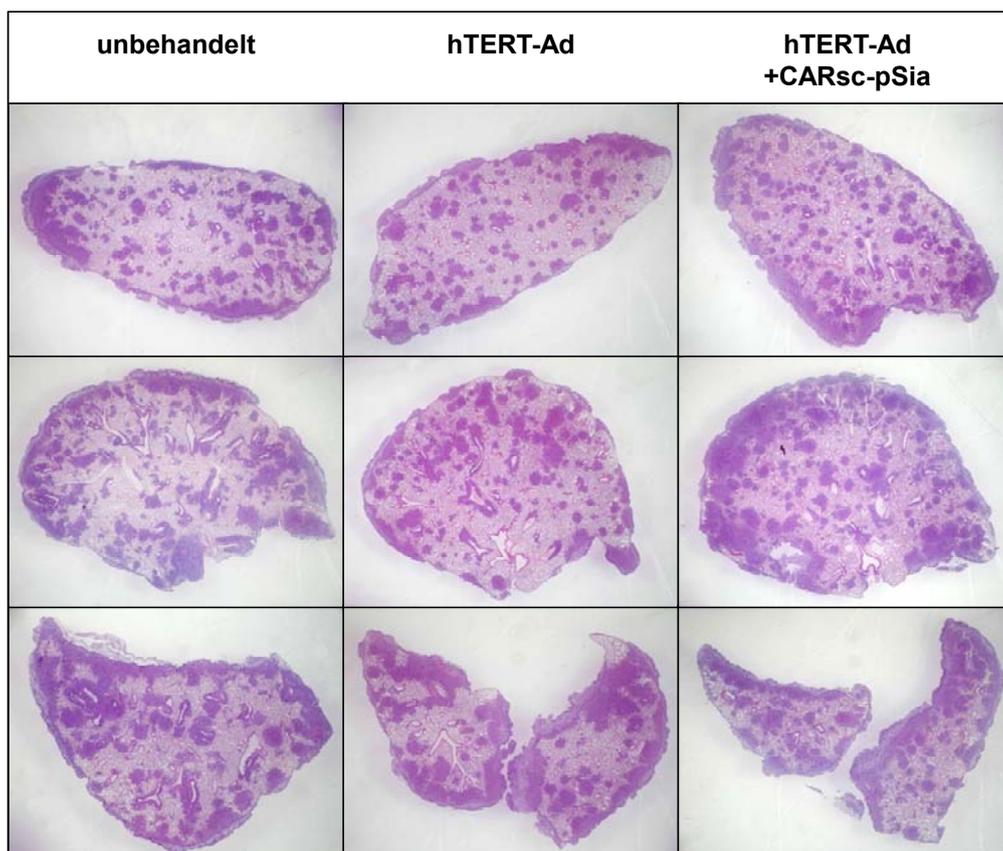
Etablierung der CMT-PST-Lungenkolonien, zeitlicher Verlauf der Virotherapie sowie das Beenden des Überlebensversuches wurden nach den angeführten Parametern des Versuchsaufbaus in Abbildung 24 für Tiere sämtlicher Gruppen durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde durch einen Logrank-Test ermittelt (\*P = 0,0477, \*\*P= 0,0026).

Durch die therapeutische Behandlung mit onkolytischen Adenoviren konnte die Lebenserwartung von Mäusen mit etablierten CMT-PST-Lungenkolonien gesteigert werden. Versuchstiere der unbehandelten Kontrollgruppe wurden aufgrund der tumorbedingten Belastung zu den angegebenen Zeiten getötet. Nach einer adenoviralen Behandlung mit unbeschichteten Partikeln verlängerte sich der Zeitraum bis zur tumorbedingten Verschlechterung des Zustands der Tiere um durchschnittlich drei Tage. Eine signifikant höhere Überlebensrate wurde bei Mäusen festgestellt, die mit CARsc-pSia beschichteten Adenoviren therapiert wurden. Der durch die effektive adenovirale Infektion eingeleitete Rückgang von Tumorkolonien in dieser Gruppe ermöglichte eine Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse um durchschnittlich sechs Tage.

### 3.5.4 Untersuchungen zur Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immundefizienten Mäusen

Die im vorherigen Abschnitt dargestellte spezifische Infektion von Lungentumoren durch CARsc-pSia-modifizierte Adenoviren führt zu einem verlängerten Überleben im immunkompetenten Mausmodell. Die beobachtete Infiltration von Leukozyten in lysierten Tumorarealen könnte darauf hinweisen, dass neben der viralen Onkolyse durch die fortschreitende Virusreplikation womöglich auch immunologische Aspekte für die Tumorlyse

verantwortlich sind. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde ein Therapieversuch mit immundefizienten Nacktmäusen (NMRI nu/nu) durchgeführt. Nacktmäuse sind athymisch und haben aufgrund fehlender reifer T-Lymphozyten ein stark eingeschränktes Immunsystem. Die Etablierung von CMT-PST-Lungentumoren, die Behandlung mit  $GdCl_3$  und die systemische Applikation unbehandelter sowie CARsc-pSia-beschichteter hTERT-Ad-Viren in den jeweiligen Tiergruppen wurde analog dem in Abbildung 24 beschriebenen Versuchsschema durchgeführt. Erste Anzeichen für einen Abbruch des Therapieversuches aufgrund der Verschlechterung des Zustands der Tiere in sämtlichen untersuchten Versuchsgruppen deuteten sich bereits an Tag 16 nach Applikation der CMT-PST-Zellen an. Zur Anfertigung von Lungenhistologien erfolgte daraufhin zu diesem Zeitpunkt die Entnahme der Organe. Angefärbte Lungenschnitte der untersuchten Versuchsgruppen sind in Abbildung 28 im Überblick abgebildet.

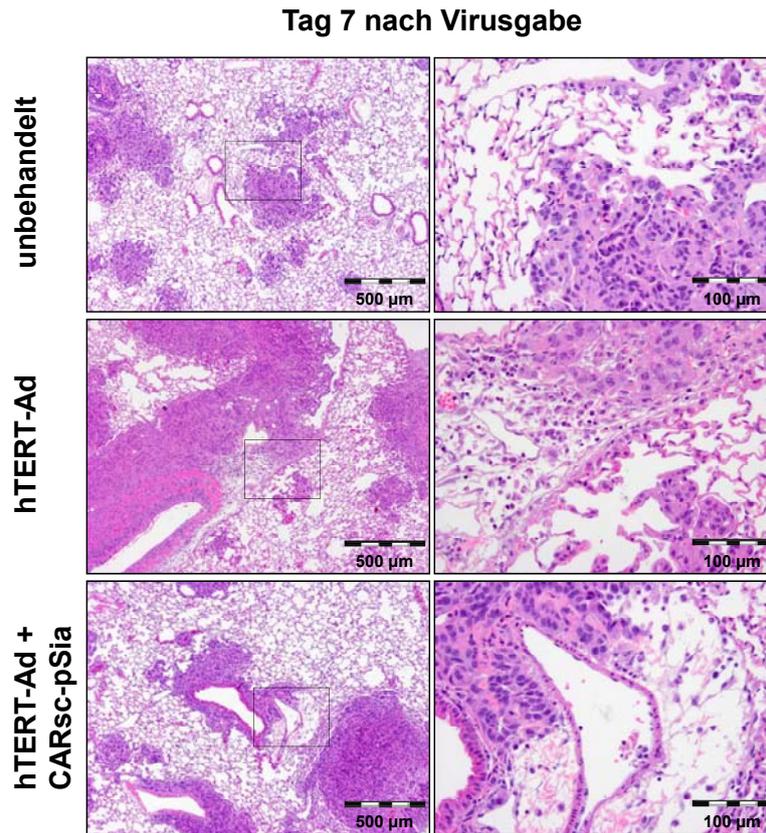


**Abbildung 28: Die virale Therapie mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren führt nicht zu einer Inhibition des Tumorwachstums in immundefizienten Mäusen.**

NMRI nu/nu-Mäuse wurden in Gruppen zu jeweils sechs Tieren nach dem in Abbildung 24 beschriebenen Therapieschema behandelt. Die Isolierung der Lungen erfolgte an Tag 16 nach intravenöser Applikation der CMT-PST-Zellen. Zur histologischen Auswertung wurden Paraffinschnitte der Lungen mit anschließender H&E-Färbung angefertigt. Zum makroskopischen Vergleich sind repräsentative Lungenschnitte der untersuchten Tiergruppen dargestellt.

Nach histologischer Auswertung der dargestellten Lungenschnitte sind makroskopisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Unbehandelte Kontrolltiere, sowie mit unbeschichteten und CARsc-pSia-modifizierten Adenoviren therapierte Tiere weisen alle in Bezug auf Größe und Verteilung eine vergleichbar starke Tumormasse in der ganzen Lunge auf. Die nach einer Virotherapie mit Adapter beladenen Adenoviren erzielte Regression von CMT-PST-Tumoren in immunkompetenten Mäusen konnte in diesem Versuchsansatz nicht beobachtet werden. Nach therapeutischer Behandlung mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren konnte kein Rückgang der Lungentumoren in immundefizienten Tieren verzeichnet werden.

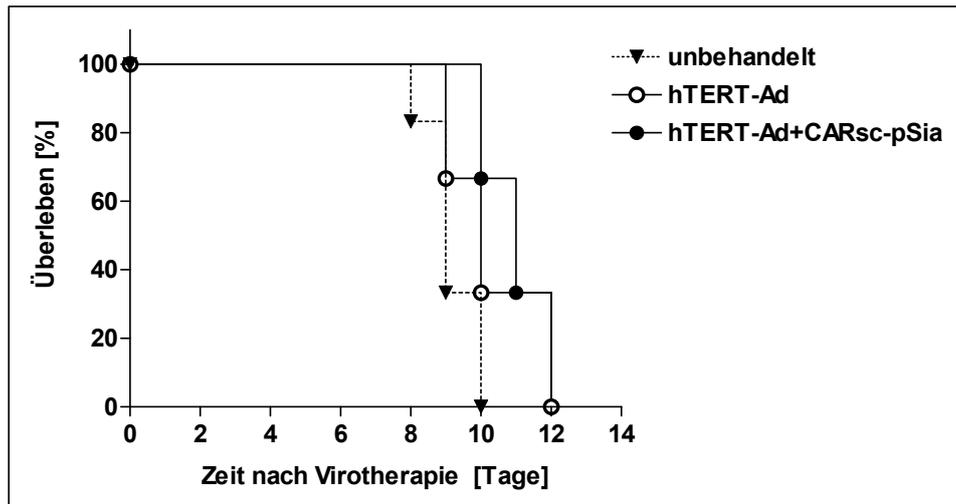
Zur Untersuchung infizierter Tumorbereiche innerhalb des Lungenepithels wurden daraufhin eine Woche nach Virustherapie Lungenschnitte aus isolierten Organen von nicht therapierten Kontrolltieren, sowie von Mäusen, die mit CARsc-pSia-beschichteten oder unbeschichteten Adenoviren therapiert wurden, angefertigt. Die in Abbildung 29 abgebildeten Histologien erlauben den direkten Vergleich mit Lungenschnitten aus den zuvor untersuchten immunkompetenten Versuchstieren. In Lungenhistologien von unbehandelten Kontrolltieren konnte nach mikroskopischer Auswertung keine adenoviral bedingte Lyse innerhalb der zahlreichen Tumoren entdeckt werden. Nach systemischer Applikation unbeschichteter Partikel sind in Nacktmäusen vereinzelt lysierte Flächen innerhalb der Tumorkolonien erkennbar. Die Anzahl der Lysebereiche in den etablierten CMT-PST-Tumoren konnte nach Behandlung der Mäuse mit CARsc-pSia-komplexierten Adenoviren leicht gesteigert werden. Die beobachteten Lyseareale in beiden therapierten Gruppen haben jedoch einen geringen Umfang und sind mit lysierten Tumorflecken aus immunkompetenten Mäusen vergleichbar, die an Tag 3 nach Virusapplikation detektiert wurden. Großflächige Lyseareale innerhalb der Lungentumoren, wie zuvor bei therapierten immunkompetenten Tieren dargestellt, konnten sieben Tage nach Virustherapie mit unbeschichteten und CARsc-pSia-modifizierten adenoviralen Vektoren in Nacktmäusen nicht beobachtet werden. Die Anzahl an infiltrierenden Immunzellen in lysierten Tumorbereichen ist in Nacktmäusen auch eine Woche nach Virusgabe erwartungsgemäß sehr gering. Die dargestellte Tumorumlösung in immundefizienten Tieren ist demnach nur auf virale Replikation zurückzuführen.



**Abbildung 29: Darstellung infizierter Tumorbereiche nach systemischer Virotherapie mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren in immundefizienten Mäusen**

Lungen der nach in Abbildung 24 beschriebenen Therapieschema behandelten NMRI nu/nu-Mäusen wurden eine Woche nach systemischer Virusapplikation entnommen. Die angefertigten Lungenschnitte wurden zur histologischen Auswertung H&E gefärbt. Dargestellt sind repräsentative, mikroskopische Aufnahmen der untersuchten Versuchsgruppen.

Im Rahmen der durchgeführten onkolytischen Virotherapie bei immundefizienten Tieren mit CMT-PST-Lungentumoren wurde eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier erstellt, die in Abbildung 30 angezeigt ist. Eine tumorbedingte Verschlechterung des Zustands der Tiere, die zum Beenden des Überlebensversuches veranlasst hat, wurde bei Mäusen aller untersuchten Versuchsgruppen innerhalb einer kurzen Zeitperiode festgestellt. Verglichen mit nicht therapierten Kontrolltieren, konnte keine Verlängerung der Überlebenszeit von Nacktmäusen nach systemischer Virotherapie mit unbeschichteten und CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren beobachtet werden.



**Abbildung 30: Überlebenskurve immundefizienter Mäuse mit kleinzelligem Lungenkarzinom nach Virotherapie mit CARsc-pSia-beladenen und unbeladenen onkolytischen Adenoviren**

Der Überlebensversuch mit NMRI nu/nu-Mäusen wurde nach dem in Abbildung 24 beschriebenen Therapieschema durchgeführt. Die Überlebenskurven der untersuchten Versuchsgruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede.

Die zuvor dargestellte Infektion einzelner Tumorbereiche durch CARsc-pSia-modifizierte Adenoviren und auch durch unbeladene Partikel reicht demnach nicht aus, um eine Inhibition des Tumorstwachstums oder sogar eine Reduktion der Lungentumoren in Nacktmäusen zu bewirken.

Die aus den Kapiteln 3.5.3 und 3.5.4 gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Zerstörung des Tumorgewebes nicht nur auf virusvermittelter Lyse und dem unmittelbaren Einfluss der angeborenen Immunantwort beruht, sondern dass auch adaptive Immunprozesse eine wichtige Rolle spielen.

## 4 Diskussion

Trotz signifikanter Fortschritte im Verständnis der Biologie von Tumoren in den letzten Jahrzehnten sind die meisten hochmalignen Tumorerkrankungen nach wie vor mit einer schlechten Prognose der betreffenden Patienten assoziiert. Die Tendenz zur Metastasierung und die im Behandlungsverlauf mögliche Entstehung resistenter Tumorzellen erhöhen das Risiko der Ausbildung eines Rezidivs und verhindern langfristig eine kurativ erfolgreiche Therapie. Unter den Lungentumoren gilt insbesondere das schnell wachsende kleinzellige Lungenkarzinom als extrem therapieresistent, was die Entwicklung neuer Therapieoptionen dringend erforderlich macht. Zur Behandlung von soliden Tumoren wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom stellt der Einsatz tumor-spezifisch replizierender Viren eine vielversprechende innovative Therapiestrategie dar. Die onkolytische Virotherapie beruht auf der selektiven Zerstörung der Tumorzellen durch die virale Replikation und die virusvermittelte Zelllyse, wobei ein besonderer Vorteil in der Tatsache begründet ist, dass sich das therapeutische Agens im Tumor vermehrt und sich innerhalb des Tumorgewebes verbreitet. Dabei gelten tumor-spezifisch replizierende Adenoviren aufgrund erster klinischer Erfahrungen mit dem onkolytischen Vektor Onyx-015 als relativ sicher anwendbar (Aghi *et al.*, 2005). In den letzten Jahren hat sich zunehmend die Erkenntnis durchgesetzt, dass die therapeutische Wirkung des Einsatzes onkolytischer Viren in der Tumorthherapie nicht nur auf der replikationsvermittelten Zelllyse (der eigentlichen Onkolyse) beruht, sondern im Rahmen der Immunantwort gegen das therapeutische Virus auch eine signifikante Immunantwort gegen den Tumor provoziert wird. Die quantitative Bedeutung dieser beiden antitumoralen Wirkmechanismen, Onkolyse bzw. antitumorale Immunantwort, für das Gesamtansprechen virotherapeutischer Ansätze ist derzeit ein zentrales Diskussionsthema (Prestwich *et al.*, 2009). Ein Manko der adenoviralen Onkolyse ist derzeit nach wie vor die unzureichende Infektion von Tumorgewebe nach systemischer Injektion, die nicht nur auf der mangelnden Expression der primären Virusrezeptoren auf der Tumorzelloberfläche, sondern auch auf dem dominanten Hepatotropismus der Viren beruht, der keine Applikation hoher Virusdosen zulässt, ohne die Leber erheblich zu belasten. Der Tumortropismus adenoviraler Vektoren muss daher auf Kosten des Hepatotropismus verbessert werden. Eine solche Tropismusmodifikation (transduktionelles Retargeting) stellt nicht nur eine möglichst selektive Infektion des Tumorgewebes durch systemisch applizierte Vektoren dar, sondern auch einen wichtigen Schlüsselschritt zur gezielten Infektion und Bekämpfung von Mikrometastasen.

Verschiedene Strategien im Rahmen des transduktionellen Retargetings ermöglichen eine Tropismusmodifikation, können eine selektive Infektiositätssteigerung im Tumorzielgewebe durch adenovirale Vektoren erzielen und auf diese Weise zur Optimierung der onkolytischen Virotherapie beitragen. Eine vielseitige Methode des gezielten Retargetings ist der Einsatz bispezifischer Fusionsproteine. Hierbei werden eine tumoraffine und eine Viruscapsid-bindende Domäne zu einem löslichen Protein fusioniert, das anhand der beiden Erkennungsspezifitäten die Funktion eines Adapters zwischen Virus und Zielzelle einnimmt. Diese Modifikation verändert den Tropismus der eingesetzten Vektoren in zweierlei Hinsicht. Bislang verfügbare Studien zu bispezifischen Adaptern deuten daraufhin, dass derart ‚beschichtete‘ adenovirale Partikel nicht nur in der Lage sind an die entsprechenden Zielstrukturen auf Zelloberflächen zu binden und diese effektiver infizieren können, sondern zudem durch Maskierung der natürlichen Tropismusedeterminanten einen geringeren Hepatropismus aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Beschichtung onkolytischer Adenoviren das bispezifische Adaptermolekül CARsc-pSia generiert. Die Eigenschaften dieses Fusionsproteins, bestehend aus der Ektodomäne des Adenovirus-bindenden Rezeptors CAR und einer PolySia-bindenden scFv-Domäne, eine selektive und therapeutisch wirksame Infektion PolySia-exprimierender Tumorspezies durch onkolytische Adenoviren zu gewährleisten, wurde *in vitro* und in verschiedenen Tumormodellen *in vivo* untersucht.

#### **4.1 Charakterisierung des bispezifischen Adapters CARsc-pSia**

Die Modifikation adenoviraler Vektoren durch bispezifische Fusionsproteine hat sich als ein vielversprechender Mechanismus des gezielten Retargetings herausgestellt. Die Wirksamkeit solcher Adaptermoleküle konnte erfolgreich in diversen Studien zur selektiven Transduktion von Tumorzellen gezeigt werden (Li *et al.*, 2009), (Kashentseva *et al.*, 2002). Um eine zellspezifische Infektion durch Adenoviren erfolgreich zu vermitteln, müssen bispezifische Moleküle grundlegende Eigenschaften erfüllen. Adapterproteine sollten in hohen Mengen produziert und unter Bewahrung ihrer stabilen Struktur aufgereinigt werden können. Die Fähigkeit adenovirale Vektoren zu binden und gleichzeitig ihren natürlichen Tropismus zu inhibieren sowie einen neuen Tropismus durch die Erkennung definierter Zielfaktoren zu schaffen stellen weitere wichtige Kriterien dar.

Die Spezifität der Adapter für malignes Gewebe wird durch scFv-Antikörperfragmente erreicht, die tumorspezifische Oberflächenantigene erkennen und binden. Die Fusion mit

anderen Domänen erlaubt die Kopplung der scFv-Fragmente an adenovirale Vektoren. Hierzu können zum einen ebenfalls sc-Fv-Fragmente, die gegen Komponenten des viralen Capsids gerichtet sind, zur Generierung sogenannter Diabodies eingesetzt werden. Als ein weiterer Mechanismus zur Bindung des viralen Capsids ist die natürliche Interaktion des adenoviralen Fiberknobs mit dem Rezeptor CAR prädestiniert. Als virusbindende Komponente wurde die CAR Ektodomäne zur Generierung bivalenter Adapter erstmalig von Dmitriev *et al.* in einer Studie zur gezielten Transduktion EGFR-exprimierender Zellen eingesetzt (Dmitriev *et al.*, 2000). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die CAR-unabhängige Aufnahme adenoviraler Vektoren in Zellen durch den Einsatz der bifunktionellen Moleküle CAR<sub>ex</sub>-Tat und CAR<sub>ex</sub>-VP22, die neben der CAR-Ektodomäne die polykationischen Proteintransduktionsdomänen (aus HIV-Tat bzw. HSV-VP22) beinhalten, untersucht. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung dieser Adapter eine effektive Transduktion von Tumorzellen erlaubt, denen eine Expression des CAR-Rezeptors fehlt und die unter natürlichen Bedingungen nicht infizierbar sind (Kuhnel *et al.*, 2004). Zur Konstruktion des Fusionsproteins CARsc-pSia wurde infolgedessen auch die lösliche Form der CAR-Ektodomäne als fiberbindende Komponente ausgewählt. Die selektive Bindung des Adapters an polysialylierte Oberflächen wurde durch das Anfügen eines scFv-Fragments aus dem PolySia-spezifischen, monoklonalen Antikörper mAB 735 gewährleistet. ScFv-Fragmente enthalten die gesamte antigenbindende Region des ursprünglichen Antikörpers und besitzen dadurch auch die gleiche Bindungsaffinität (Glockshuber *et al.*, 1990). Eine kurze Peptidsequenz zwischen den beiden variablen Antikörperdomänen V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> dient als stabilisierendes Verbindungsstück und unterstützt diese Eigenschaft. Bei der Klonierung des PolySia-bindenden scFv-Fragments wurde zu diesem Zweck ein Linkerpeptid verwendet, das in der Literatur gut charakterisiert ist (Huston *et al.*, 1988).

Die Tatsache, dass die Expression von PolySia in Gewebsarten, die mit Integrinexpression Grundvoraussetzungen für eine Adenovirusinfektion aufweisen, lediglich auf ein klinisch-hochrelevantes Tumorspektrum eingeschränkt ist, macht diesen Tumormarker zu einem äußerst attraktiven Angriffsziel für onkolytische Retargetingstrategien. Oberflächenfaktoren, die in den bislang existierenden Studien als Zielstruktur für Retargetingstudien ausgewählt wurden, wie EGFR oder CEA, werden auf Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe lediglich vermehrt exprimiert. Im Gegensatz hierzu kann die Expression von PolySia auf normalen epithelialen Zellen im adulten Organismus gar nicht nachgewiesen werden, sodass es sich hier um einen Zelloberflächenmarker handelt der hinsichtlich adenoviraler Retargetingstrategien eine echte Tumorselektivität aufweist.

Untersuchungen zur Funktionalität und Spezifität des generierten Adapterproteins CARsc-pSia wurden zunächst anhand von Infektionsversuchen in Zelltypen verschiedenen Ursprungs durchgeführt, die eine PolySia-Expression aufwiesen, aufgrund von CAR-Defizienz kaum adenoviral transfizierbar sind, allerdings grundsätzlich die Fähigkeit aufweisen, Adenoviren Integrin-vermittelt aufzunehmen. Wie in Abb.6 gezeigt wird, resultiert die Beschichtung adenoviraler Vektoren mit CARsc-pSia zu einer sehr effektiven Transduktion der PolySia-exprimierenden Hamsterzelllinie CHO (*chinese hamster ovary*). Für den stringenten Nachweis der PolySia-Abhängigkeit des Infektionsprozesses wurde die PolySia-defiziente Mutante 2A10 der CHO-Zellen eingesetzt. In dieser Zelllinie konnte keinerlei Verbesserung der Infizierbarkeit durch CARsc-pSia beobachtet werden, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass der Adapter über die Bindung an PolySia auf der Oberfläche der Zielzelle den Infektionsprozess einleitet. Die hypothetische Möglichkeit, dass die 2A10-Zellen durch Mutationen eine prinzipiell schlechtere Infizierbarkeit durch Adenoviren aufweisen könnten als die maternale Vergleichszelle, konnte durch die effektive adenovirale Transduktion der 2A10-Zellen mithilfe des rezeptorunspezifischen Adapters CAR-Tat ausgeschlossen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Beschichtung von Adenoviren mit CARsc-pSia die effektive Infektion von PolySia-exprimierenden humanen Rhabdomyosarkom- bzw. Neuroblastomzelllinien (TE671, IMR32) ermöglichte, die für die Infektion mit unbeschichteten Viren kaum bzw. gar nicht permissiv sind. Die Funktionstestung erfolgte mit monomeren Adapter und bestätigte vorerst grundlegende Parameter der Zielsetzung wie Expressionsfähigkeit der bispezifischen Moleküle, erfolgreiche Beschichtung der Vektoren und PolySia-spezifische Infektion der Zielzellen (Abb.5, Abb.6 und Abb.7). Die Expression der Moleküle in retroviral hergestellten Produktionszelllinien ermöglichte eine effektive Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und nachfolgende Untersuchungen zur bivalenten Bindungseffizienz. Durch den Einsatz definierter Mengen an CARsc-pSia konnte eine optimale Infektionseffizienz bei einem errechneten Verhältnis von  $10^4$  Adaptermolekülen pro Fibrknobmolekül beobachtet werden. Dieser für eine optimale Infektion benötigte deutliche Überschuss könnte unter anderem auf einen teilweisen Verlust der strukturellen Identität der einzelnen Domänen des Adapters zurückzuführen sein. Die Integrität beider Domänen ist ein ausschlaggebender Faktor für eine erfolgreiche Beschichtung der Vektoren und die effiziente Bindung an die Zielzellen. Die *in-vitro*-Expression, der Prozess der Proteinaufreinigung an einer Festphasenmatrix, sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen können zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität und Stabilität der funktionellen Domänen der CARsc-pSia-Moleküle führen. Auf solche Einflüsse weisen frühere Experimente der

Arbeitsgruppe hin, in denen zur unspezifischen Transduktion von Zielzellen mittels CAR<sub>ex</sub>-Tat bzw. CAR<sub>ex</sub>-VP22 ebenfalls deutliche Adapter-Überschüsse nötig waren, die jedoch eine Grössenordnung niedriger lagen als im Fall von CARsc-pSia. Für die Bindungsaffinität von scFv-Domänen wie in CARsc-pSia ist die korrekte Faltung der Tertiärstruktur absolut essentiell, was eine grössere Empfindlichkeit von CARsc-pSia im Vergleich zu den Tat/VP22-Derivaten erklären könnte, bei denen es sich um extrem unempfindliche Strukturen handelt. Ein weiterer Hinweis auf die erhöhte Empfindlichkeit der scFv-Domäne ist der komplette Funktionsverlust des Adapters durch die affinitätschromatographische Aufreinigung, wenn der His-Tag am C-Terminus des Moleküls in unmittelbarer Nachbarschaft der scFv-Domäne positioniert wurde.

In analogen Transduktionsversuchen mit ähnlich aufgebauten, bispezifischen CAR-scFv-Adapterproteinen wurden monomere und trimerisierungsfähige Moleküle bezüglich ihrer Bindungsaffinität miteinander verglichen. Dabei konnte eine erhebliche Steigerung der Bindungseffizienz trimerisierter Adapter zu adenoviralen Fiberknobs gezeigt werden (Kashentseva *et al.*, 2002). Die festgestellte Verbesserung der Affinität zu Fiberknob durch trimere Strukturen kann auf die Stöchiometrie der nativen CAR-Knob-Komplexierung zurückgeführt werden. Mithilfe von Strukturanalysen des Proteinkomplexes Fiberknob mit der CAR-Ektodomäne und durch Mutagenesestudien der Knobdomäne, konnte die simultane Bindung von drei CAR-Molekülen an eine Knobdomäne postuliert werden, was die Affinität im Vergleich zu einem einfachen CAR-Knob-Komplex beträchtlich erhöhen würde (Bewley *et al.*, 1999), (Roelvink *et al.*, 1998). Der Mechanismus einer trimeren Rezeptor-Ligand-Interaktion wurde durch Studien zur Kinetik der Bindung von CAR zum Knobprotein von Adenoviren des Serotyps 2 bestätigt (Lortat-Jacob *et al.*, 2001). Um eine bestmögliche Wirksamkeit des in Rahmen dieser Arbeit verfolgten Retargetingkonzepts in Bezug auf die herausfordernden Bedingungen von Transduktionsstudien *in vivo* erzielen zu können, wurde die Übertragbarkeit des Trimerisierungskonzepts auf den Adapter CARsc-pSia untersucht. Die Inkorporation der Trimerisierungsdomäne des Phagenproteins Fibrin in CARsc-pSia erwies sich hierbei als deutlich effektiver als die Isoleucinvariante des Leucin-Zipper-Bereichs aus dem Hefetranskriptionsfaktor GCN4, die als alternative Möglichkeit zur Generierung trimerisierungsfähiger Strukturen ebenfalls etabliert ist. Beide Proteindomänen sind als potente Trimerisierungsmotive beschrieben, die die Eigenschaft von Adaptermolekülen zur bispezifischen Interaktion erheblich verbessern können (Kashentseva *et al.*, 2002), (Kim *et al.*, 2002). In durchgeführten Western Blot-Analysen konnte allerdings nur bei CARsc-pSia-Konstrukten mit integrierter Fibrin-Sequenz eine effiziente Aggregation

zu Homotrimeren demonstriert werden (Abb.9). Das beobachtete Unvermögen der GCN4-Domäne, eine Trimerisierung zu vermitteln, ist möglicherweise auf die zentrale Positionierung zwischen der globulären CAR-Ektodomäne und dem scFv-Fragment zurückzuführen. In erfolgreichen Trimerisierungsstudien mit zentral lokalisierter GCN4-Domäne wurden neben der CAR-Ektodomäne lediglich kurze Peptide als zweite Komponente eingesetzt (Kim *et al.*, 2002). In einer weiteren Arbeit wurden trimere Strukturen nach C-terminaler Inkorporation der Domäne aus GCN4 realisiert (Yang *et al.*, 2000). Möglicherweise erfolgt die Trimerisierung der GCN4-Domänen aufgrund der sterischen Hinderung durch die globulären Randdomänen ineffizient, während sich das biophysikalisch enorm stabile Fibrinotrimer auch unter diesen Bedingungen effektiv ausbilden kann. Auch die grössere Länge der Fibrinstruktur gegenüber dem eingesetzten GCN4 könnte hierbei eine Rolle spielen.

Zudem wurden monomere und trimerisierte CARsc-pSia-Adapterproteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die adenovirale Infektion PolySia-exprimierender Zellen zu ermöglichen, untersucht. Der direkte Effektivitätsvergleich bestätigte eine verbesserte Infektionseffizienz adenoviraler Partikel, die mit trimerisierungsfähigen Adapter beschichtet wurden (Abb.10). Diese war aufgrund der zuvor genannten Vergleichsstudien zu analogen, trimerisierungsfähigen Adaptern erwartbar. Die beobachtete, signifikante Steigerung der Infektion dürfte daher auf die effizientere Beschichtung der eingesetzten Adenoviren durch trimerisierte CARsc-pSia-Adaptermoleküle zurückzuführen sein. Gemäß der postulierten 3:1 Stöchiometrie der natürlichen CAR-Fiber-Bindung sollte sich beim Einsatz trimerer CARsc-pSia-Moleküle im Vergleich zu monomeren Adapter eine höhere Affinität des Adaptertrimers an Fiber und eine niedrigere Dissoziation ergeben. Zudem sollte das scFv-Trimer, im Vergleich zur Affinität eines einzelnen scFv, eine deutliche erhöhte Avidität gegenüber PolySia auf der Oberfläche der Zielzelle aufweisen und somit zur verbesserten Effizienz der adenoviralen Infektion der Zelle beitragen. Die Beschichtung adenoviraler Partikel mit trimerisierungsfähigen Adapter könnte zudem aufgrund der stabileren Interaktion zwischen Vektor und Adapter einen besseren Schutz vor Degradierung adenoviraler Partikel gewährleisten und somit die Infektionseffizienz steigern.

## 4.2 Beeinflussung des natürlichen adenoviralen Tropismus durch das Adapterprotein CARsc-pSia

Als viraler Hauptfaktor für die initiale Interaktion mit zellulären Rezeptoren gilt *in vitro* das adenovirale Fiberprotein, dessen Bindung an den primären zellulären Rezeptor CAR den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Einleitung des Infektionsprozesses darstellt, bevor über die dann erfolgende Pentonbase-Integrin-Interaktion die Endocytose des Virus initiiert wird. Gerade die Beschichtung des adenoviralen Fiberproteins mit bispezifischen Adaptermolekülen kann daher die natürliche Tropismusedeterminanten effektiv maskieren und allein aufgrund dieser Maskierung, unabhängig von der Retargeting-Domäne, eine deutliche Modifikation des natürlichen Tropismus des Virus zur Folge haben. Diese Tropismusmodifikation wurde *in vitro* in der hochpermissiven, CAR-positiven, PolySia-negativen Hepatomzelllinie HepG2 untersucht, mit der der natürliche Hepatotropismus simuliert wurde. In Wettbewerbsversuchen konnte gezeigt werden, dass die adenovirale Infektion der Zellen durch Zugabe von CARsc-pSia als Kompetitor konzentrationsabhängig inhibiert werden konnte. Die Infektion konnte durch die Maximalkonzentration an Adapter auf ca. 10 % des Ausgangswertes durch Infektion mit unbehandelten Partikeln gedrückt werden (Abb.14). Eine vollständige Ablation des Tropismus ist nicht möglich, da die Adaptermoleküle nicht kovalent an das Fiber gebunden sind und bei längerem Virus-Zellkontakt durch zelleigene CAR-Rezeptoren verdrängt werden können, woraufhin der Infektionsprozess vollendet wird. Diese Beobachtungen demonstrieren eine deutliche Modifizierung des natürlichen Tropismus durch die Adapterbindung und suggerieren die Möglichkeit einer Reduktion des natürlichen adenoviralen Hepatotropismus, dem sogenannten Detargeting. Die bivalente Eigenschaft von Adapterproteinen, nicht nur den gezielten Eintritt beschichteter Adenoviren in CAR-negative Zielzellen zu vermitteln, sondern auch eine Reduktion der Infektion CAR-positiver Zellen zu bewirken, wurde auch von Li und Kollegen beschrieben (Li *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu Infektionsversuchen in der Zellkultur, rückt die Rolle von CAR als primärer Adenovirusrezeptor bei *in vivo* Studien zunehmend in den Hintergrund. Neben den zahlreichen Interaktionen mit Komponenten des Blutes spielt vor allem die spezifische Bindung des Blutgerinnungsfaktors X an das adenovirale Hexonprotein eine bedeutende Rolle (Waddington *et al.*, 2008). Diese Interaktion vermittelt die Aufnahme Ad5-basierter Vektoren in Hepatozyten und beschreibt einen CAR-unabhängigen Infektionsmechanismus (Kalyuzhniy *et al.*, 2008). Systemisch in den venösen Blutstrom applizierte Adenoviren gelangen über das Herz in die Lunge und anschließend in peripheres Gewebe, wo innerhalb

kürzester Zeit der Großteil der Viren in der Leber abgefangen werden und das Lebergewebe infizieren (Hofherr *et al.*, 2011). Die selektive Abschirmung der Fiberproteine durch CARsc-pSia-Adapter sollte dementsprechend keinen signifikanten Einfluss auf den starken Hepatropismus adenoviraler Vektoren haben. In Vergleichsstudien mit unbehandelten und CARsc-pSia-modifizierten Vektoren konnte allerdings nach intravenöser Applikation eine effektive Reduktion der Leberinfektion in den Tieren beobachtet werden, die mit beschichteten Vektoren behandelt wurden. Dieses hepatische Detargeting wird durch die vergleichsweise sehr geringe Expression viraler Markergene in Hepatozyten und der geringen Menge an detektierbarer adenoviraler DNA im Gesamthomogenat der Leber dargestellt (Abb.15 und Abb.16). CARsc-pSia-beschichtete Vektoren scheinen daher durchaus in der Lage zu sein, die natürliche Tendenz adenoviraler Partikel, hepatisches Gewebe zu infizieren, effektiv zu umgehen. An der deutlich sichtbaren Inhibition der Hepatozyteninfektion durch Adapter-beladene Adenoviren könnten verschiedene Mechanismen beteiligt sein.

Ein Faktor könnte eine sterische Hinderung der Hexon-vermittelten Infektion sein. Unter den verschiedenen Serotypen besitzen Serotyp 5-basierte Vektoren relativ lange Fiberproteine, die sich aus den 21 Sequenzwiederholungen der trimeren  $\beta$ -Spirale ( *$\beta$ -spiral repeats*) im Schaftanteil ergeben (van Raaij *et al.*, 1999). Die zusätzliche Komplexierung und Verlängerung der Fiber durch trimerisierte CARsc-pSia-Adaptermoleküle könnte zu einer signifikanten, sterischen Hinderung der Bindung von Faktor X an adenovirale Hexonproteine führen. Adenovirale Fiber sind zudem sehr flexible Strukturen. Sie besitzen in ihrem Schaftanteil eine Sequenz von Aminosäuren (KKTK-Motiv), die eine starke Biegung des gesamten Fiberproteins ermöglicht (Wu and Nemerow, 2004). Diese Mobilität CARsc-pSia-komplexierter Fiber könnte den Effekt der sterischen Hinderung verstärken und die Faktor X/Hexon-vermittelte Hepatozyteninfektion zusätzlich inhibieren.

Neben dem Rezeptor CAR können auch Faktoren wie das Komplementprotein C4BP und der Koagulationsfaktor IX an das Fiberprotein binden (Shayakhmetov *et al.*, 2005). Die Möglichkeit, dass durch die Beschichtung des Fiberknobs durch CARsc-pSia auch potentielle Bindestellen für weitere, noch unbekannte Interaktionspartner blockiert werden, die eine letztendliche Aufnahme der Viruspartikel in die Leber vermitteln, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Diese Hypothese widerspricht allerdings den Befunden von Waddington *et al.*, die der Rolle der Faktor X-Hexon-vermittelten Hepatozyteninfektion eine zentrale Rolle *in vivo* zuweisen (Waddington *et al.*, 2008).

Als ein weiterer wichtiger Aspekt zur Erklärung des beobachteten hepatischen Detargetings sollte auch eine Aufnahme beschichteter Partikel durch Kupffer-Zellen in Betracht gezogen

werden. Kupffer-Zellen sind große, sesshafte Makrophagen innerhalb des Lebergewebes. Obwohl sie nur etwa 7% aller Leberzellen darstellen, bilden diese Lebermakrophagen mit einem Anteil von schätzungsweise 80% - 90% die größte Makrophagenpopulation im Organismus der Maus (Bilzer *et al.*, 2006), (Jacobs *et al.*, 2010). Als eine essentielle Komponente des Retikuloendothelialen Systems haben Kupffer-Zellen eine essentielle Funktion bei der Entfernung von Fremdstoffen und pathogenen Substanzen aus dem Blutstrom. Aufgrund ihrer Lokalisation am Endothel innerhalb der Lebersinusoide bilden sie auch eine erste Abwehrlinie gegen Viren, die über die portale Blutzirkulation in die Leber gelangen und die Funktionsfähigkeit des Hepatozytenparenchyms bedrohen. Nach einer intravenösen Injektion adenoviraler Vektoren des Serotyps 5 in Mäusen, sind Kupffer-Zellen in der Lage bis zu 90% der viralen Partikel abzufangen und zu zerstören (Alemany *et al.*, 2000). Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte eine starke Abnahme adenoviraler Hexon-DNA nach Infektion mit adapterbeschichteten Adenoviren detektiert werden. Gleichzeitig zeigen die GFP-Fluoreszenzbilder auch eine wesentliche Reduktion der Infektion der Hepatozyten. Da die Messungen nach 48 Stunden durchgeführt wurden, könnte diese Abnahme auch in einer vermehrten Absorption beschichteter Adenoviren durch das Kupfferzellkompartiment begründet sein. Dies wäre durch die bereits erfolgte Degradierung durch die Lebermakrophagen nicht mehr nachvollziehbar. Durch die Beschichtung mit Adapterproteinen sind adenovirale Vektoren nicht zwangsläufig vor der Aufnahme durch die Lebermakrophagen geschützt. Nach neueren Erkenntnissen könnte auch die Größe von Fremdpartikeln eine Rolle bei der Passage bzw. der Beseitigung durch Kupffer-Zellen spielen. In Studien mit hexonmodifizierten Ad5-Partikeln, die eine chemische Ummantelung mit Polyethylenglykolen unterschiedlicher Größe erlauben, konnte lediglich durch die Kopplung von 5000 Da großen PEGs die Aufnahme der Vektoren durch Kupffer-Zellen umgangen werden (Prill *et al.*, 2011).

Der Effekt des hepatischen Detargetings wurde in unlängst durchgeführten *in vivo* Infektionsstudien zum Adapter-vermittelten Retargeting CEA-exprimierender Tumoren beschrieben (Li *et al.*, 2007). In diesen Studien resultierte die Beschichtung adenoviraler Vektoren mit dem ähnlich aufgebauten, trimeren Adapterprotein sCARfMFE ebenfalls in der Reduktion der Leberinfektion nach systemischer Vektorapplikation.

Ein weiterer problematischer Nebeneffekt systemischer Therapiestrategien mit adenoviralen Vektoren ist die mögliche Induktion einer dosisabhängigen Lebertoxizität, die auf eine vermehrte Infektion des Leberparenchyms und der Zerstörung von Hepatozyten durch Adenoviren zurückzuführen ist. Als eine direkte Ursache der Leberschädigung ist unter

anderem die toxische Wirkung der adenoviralen Replikation zu nennen. Desweiteren trägt die Induktion der angeborenen Immunantwort durch die Aktivierung der Kupffer-Zellen und anderer Faktoren wie natürliche Killerzellen und Komplementsystem sowie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zur Schädigung des hepatischen Gewebes bei (Lieber *et al.*, 1997). Dieser problematischen Nebenwirkung adenoviraler Vektoren kann durch den Einsatz bispezifischer Adapter entgegengewirkt werden. Als eine positive Auswirkung des dargestellten hepatischen Detargetings nach intravenöser Applikation adaptermodifizierter, onkolytischer Adenoviren konnte die effektive Reduzierung der lebertoxischen Effekte erreicht werden (Li *et al.*, 2009). Die in dieser Studie beschriebenen Beobachtungen decken sich mit den Resultaten unserer Experimente. In den untersuchten Tieren führte die systemische Applikation unbehandelter Adenoviren zu einer massiven Lebertoxizität, während die Behandlung mit CARsc-pSia-komplexierten Vektoren nur eine vernachlässigbare Schädigung des Lebergewebes im Vergleich mit unbehandelten, gesunden Mäusen verursachte. Das spiegelt sich in der gemessenen Serumaktivität der Aminotransferasen AST und ALT, die bei Leberschädigung durch untergehende Hepatozyten freigesetzt werden, sowie in der makroskopischen Erscheinungsbild entnommener Organe wieder (Abb.17). Diese Ergebnisse untermauern die Feststellung, dass durch die Beschichtung adenoviraler Partikel mit dem Adapter CARsc-pSia die massive Infektion von Hepatozyten effektiv verhindert werden kann und dadurch auch gleichzeitig die Virus-assoziierte Leberschädigung auf ein Minimum reduziert wird.

### **4.3 Charakterisierung des spezifischen Retargetings zu PolySia-exprimierenden Tumoren**

Das Idealziel einer onkolytischen Virotherapie mit tumor-spezifisch replizierenden Viren ist die selektive Zerstörung des malignen Zielgewebes. Im Fokus hierbei steht vor allem die hochspezifische und effektive Transduktion des Tumors, die eine nachfolgende, produktive Replikation der internalisierten Vektoren in den Zielzellen erst ermöglicht. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Therapiestrategie ist die Induktion einer antitumoralen Immunantwort nach Durchbrechung der Tumortoleranz durch die virusbedingte Entzündung im befallenen Tumorgewebe.

Im Rahmen einer therapeutischen Behandlung können verschiedene Möglichkeiten zur Applikation adenoviraler Vektoren zur Anwendung kommen. Ein therapeutisch relevanter Effekt kann durch die direkte Injektion der Viren in das Tumorgewebe erzielt werden. Allein

durch die Applikationsart ergibt sich ein gewisses Mass an Tumorselektivität. Die intratumorale Applikation ist allerdings vorzugsweise auf die Behandlung von gut zugänglichen und lokal begrenzten Tumoren beschränkt. Möglich ist auch die intraperitoneale Vektorapplikation, wie sich bei der gentherapeutischen Behandlung von Ovarialkarzinomen gezeigt hat (Alvarez *et al.*, 2000), (Buller *et al.*, 2002). Die angestrebte Behandlung disseminierter Tumorerkrankungen sowie metastatischer Ableger durch onkolytische Adenoviren erfordert jedoch zwingend eine systemische Administration der therapeutischen Vektoren. Die fehlende Affinität zum malignen Zielgewebe ist dabei einer der limitierenden Faktoren und geht mit einer ungenügenden Infektion des Zieltumors einher. Eine maximale Herausforderung der dargestellten Therapiestrategie stellt vor allem die direkte Infektion von Mikrometastasen dar.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept des transduktionellen Retargetings durch den bispezifischen Adapter CARsc-pSia sollte dazu beitragen, diese Hürden zu adressieren. Untersuchungen zum spezifischen Retargeting intravenös applizierter, onkolytischer Adenoviren zu polysialylierten Tumoroberflächen wurden zunächst an xenotransplantierten, subkutanen Tumoren des humanen Rhabdomyosarkoms und des humanen kleinzelligen Lungenkarzinoms durchgeführt. Beide Tumormodelle konnten zuvor durch Inokulation der Tumorzellen TE671 bzw. H146 in die Flanken von Nacktmäusen etabliert werden. Die Beschichtung der für diese Studie systemisch applizierten, Luciferase-exprimierenden Vektoren mit dem Fusionsmolekül CARsc-pSia resultierte in erfolgreicher Infektion von subkutanen Tumoren in beiden beschriebenen Tumormodellen (Abb.12 und Abb.13). Die Biolumineszenz war in lebenden Tieren nur schwach zu detektieren (Daten nicht dargestellt), die Adapter-abhängige Infektion wird in explantierten Tumorsektionen deutlich durch das Biolumineszenzsignal sichtbar. Im Gegensatz dazu wurde in Tumoren der Kontrollgruppe nach systemischer Applikation unbehandelter Adenoviren nur eine geringe Infektion nachgewiesen. Quantitative Messungen belegen in beiden Tumorarten einen drei- bis vierfachen Anstieg des viralen Markersignals durch Adapter-modifizierte Vektoren. Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine Beschichtung mit CARsc-pSia adenovirale Vektoren dazu befähigt, solide Tumoren selbst nach systemischer Administration effektiv zu infizieren. Desweiteren wird durch die Beschichtung eine stabile Adapter-Virus-Interaktion erreicht, die eine Abschirmung und womöglich eine längere Persistenz der Viren zur Folge hat und eine Erklärung für das Erreichen der hohen Infektionseffizienz darstellt. Das erfolgreiche PolySia-spezifische Retargeting systemisch-applizierter Vektoren belegt zudem den Erhalt der

hochaffinen Bindungseigenschaften bispezifischer Adapterproteine im Organismus und zeigt, dass diese Strategie in der onkolytischen Virotherapie von Tumoren vielversprechend ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die potentielle therapeutische Wirksamkeit viraler Therapiekonzepte durch systemische Applikation CARsc-pSia-modifizierter onkolytischer Adenoviren an einem syngenem Modell des kleinzelligen Lungenkarzinoms in immunkompetenten Mäusen untersucht. In der Literatur sind Methoden zur Etablierung orthotoper Modelle von Lungentumoren humaner Herkunft in immundefizienten Nacktmäusen beschrieben (Onn *et al.*, 2003). Zur vollständigen Charakterisierung zielgerichteter, onkolytischer Therapiekonzepte für die klinische Anwendung müssen allerdings immunologische Aspekte berücksichtigt werden, was die Verwendung eines immunkompetenten Mausmodells erforderlich macht. Nach Optimierung der Zellzahl muriner CMT64-Zellen erfolgte die Etablierung syngener, multilokulärer Tumorkolonien in der Lunge durch intravenöse Applikation. CMT64-Zellen haben sich für dieses Tumor- und Therapiemodell als geeignet erwiesen, da sie als murine SCLC-Linie die Propagation humaner Adenoviren erlauben (Hallden *et al.*, 2003). Einen Nachteil dieser Zelllinie stellt allerdings die sehr schwache Expression von PolySia im Vergleich zu humanen Tumorzelllinien dar (Abb.11 und Abb.18). Ein Angleichen des PolySia-Niveaus konnte jedoch durch retrovirale Einschleusung der Polysialyltransferase PST, einem Schlüsselenzym im Polysialylierungsprozess, erreicht werden, so dass in Voruntersuchungen eine effektive Infektion PolySia-exprimierender CMT-PST-Zellen mit CARsc-pSia-beschichteten Adenoviren möglich war (Abb.18 und Abb.19). Hier muss angemerkt werden, dass eine moderate Transduktion der Zelllinie CMT-PST durch unbeschichtete Adenoviren bei hoher MOI (*multiplicity of infection*) und langer Kontaktzeit möglich ist. Die Testung bei kurzen Infektionszeiten reduziert allerdings die Infektionseffizienz unbeschichteter Adenoviren. Unter diesen Bedingungen, die auch die Gegebenheiten *in vivo* am besten simulieren, konnte eine effektive Transduktion der Zellen nur durch CARsc-pSia-Beschichtung der Adenoviren erzielt werden.

Ein weiterer qualitativer Aspekt der PolySia-spezifischen Retargetingstrategie ist die Übertragbarkeit auf andere Tumormodelle. Wie bereits für solide, subkutane Tumoren dargestellt, konnte auch im SCLC-Tumormodell eine effektive Infektion des Lungengewebes durch adapterbeschichtete Vektoren mittels semi-quantitativer Darstellung der Biolumineszenzauswertung beobachtet werden (Abb.21). Die Behandlung tumortragender Tiere mit unbeschichteten Vektoren resultierte lediglich in einer sehr schwachen Infektion, dargestellt durch eine kaum detektierbare Biolumineszenz in wenigen Lungenbereichen,

während die CARsc-pSia-vermittelte Infektion eine deutlich effektivere Infektion der intrapulmonalen Tumorherde ermöglichte. Eine zusätzliche Steigerung des adaptorbasierten Retargetingkonzepts, dargestellt durch großflächigere Lumineszenzareale innerhalb der Lungen konnte durch die selektive Depletion der leberansässigen Kupffer-Zellen erzielt werden (Abb.21). Eine Möglichkeit zur transienten, selektiven Depletion der Lebermakrophagen bietet die pharmakologische Inaktivierung durch eine einmalige Injektion von toxischem Gadoliniumchlorid ( $GdCl_3$ ) vor der Virusgabe. Es wird vermutet, dass  $GdCl_3$  bei neutralem pH kolloidale Präzipitate im Blutstrom bildet, die in der Leber von Kupffer-Zellen phagozytiert werden. Im sauren Milieu innerhalb der Lysosomen löst sich präzipitiertes  $GdCl_3$  wieder auf und zerstört die Makrophagen. Auf diese Weise kann längerfristig ein Großteil aller Kupffer-Zellen selektiv ausgeschaltet werden, wobei keine toxischen Auswirkungen auf benachbarte Hepatozyten, Endothelzellen, sowie zirkulierende Mono- oder Lymphozyten auftreten (Hardonk *et al.*, 1992). Quantitative Messungen der Luciferaseaktivität und die Bestimmung viraler DNA aus homogenisierten Lungen zeigten eine etwa vierfach erhöhte Transduktionsrate in den Organen der Tiere an, die mit CARsc-pSia-komplexierten Vektoren behandelt wurden (Abb.22). Die Möglichkeit der erhöhten Infektion nicht-malignen Lungengewebes durch Viruskomplexierung konnte durch Kontrollen in tumorfreien Mäusen ausgeschlossen werden. Nach Infektionsversuchen mit dem onkolytischen Virus hTERT-AdGFP, das eine heterologe GFP-Kassette enthält, konnte zudem in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Lungenschnitten im Vergleich mit den Histologien verifiziert werden, dass es sich hierbei um einen PolySia-selektiven Transduktionsprozess handelt (Abb.23). Die Ergebnisse belegen auch für das Tumormodell des kleinzelligen Lungenkarzinoms die hochspezifische Infektion von Tumorkolonien durch systemisch applizierte, CARsc-pSia-komplexierte Adenoviren. Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit des dargestellten PolySia-spezifischen Retargetings in Lungenkolonien des SCLC erfolgten in immunkompetenten und immundefizienten Tieren. Dabei stellte sich eine signifikante Steigerung der Lebenserwartung immunkompetenter Mäuse nach intravenöser Behandlung mit CARsc-pSia-beschichteten, onkolytischen Vektoren heraus (Abb.27). In dieser Versuchsgruppe konnte allerdings auch ein geringer Überlebensvorteil von Mäusen festgestellt werden, die mit unbeschichteten Vektoren therapiert wurden. Mikroskopische Aufnahmen von Lungenhistologien in Abb.26 zeigen deutlich, dass drei Tage nach Virusapplikation in therapierten Tieren adenovirale Infektionsherde als kleine Lyseflächen mit geringen Leukozyteninfiltraten auffindbar sind. Da CMT-PST-Zellen im geringen Maße für Adenoviren permissiv sind, konnten vereinzelt

lysierte Tumorbereiche auch in Lungen von Mäusen detektiert werden, die mit unbeschichteten Vektoren behandelt wurden. Lungenhistologien der gleichen Versuchsgruppen, die an Tag 7 nach Virustherapie angefertigt wurden, zeigen hauptsächlich in den mit beschichteten Viren behandelten Mäusen eine Zunahme der lysierten Tumoreareale und ein deutlicher Anstieg der Anzahl an infiltrierenden Leukozyten an (Abb.26). Ausgelöst durch eine effiziente adenovirale Infektion der Tumorzellen ist der erreichte therapeutische Effekt auf eine Regression von Tumorkolonien innerhalb des Lungenepithels zurückzuführen (Abb.25). Für diesen Rückgang der Tumormasse ist demzufolge eine effektive Initialinfektion notwendig, die durch die Beschichtung der therapeutischen Adenoviren mit dem Adapter CARsc-pSia vermittelt wird.

In immundefizienten Nacktmäusen zeigten weder Virotherapie noch PolySia-spezifische Virotherapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms eine signifikante Wirkung. Nach Durchführung des gleichen Therapieschemas konnte in den adenoviral therapierten Mäusen keine Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb.30). In histologischen Untersuchungen von Lungenschnitten weisen immundefiziente Tiere an Tag 7 zumindest nach Virotherapie lysierte Flächen geringer Größe auf, die allerdings nicht das Ausmaß der Lysebereiche in den Lungen therapiert, immunkompetenter Tiere zum gleichen Zeitpunkt erreichen (Abb.29). Die beobachtbare Lyse muss demnach auf virale Replikation zurückzuführen sein, die aufgrund des Immundefekts in diesen Mäusen als einzige antitumorale Komponente für eine therapeutisch signifikante Regression der SCLC-Tumoren offensichtlich nicht ausreicht und somit zu keiner signifikanten Lebensverlängerung führt (Abb.28 und Abb.30). Der Vergleich der PolySia-spezifischen onkolytischen Virotherapie in den untersuchten immunkompetenten und immundefizienten Mäusen führt zur Schlussfolgerung, dass adaptive Immunantworten, besonders durch zytotoxische T-Zellen, für den erzielten Therapieeffekt verantwortlich sein müssen. Die aus den aufgeführten Ergebnissen gewonnenen Erkenntnisse deuten auf die Induktion einer antitumoralen Immunantwort hin, die durch eine adenovirale Transduktion der Tumorzellen eingeleitet wird. Es wurde bereits gezeigt, dass die Zelllinie CMT64 in der Lage ist, humane adenovirale Partikel in geringem Maße zu propagieren. Diese ist jedoch sehr gering und es kommt bereits 48 Stunden nach der initialen Infektion in CMT64-Tumoren zu einem Abfall an intratumoraler Virus-DNA (Gurlevik *et al.*, 2010). In Übereinstimmung hiermit zeigen die Ergebnisse in den Nacktmausversuchen, dass die virale Onkolyse nicht ausschlaggebend für längeres Überleben ist. Die Infektion des Tumorgewebes mit replikationskompetenten Viren führt zu viraler DNA-Replikation, die einen immunogenen

Zelltod auslösen kann (Bernt *et al.*, 2005), (Di Paolo *et al.*, 2006). Phagozytierende Zellen des Immunsystems können so lysiertes, mit Virusmaterial versetztes Tumormaterial aufnehmen und durch Kreuzpräsentation tumorassoziierte Antigene T-Zellen im Kontext eines stark stimulierenden Zytokinmilieus präsentieren. Es ist gezeigt worden, dass bei der Aufnahme von viralen Gefahrensignalen im phagozytierten Zelldetritus eine synchrone Aktivierung von Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr wie TLR-3 und MyD88 nicht nur eine starke antivirale Immunität hervorruft, sondern auch eine Immunreaktion gegen zelluläre Antigene der infizierten Tumorzelle triggern kann (Chen *et al.*, 2005), (Schulz *et al.*, 2005). Eine erfolgreiche Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen kann dann zur Infiltration und letztendlich zur Lyse des Tumorgewebes führen. Dieser Aspekt wäre in Übereinstimmung mit den in Abb.26 gezeigten Histologien. Die durch das Therapieschema induzierte adaptive Immunantwort ist wahrscheinlich nur sehr schwach, so dass keine vollständige Remission zu beobachten ist.

Weiterhin zerstören lytische adenovirale Infektionen das immunsuppressive Tumormikromilieu, welches in den letzten Jahren als wichtige Voraussetzung für die Progression und Metastasierung erkannt wurde (Hanahan and Weinberg, 2011). Tumorspezifische Toleranzmechanismen im immunsuppressiven Mikromilieu des Tumors können der Entstehung antitumorale Immunantworten effektiv entgegenwirken (Mellor and Munn, 2008). Lytische adenovirale Infektionen können diese Toleranzmechanismen wirksam durchbrechen, was die Induktion der adaptiven antitumorale Immunantwort wirksam unterstützen kann (Bernt *et al.*, 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine normalerweise unwirksame antitumorale DC-Vakzinierung im Kontext einer onkolytischen Tumorerkrankung zur wirksamen Expansion antitumorale CD8-Zellen führt (Woller *et al.*, 2011). Zudem ist bekannt, dass sich suppressorische T-Zelltypen im Tumormikromilieu unter Entzündungsbedingungen transient in T-Helfer-Zellen reprogrammieren können (Sharma *et al.*, 2010).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Wirkung der adaptiven Immunantwort, die durch eine gezielte onkolytische Therapie provoziert wird, einen bisher unterschätzten Einfluss auf die therapeutischen Effektivität und die damit verbundene Lebensverlängerung hat. Die Aufklärung der Synergie zwischen Onkolyse und Immuntherapie erscheint somit als vielversprechender Aspekt für die Entwicklung verbesserter, alternativer Therapiekonzepte von malignen Erkrankungen.

#### 4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse haben beweisen können, dass die Verwendung eines bispezifischen, PolySia/Adenovirus-affinen Adapters eine interessante und hochspezifische Strategie für die onkolytische Therapie PolySia-positiver Tumoren darstellt. Einige Fragen, die erst im weiteren Verlauf der Experimente aufgeworfen wurden, konnten noch nicht abschliessend behandelt werden. So konnten die Details des Detargetings noch nicht geklärt werden, wobei insbesondere zu klären wäre, ob die Aufnahme Adapter-komplexierter Adenoviren in Kupffer-Zellen zu einer geringeren Ausschüttung von toxischen Zytokinen führt als die Aufnahme ‚nackter‘ Partikel, da kritische Virus-charakteristische Motive bedeckt sind. Auch weitere Detailanalysen der Gewebsverteilung viraler Partikel, die nicht von der Leber aufgenommen werden, müssten noch angeschlossen werden. Darüber hinaus haben die dargestellten Arbeiten interessante Anhaltspunkte zur Induktion der antitumoralen Immunantwort ergeben, deren Mechanismen genauer untersucht werden müssten. Hierbei steht zunächst im Vordergrund, die tumor-spezifischen Immunzellen, am besten mit antigen-spezifischen Messmethoden, genau identifizieren zu können.

Das in dieser Arbeit dargestellte PolySia-spezifische Retargetingkonzept hat allerdings auch prinzipielle Einschränkungen, die in Weiterentwicklungen des Ansatzes adressiert werden sollten. Die Tropismusmodifikation durch bispezifische Adapter ist vor allem nur transient. Sie betrifft also lediglich die Erstinfektion, nicht jedoch die Weiterverbreitung der onkolytischen Nachkommenschaft im Tumor, die auf den natürlichen Tropismus angewiesen ist. Hier müsste überlegt werden, ob die Expression des Adapters durch das Virus selbst während der intratumoralen Replikation im Tumor Abhilfe schaffen könnte. Entsprechende Viren wurden bereits generiert und werden in nachfolgenden Experimenten charakterisiert. Zudem wäre eine genetische Retargetingstrategie als Alternative in Betracht zu ziehen. Diese könnte beispielsweise durch Fusionierung des Penton-bindenden Fiberterminus mit natürlich vorkommenden PolySia-Liganden realisiert werden, wobei die Stabilität der Partikel gewährleistet sein muss. Trotz erheblicher technischer Hürden könnte das genetische PolySia-spezifische Retargeting eine vielversprechende Alternative für die Therapie PolySia-exprimierender Tumoren sein.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Eukaryotische Zelllinien

- H1299: adhärente Zelllinie des humanen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (ATTC CRL-5803); Bei dieser Zelllinie wird p53 aufgrund einer partiellen Deletion nicht exprimiert.
- HepG2: adhärente, humane, hepatozelluläre Karzinomzelllinie, die p53 wt exprimiert (ATTC HB-8065)
- HuH7: adhärente, humane Hepatomzelllinie, die inaktives p53 mit der Mutation 220C exprimiert
- IMR32: adhärente, CAR negative Zelllinie des humanen Neuroblastoms, die polysialyliertes NCAM exprimiert (ATTC CCL-127)
- 293: adhärente, humane, embryonale Nierenzelllinie mit stabil integrierter adenoviraler E1-Region. 293-Zellen werden zur Generierung replikationsdefizienter Adenoviren verwendet (ATTC CRL-1573).
- Phönix-ampho: Subtyp der Zelllinie 293T mit stabil integrierten viralen Genen *gag*, *pol* und *env*; Die adhärenen Zellen werden als Verpackungszelllinie amphotroper Retroviren verwendet.
- CMT64: adhärente Zelllinie des murinen, kleinzelligen Lungenkarzinoms, die p53 mit der Mutation G12V exprimiert
- H146: Suspensionszelllinie des humanen, kleinzelligen Lungenkarzinoms, die polysialyliertes NCAM (Neurales Zelladhäsionsmolekül) exprimiert
- TE671: adhärente Zelllinie des humanen Rhabdomyosarkoms, die aktiviertes N-ras aufgrund einer Punktmutation exprimiert
- CHO: immortalisierte, adhärente Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters, die polysialyliertes NCAM exprimiert und kein CAR (Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor) in der Membran aufweist
- CHO-2A10: isogener Subtyp der Zelllinie CHO, die durch chemische Mutagenese erzeugt wurde; die Zelllinie exprimiert weder membranständiges, polysialyliertes NCAM noch den Rezeptor CAR
- H69: Suspensionszelllinie des humanen, kleinzelligen Lungenkarzinoms, die polysialyliertes NCAM und CAR membranständig exprimiert
- 735: Hybridomzelllinie, die den monoklonalen Antikörper mAB 735 exprimiert, ein gegen alpha (2-8) Polysialinsäuren gerichteter IgG2a Antikörper

### 5.1.2 Bakterienstämme

- JM 109: Ein modifizierter *E. coli* Stamm (Fa. Gibco), der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde. Es wurden chemisch- sowie elektro-kompetente Bakterien dieses Stammes verwendet. Genotyp: F<sup>-</sup> *traD36 lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+/e14-(McrA-) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) endA1 hsdR17(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) relA1 supE44 recA1*.
- XL-10 Gold: Ein modifizierter *E. coli* Stamm (Fa. Stratagene), der sich zur stabilen Replikation großer Plasmide (zB. Adenovirus-Plasmide) eignet. Genotyp: Tet<sup>r</sup>Δ (*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* (F<sup>'</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>)<sup>a</sup>.
- BJ 5153: Ein modifizierter *E. coli* Stamm (Fa. Stratagene), der durch die hohe Aktivität seiner Rekombinase eine effektive Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gewährleistet. Die Bakterien wurden zur Generierung rekombinanter adenoviraler Plasmide über homologe Rekombination verwendet. Genotyp: *endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR* (Str<sup>r</sup>).
- DH5α: Ein modifizierter *E. coli* Stamm (Fa. Gibco), der sich zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl eignet. Genotyp: F<sup>-</sup> 80dlacZ M15 (*lacZY-A-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) supE44, thi-1 gyrA relA1*.

### 5.1.3 Mausstämme

- C57BL/6: Inzuchtstamm, der syngene für die im Rahmen dieser Arbeit als subkutaner Tumor oder Lungenmetastasen Modell verwendete CMT64 Zelllinie ist. Behandelt wurden weibliche Mäuse im Alter von 6-8 Wochen.
- NMRI-nu/nu: Athymischer Nacktmausstamm, der zur Etablierung xenogener, subkutaner Tumore und Lungenkolonien verwendet wurde. Behandelt wurden weibliche Tiere im Alter von 6-8 Wochen.

### 5.1.4 Plasmide

- pBlueScript KS<sup>+</sup>: Klonierungsplasmid (Fa. Stratagene) mit T3 und T7 Promotor, der als Zwischenklonierungsvektor oder als *nonsense*-DNA zum Auffüllen von Transfektionsansätzen verwendet wurde (interne Bezeichnung pBS).
- pCMV-LacZ: Expressionsvektor, der das Gen der β-Galactosidase unter der Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Er wurde als Abgleich bei Transfektionsansätzen eingesetzt.
- pQCXIN: Retroviraler Klonierungsvektor (Fa. BD Biosciences), der die klonierte DNA Sequenz zusammen mit einer Neomycin Resistenz Kasette unter der Kontrolle eines CMV Promotors bicistronisch exprimiert. Der Vektor wurde zur Generierung rekombinanter, retroviraler Partikel in der Verpackungszelllinie Phoenix-ampho eingesetzt.
- pQCXIP: Retroviraler Klonierungsvektor (Fa. BD Biosciences), der die klonierte DNA Sequenz zusammen mit einer Puromycin Resistenz Kasette unter der Kontrolle eines CMV Promotors bicistronisch exprimiert. Der Vektor wurde

- zur Generierung rekombinanter, retroviraler Partikel in der Verpackungszelllinie Phönix-ampho eingesetzt.
- pCAR<sub>ex</sub>TAT: Ein auf pBlueScript basierender Vektor, der das Fusionsprotein pCAR<sub>ex</sub>TAT unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert (interne Bezeichnung 4681).
- pVSV-G: Expressionsvektor, der das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) transient unter der Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Der Vektor wurde zur Pseudotypisierung retroviraler Partikel nach Transfektion in Verpackungszelllinien verwendet.
- pRc/NCAM-180: Expressionsvektor für das murine NCAM-180 (neurales Zelladhäsionsmolekül) unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Aus dem Vektor wurde das NCAM-Fragment isoliert und in pQCXIP kloniert (Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn zur Verfügung gestellt).
- pST8-Sia IV: Klonierungsvektor auf pUC118-Basis, der die Expressionskassette der murinen Polysialyltransferase PST (*alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4*) enthält. Das PST-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Bam*H I isoliert und in den Vektor pQCXIN kloniert (Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn zur Verfügung gestellt).
- pST8-Sia II: Expressionsvektor für die murine Polysialyltransferase STX (*alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2*) unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Das STX-Fragment wurde nach Restriktion mit *Xba* I und *Kpn* I isoliert und nach Klenow-*fill in* in den retroviralen Vektor pQCXIN kloniert (Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn zur Verfügung gestellt).
- pAdHM4: Adenovirus-Plasmid des Serotyp 5-Derivats der Mutante dI 309 mit Deletionen im E1- und E3-Bereich. Der Vektor wurde zur Klonierung rekombinanter DNA über die Schnittstellen I-*Ceu* I und PI-*Sce* I verwendet.
- pHM3: Adenoviraler *Shuttle*-Vektor, der als Zwischenklonierungs-Vektor zum Anfügen der I-*Ceu* I und PI-*Sce* I Schnittstellen an rekombinante DNA Fragmente eingesetzt wurde.
- K93: Adenoviraler *shuttle*-Vektor mit einer E1 Region unter Kontrolle des hTERT Promotors und einer IRES-EGFP Domäne an der E1B Region.
- pShuttleCMV: Transfervektor (Fa. Stratagene), der nach Anfügen eines CMV Promotors und SV40-polyA Signals an das Transgen zur homologen Rekombination mit pAdEasy-1 eingesetzt wurde.
- pAdEasy-1: Adenoviraler Vektor (Fa. Stratagene) mit Deletionen im E1 und E3 Bereich. Der Vektor wurde zur Integration rekombinanter DNA ins virale Genom über homologe Rekombination verwendet.
- DS 122: Expressionsvektor basierend auf pBlueScript, der den trunkierten Promotor CMV<sub>350</sub> enthält.

### 5.1.5 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

- p90: Zwischenvektor basierend auf pBlueScript, der die schwere Kette der variablen Domäne des anti-pSia-Antikörpers ( $V_H$ -pSia) enthält. Das  $V_H$ -Fragment wurde aus cDNA der Hybridomzelllinie 735 über PCR amplifiziert und über *Kpn* I und *Sac* I in pBS kloniert.
- p152: Zwischenvektor basierend auf pBlueScript, der die leichte Kette der variablen Domäne des pSia-Antikörpers ( $V_L$ -pSia) enthält. Das  $V_L$ -Fragment wurde aus cDNA der Hybridomzelllinie 735 über PCR amplifiziert und über *Xba* I und *Xho* I in pBS kloniert.
- p174: Zwischenvektor basierend auf pBlueScript, der das Fragment scFv-pSia enthält. Die  $V_L$ -pSia Domäne aus p152 und die  $V_H$ -pSia aus p90 wurden in einer PCR amplifiziert und durch einen Gly-Ser-Linker miteinander verbunden in pBS kloniert (*Not* I, *Xba* I).
- p229: Expressionsvektor basierend auf pBlueScript, der die Sequenz des bispezifischen Fusionsproteins CARsc-pSia exprimiert. Aus p174 wurde das Fragment scFv-pSia über *Not* I und *Xba* I zum Anfügen der  $CAR_{ex}$ -Domäne und eines *myc*-His-tags in p4681 (*Not* I, *Xba* I) kloniert.
- p280: Transfervektor basierend auf pShuttle-CMV, der die Expressionskassette des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia aus p229 enthält.
- p470: Adenoviraler Vektor auf Basis von AdEasy, der die CARsc-pSia Expressionskassette unter CMV Kontrolle exprimiert. Das Transgen wurde nach Kotransformation mit dem linearisierten Vektor p280 in den kompetenten Bakterien BJ5183 über homologe Rekombination in AdEasy-1 integriert.
- p507: Dieser Vektor enthält die Expressionskassette des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia aus p229. Das Fragment wurde über *Mlu* I und *Pme* I herausgeschnitten und in einer *sticky/blunt*-Ligation in den Vektor DS 122 (*Bam*H I Verdau mit Klenow-*fill in*, dann *Mlu* I Verdau) zum Anfügen eines polyA-Signals kloniert.
- p655: Dieser Vektor enthält die Expressionskassette des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia aus p229 unter der Kontrolle des trunkierten Promotors  $CMV_{350}$ . Das Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sac* I, *Pme* I aus p229 isoliert und nach Klenow-*fill in* in pDS 122 (*Nhe* I und Klenow) kloniert.
- p844(K93 $\Delta$ EGFP): Adenoviraler *shuttle*-Vektor basierend auf K93. Bei diesem Konstrukt wurde die EGFP-Sequenz durch einen *Not* I Verdau und einen *Nco* I Partialverdau herausgeschnitten. Durch Klenow-*fill in* und Religation wurde vor der IRIS-Sequenz eine neue *Nco* I Schnittstelle eingefügt.
- p852: Adenoviraler *shuttle*-Vektor basierend auf p844 (K93 $\Delta$ EGFP), der die rekombinante CARsc-pSia Sequenz unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Das CARsc-pSia Fragment wurde aus dem Vektor p507 mit *Mlu* I und *Pme* I isoliert und in den mit *Mlu* I und *Eco*R V linearisierten, adenoviralen Vektor p852 in einer *sticky/blunt*-Ligation kloniert.
- p1014: Dieser adenovirale Vektor basiert auf AdHM4 und enthält die Expressionseinheit CARsc-pSia aus dem *shuttle*-Vektor p852. Die Klonierung

- erfolgte über die Restriktionsschnittstellen I-*Ceu* I und PI-*Sce* I und Ligation in AdHM4.
- p1035: Retroviraler Klonierungsvektor basierend auf pQCXIN mit der Expressionseinheit aus p507 unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Das CARsc-pSia Fragment wurde über *Mlu* I und *Pme* I isoliert und nach Klenow-*fill in* in pQCXIN (*BamH* I und *Not* I mit Klenow-*fill in*) kloniert.
- p1055: Retroviraler Klonierungsvektor basierend auf pQCXIN mit der Expressionseinheit aus p655 unter der Kontrolle des trunkierten CMV<sub>350</sub> Promotors. Das CARsc-pSia Fragment wurde über *Mlu* I und *Pme* I isoliert und nach Klenow-*fill in* in pQCXIN (*BamH* I und *Not* I mit Klenow-*fill in*) kloniert.
- p1085: Retroviraler Klonierungsvektor basierend auf pQCXIN mit der Expressionseinheit aus p229 unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Das CARsc-pSia Fragment wurde über *Sac* I und *Pme* I isoliert und nach Klenow-*fill in* in pQCXIN (*BamH* I und *Not* I mit Klenow-*fill in*) kloniert.
- p1124: Expressionsvektor zur Zwischenklonierung basierend auf p229. Durch Restriktion mit *Xba* I und *Pme* I wurde die myc-6xHis-Kassette aus p229 entfernt und durch ein kurzes Fragment mit einem Stop-Codon über die gleichen Schnittstellen ersetzt.
- p1204: Vektor zur Zwischenklonierung basierend auf p1124, der eine um das *Leader*-Peptid verkürzte CAR Domäne in der Expressionskassette von p1124 enthält. Durch PCR wurde die CAR Ektodomäne ab der Spaltstelle der Leadersequenz aus p229 amplifiziert und über Restriktion mit *Sac* I und *Nhe* I in p1124 kloniert.
- p1275: Vektor zur Zwischenklonierung basierend auf p1204, der eine 6xHis-myc-Kassette vor der verkürzten CAR Sequenz enthält. Der 6xHis-myc-*tag* wurde aus Oligos mittels PCR amplifiziert und nach einer Restriktion mit *Nhe* I und *Spe* I in die *Nhe* I Schnittstelle des Vektors p1204 kloniert.
- p1355: Vektor zur Zwischenklonierung basierend auf p1275, der die CAR-Leadersequenz vor der Expressionskassette von p1275 enthält. Die Leadersequenz wurde aus Oligos mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *Nhe* I und *Sac* I in die gleichen Schnittstellen des Vektors p1275 ligiert.
- p1475: Retroviraler Klonierungsvektor basierend auf pQCXIN mit der Expressionseinheit aus p1355 unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Das CARsc-pSia Fragment aus p1355 wurde nach Verdau mit *Pme* I und *Sac* I isoliert und nach Klenow-*fill in* in einer *blunt end*-Ligation in den Vektor pQCXIN (*BamH* I und *Not* I mit Klenow-*fill in*) kloniert.
- p1575: Zwischenvektor basierend auf pBlueScript, der die Sequenz der Trimerisierungsdomäne GCN4 unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Die GCN4 Sequenz wurde aus Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *Spe* I und *Not* I in pBS kloniert.
- p1673: Expressionsvektor basierend auf pBlueScript, der die Expressionseinheit GCN4-hinge unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Die hinge-Sequenz wurde aus Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit den Enzymen *Spe* I und *Hind* III in den Vektor p1575 kloniert.

- p1718: Zwischenvektor basierend auf pBlueScript, der die Sequenz der Trimerisierungsdomäne aus Fibrinogen (T4 Phage) unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Die Fibrinogen Sequenz wurde aus Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *Spe I* und *Not I* in pBS kloniert.
- p1828: Expressionsvektor basierend auf pBlueScript, der die Expressionseinheit Fibrinogen-hinge unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Die hinge Sequenz wurde aus Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit den Enzymen *Spe I* und *Not I* in den Vektor p1718 kloniert.
- p1858: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf p1475, der die Expressionseinheit CAR-GCN4-hinge-scpSia enthält. Das GCN4-hinge Fragment wurde durch Restriktion mit *Not I* aus dem Vektor p1673 isoliert und in die *Not I* Schnittstelle des retroviralen Vektors p1475 ligiert.
- p1886: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf p1475, der die Expressionseinheit CAR-Fibrinogen-hinge-scpSia enthält. Das Fibrinogen-hinge Fragment wurde durch Restriktion mit *Not I* aus dem Vektor p1828 isoliert und in die *Not I* Schnittstelle des retroviralen Vektors p1475 ligiert.
- p1913: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf pQCXIN, der die Expressionseinheit der murinen Polysialyltransferase STX unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Das STX Fragment wurde über *Kpn I* und *Xba I* aus pST8-Sia II isoliert und nach Klenow-*fill in* in den Vektor pQCXIN (*BamH I* und Klenow *fill in*) kloniert.
- p1950: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf pQCXIN, der die Expressionseinheit der murinen Polysialyltransferase PST unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält. Das PST Fragment wurde über *Xho I* aus pST8-Sia IV isoliert und nach Klenow-*fill in* in einer *blunt end*-Ligation in den Vektor pQCXIN (*BamH I* und Klenow *fill in*) kloniert.
- p2042: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf pQCXIP, der das murine NCAM-180 unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Das NCAM-180 Fragment wurde nach Restriktion mit *Hind III* und *Xba I* aus pRc/NCAM-180 isoliert und nach Klenow-*fill in* in den Vektor pQCXIP (*BamH I* und Klenow *fill in*) kloniert.
- p2060: Vektor zur Zwischenklonierung des 6xHis-myc-tags vor die um das *Leader*-Peptid verkürzte CAR-Domäne in Vektor p1204. Die 6xHis-myc-tag Sequenz wurde aus Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *Nhe I* und *Not I* in die gleichen Schnittstellen des Vektors p1204 kloniert.
- p2085: Vektor zur Zwischenklonierung der Domäne Gla (*gamma-carboxyglutamic acid*) des humanen Koagulationsfaktor X des Blutes vor den 6xHis-myc-tag in p2060. Das durch PCR aus Oligonukleotiden generierte Gla Fragment wurde nach Restriktion mit *Nhe I* und *Spe I* in die *Nhe I* Schnittstelle des Vektors p2060 ligiert.
- p2122: Vektor zur Zwischenklonierung der Domänen Gla und EGF1 (*epidermal growth factor-like*) des humanen Koagulationsfaktor X des Blutes vor den 6xHis-myc-tag in p2060. Das durch PCR aus Oligonukleotiden generierte Gla-EGF1 Fragment wurde nach Restriktion mit *Nhe I* und *Spe I* in die *Nhe I* Schnittstelle des Vektors p2060 ligiert.

- p2145: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf pQCXIN, der die Expressionskassette Gla-EGF1-His-myc-scpSia aus p2122 enthält. Das Fragment wurde mit *Nhe* I und *Pme* I aus p2122 isoliert und nach Klenow-*fill in* in das retrovirale Plasmid pQCXIN (*Bam*H I und Klenow-*fill in*) ligiert.
- p2153: Retroviraler Expressionsvektor basierend auf pQCXIN, der die Expressionskassette Gla-His-myc-scpSia aus p2085 enthält. Das Fragment wurde mit *Nhe* I und *Pme* I aus p2085 isoliert und nach Klenow-*fill in* in das retrovirale Plasmid pQCXIN (*Bam*H I und Klenow-*fill in*) ligiert.

### 5.1.6 Rekombinante Adenoviren

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Viren handelt es sich um rekombinante Adenoviren des humanen Serotyps 5. Zum Einsatz kamen replikationskompetente Viren mit funktioneller E1-Region unter der Kontrolle des humanen TERT-Promotors und deletiertem E3-Bereich, sowie replikationsdefiziente Adenoviren mit Deletionen in der E1- und E3-Region. Zur Generierung aller rekombinanten Adenoviren wurden permissive 293-Zellen verwendet.

- AdGFP: Replikationsdefizientes Adenovirus, enthält das Gen des Reporterproteins GFP (*green fluorescent protein*) unter der Kontrolle eines CMV Promotors
- AdLacZ: Replikationsdefizientes Adenovirus, enthält das Gen der  $\beta$ -Galactosidase unter der Kontrolle eines CMV Promotors
- hTERT-.Ad: Replikatives, onkolytisches Adenovirus mit funktioneller E1-Region unter der Kontrolle des humanen TERT (*telomerase reverse transcriptase*), das selektiv in Zellen mit aktivem hTERT Promotor repliziert
- hTERT-AdLuc: Onkolytisches Adenovirus, das selektiv in TERT-positiven Zellen repliziert (hTERT-Ad) und das Luciferase Reporter gen unter der Kontrolle eines CMV Promotors enthält
- hTERT-AdGFP: Replikatives, onkolytisches hTERT-Ad, enthält das Gen des Reporterproteins GFP unter der Kontrolle eines CMV Promotors
- hTERT-Adsc-pSia: Replikatives, onkolytisches hTERT-Ad mit der Expressionskassette des bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia unter der Kontrolle eines CMV Promotors

### 5.1.7 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG, Ebersberg bezogen. Die Sequenz verläuft stets in 5'-3'-Richtung.

#### Oligonukleotide zur quantitativen PCR adenoviraler DNA:

Hex-fw	TGCCTTTACGCCACCTTCTTC
Hex-rev	CGGGTATAGGGTAGAGCATGTTG
Hex-Sonde (FAM/BHQ)	CCACAACACCGCCTCCACGCTTGA

#### PCR-Primer zur Klonierung des scFv-pSia-Fragments:

Fw Sac I-V <sub>L</sub>	AAAGAGCTCGATGTTGTGATGACCCAGACTCC
-------------------------	----------------------------------

Rev Kpn I-C <sub>L</sub>	GAAGCTCTTGACAATGGGTG
Fw Sac I-V <sub>H</sub>	AAAGAGCTCCAGCTACAACAGTCTGGACC
Rev Kpn I C <sub>H1</sub>	TTGGTACCCTTGCCACCTTGGTGCTGC

**Oligonukleotide zur reversen Transkription:**

Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTG/A/T/C
C <sub>L</sub> -rev	GAAGCTCTTGACAATGGGTG
C <sub>H1</sub> -rev	CTTGCCACCTTGGTGCTGC

**Oligonukleotide zur Klonierung von CARsc-pSia:**

ΔCAR-s	TTGAGCTCAAAGCTAGCTTGAGTATCACTACTCCTGAAGA G
ΔCAR-as	AGAGTATGAGTATTCAATGCGGCCGCCTTTATTTGAAG
Hismyc-s	TTGCTAGCCATCATCATCATCATACCGGTGAACAAAA CTCATCTCAGAAG
Hismyc-as	AACTAGTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTTCACCG GTATGATGATGAT
Leader-s	TTGAGCTCATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCG GAGTAGTGGATTCGCCAGAAG
Leader-as	AAGCTAGCAGTAGTGATACTCAAACCTTCTGGCGAAATCCAC TACTCCGCACAGGAGCACGAAGC
Stop-s	GGGTCTAGAGGGCGGCGGCTGACTGCAGGTTTAAACCCC
Stop-as	GGGGTTTAAACCTGCAGTCAGCCGCCCTCTAGACC

**Oligonukleotide zur Klonierung der Trimerisierungsdomäne GCN4:**

GCN60-s	CAGCGCCATGAAACAAATTGAAGACAAGATTGAAGAAATT CTATCAAAAATTTATCACAT
GCN60-as	AGTTTTTTAATTCTGGCAATTCGTTTTCAATGTGATAAATT TTTGATAGAATTTCTTCA
GCN39-s	AAAGCGGCCGCGGATCCGGCAGCGCCATGAAACAAATTG
GCN39-as	TTACTAGTTTCGCCAATTAGTTTTTTAATTCTGGCAAT
GCN-pGL-s	AAAGCGGCCGCGGATCCGGCAGCGCCATGAAACAAATTGA AGACAAGATTGAGAAAATTC
GCN-pGL-as	CCGTCTAGAGTATGAGTATTCTGATCATTCGCCAATTAGCTT CTTAATTCTGGC
hinge-s	TTACTAGTGGCCCAACCGCAGCCAAAACCTCAACCCCAGCC ACAACCTCAGCCCAAACCTCAGCC
hinge-as	TTAAGCTTGCGGCCGCGCGGTTTTAAACCGGTTTAGGCTGAG GTTTGGGCTGAGGTTGGGCTGG

**Oligonukleotide zur Klonierung der Trimerisierungsdomäne aus T4-Fibritin:**

Fibritin-s	AAAGCGGCCGCGGTTATATTCCTGAAGCTCCAAGAGATGGG CAAGCTTACGTTTCGTAAAGATGGCGAATGG
Fibritin-as	AAAAGTAGTTGCTGGTGATAAAAAGGTAGAAAAGTAATACCC ATTCGCCATCTTTACGAACGTAAGCTTGCCCATC
hinge-s	TTACTAGTGGCCCAACCGCAGCCAAAACCTCAACCCCAGCC ACAACCTCAGCCCAAACCTCAG
hinge-as	TTTAAGCTTGCGGCCGCTAACCGGTTTAAGCTGAGGTT TGGGCTGAGGTTGTGGCTGGG

**Oligonukleotide zur Gla-/Gla-EGF1-scpSia Klonierung:**

LeaGla 1-s	GATCCGCAGGGAGCAGGCCAACAACATCCTGGCGAGGGTC ACGAGGGCCAATTCCTTTCTTGAA
------------	--

LeaGla 1-as	CTCTTCCATGCACTCTCTTTTCGAGGTGTCCTTTCTTCATCTCT TCAAGAAAGGAATTGGCCCT
LeaGla 2-s	GCCTCCCTGGCTGGCCTCCTGCTGCTCGGGGAAAGTCTGTTC ATCCGCAGGGAGCAGGCCAAC
LeaGla 2-as	GCTGTCTCAAAGACCTCGCGGGCCTCTTCGTATGAGCAGGT CTCTTCCATGCACTCTCTTT
LeaGla 3-s	TTGCTAGCATGGGGCGCCACTGCACCTCGTCCTGCTCAGTG CCTCCCTGGCTGGCCTCCTG
LeaGla 3-as	AAACTAGTTTTGTATTTATTCCAGAATTCATTCGTCTTGTCGC TGTCCTCAAAGACCTCGCG
GSHis-myc s	TTGCTAGCTCAGGATCTGGCTCTGGCTCCCATCATCATCATC ATCATACCGGTGAACAAAACTC
GSHis-myc-as	TTGCGGCCGCCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTCA CCGGTATGATGATGATGATGATGGG
EGF1-as	AAACTAGTTTTACATTTGCCCTGGTTCTGGCAAGGACTGGTC TCACACTGGTCGCCATCTTTGTATTTATTCCAG
LeaGla3-s 20	TTGCTAGCATGGGGCGCCCA
EGF1-as 20	AAACTAGTTTTACATTTGCC

### Sequenzierprimer:

M13 uni	TGTAAAACGACGGCCAGT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
AK fw	CTTTCCTACTTGGCAGTAC
AK rev	CCTACTCAGACAATGCGATG
CMV fw	GGTCTATATAAGCAGAGCTG
pQCXIN/P fw	ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT
pQCXIN/P rev	AAGCGGCTTCGGCCAGTAACGTTA

## 5.1.8 Rekombinante Proteine

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine wurden nach retroviraler Transduktion der Zelllinie 293 stabil exprimiert. Die sezernierten, bispezifischen Adapterproteine konnten aus Zellkulturmedium in einer 6xHis-tag-Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose in Elutionspuffer konzentriert werden.

CAR <sub>ex</sub> VP22:	Fusionsprotein, das aus der Ektodomäne des Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptors (CAR <sub>ex</sub> ) und der Protein Transduktionsdomäne VP22 des Herpes Simplex Virus (HSV) besteht. Das Adapterprotein wurde anhand seines 6xHis-tags aufgereinigt und ermöglichte nach Interaktion mit dem Fiber Protein des Adenovirus die Infektion nicht permissiver Zellen.
CAR <sub>ex</sub> Tat:	Fusionsprotein, das aus der Ektodomäne des Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptors (CAR <sub>ex</sub> ) und der Protein Transduktions Domäne Tat ( <i>transactivator of transcription</i> ) des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) besteht. Das Adapterprotein wurde anhand seines 6xHis-tags aufgereinigt und ermöglichte nach Interaktion mit dem Fiber Protein des Adenovirus die rezeptorunabhängige Infektion nicht permissiver Zellen.
CARsc-pSia:	Bispezifisches Fusionsprotein, das aus der Ektodomäne des Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptors (CAR <sub>ex</sub> ) und dem scFv

Fragment (leichte  $V_L$ - und schwere  $V_H$ -Kette der variablen Domäne) des monoklonalen anti-pSia Antikörpers 735 besteht. Das Adapterprotein wurde anhand seines 6xHis-tags aufgereinigt und ermöglichte nach Bindung an das Fiberprotein des Adenovirus die spezifische Infektion von Zellen mit polysialylierter Oberfläche.

Glasc-pSia:

Bispezifisches Fusionsprotein, das aus der Domäne Gla des humanen Koagulationsfaktor X des Blutes und dem scFv Fragment des monoklonalen anti-pSia Antikörpers 735 besteht. Das Adapterprotein wurde anhand seines 6xHis-tags aufgereinigt und inhibierte nach Bindung an das adenovirale Hexonprotein die spezifische Infektion von Hepatozyten in der Maus. Des Weiteren verstärkte Glasc-pSia das durch den Adapter CARsc-pSia ermöglichte Retargeting adenoviraler Partikel zu polysialylierten Tumoren.

Gla-EGF1sc-pSia:

Bispezifisches Fusionsprotein, das aus den Domänen Gla und EGF1 des humanen Koagulationsfaktor X und dem scFv-Fragment des monoklonalen anti-pSia Antikörpers 735 besteht. Das Adapterprotein wurde anhand seines 6xHis-tags aufgereinigt und inhibierte nach Bindung an adenovirale Hexonproteine den hepatischen Tropismus *in vivo*. Des Weiteren verstärkte Gla-EGF1sc-pSia das durch den Adapter CARsc-pSia ermöglichte Retargeting adenoviraler Partikel zu polysialylierten Tumoren.

### 5.1.9 Antikörper

anti-Maus Interferon- $\gamma$ (AN-18)	eBioscience
anti-Maus Interferon- $\gamma$ -Biotin (R4-6A2)	eBioscience
mouse anti myc IgG1-HRP	Invitrogen
goat anti mouse IgG-HRP	Invitrogen
Streptavidin-HRP	eBioscience
Streptavidin-FITC	eBioscience
Streptavidin-APC	eBioscience
735 mouse anti pSia	Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

### 5.1.10 Enzyme

Herculase <sup>TM</sup> Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene
Phusion® Hot Start II DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Klenow Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB
SAP ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )	Pharmacia
RNAse A, DNAse-frei	Boehringer
DNAse, RNAse-frei	Promega
T4 DNA-Ligase	NEB
T4 Polynukleotidkinase	NEB
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma

### 5.1.11 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA-Leiter	Gibco
-----------------	-------

1 kb+ DNA-Leiter  
peqGOLD Protein-Marker IV

Gibco  
peQLab

### 5.1.12 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
Agarose	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumchlorid	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Bacto-Tryptone	Gibco
Bromphenolblau	Serva
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Carbenicillin	Serva
Cäsiumchlorid	Serva
Chloroquin Diphosphat	Sigma
Ciprobay	Bayer
Chloroform	J.T.Baker
Coomassie Brilliant Blue	Serva
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
DMEM + GlutaMAX™-I	Gibco
di-Natriumhydrogenphosphat	J.T.Baker
dNTPs	AppliChem
D-Luciferin Natriumsalz	AppliChem
EDTA (N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Eosin Y Lösung	Sigma
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Gibco
Ficoll 400	Sigma
Gadolinium(III)Chlorid	Sigma
G 418 Sulfate	Calbiochem
Glycerol	Sigma
Glycin	AppliChem
Glutaraldehyd	Roth
GM-CSF ( <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )	Dr. Norman Woller
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Hefeextrakt	Gibco
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Imidazol	AppliChem
Isofluran	Baxter
Isopropanol	J.T.Baker
Kanamycin	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Ketamin	Gräub/Albrecht

L-Histidin	Roth
Lysozym	Sigma
Lipofektamin™	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol	J.T.Baker
Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	J.T.Baker
Natriumacetat	AppliChem
Natriumhydroxid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumpyruvat	Gibco
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nonidet-P40 (NP-40)	Sigma
optiMEM™	Gibco
ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	Sigma
Paraformaldehyd	AppliChem
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pepton aus Casein	Roth
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma
Polyinosinsäure	Sigma
Polyethylenimin	Polysciences Inc.
Polybren	Sigma
Poly I:C	Sigma
RPMI 1640	Gibco
Roti-Phenol	Roth
Rompun 2%	Bayer
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Sigma
Salzsäure	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin)	Sigma
Triton X 100	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Trypsin	Seromed
Tween 20	Serva
Zelldissoziationspuffer	Gibco
X-Gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck

### 5.1.13 Kits

Adeno-X Rapid-Titer Kit	Clontech
AST/ALT Enzymatic Assay Kit	Bioo Scientific
Herculase PCR-Kit	Stratagene
peqGOLD RNAPure	peQLab
Qiagen Endofree Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Rneasy Kit	Qiagen
qPCR™ Mastermix Plus	Eurogentec
RNase freies DNase Kit	Promega
TaqMan™ Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Ubiquitin C Control Kit	Eurogentec
Vivapure Adenopack 20 Kit	Vivascience

Western Lightning ECL-Kit  
18S Genomic Control Kit

Amersham  
Eurogentec

### 5.1.14 Geräte und sonstige Materialien

ABI 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Amicon Ultra Filterröhrchen	Millipore
Bakterienschüttler	Bühler
BioRad Protein Assay	BioRad
Cryostat HM 500 OM	Microm
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD
Einmalspritzen 1ml/5ml/10ml/20ml	Braun
Einmal-Injektions-Kanülen 21G/24G/27G	Braun
Einmalpipetten 2ml/5ml/10ml/25ml	Sarstedt
Filter 0,2µm/0,45µm	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Filmkassetten	Kodak
GelDoc 1000	BioRad
Gene-Pulser II	BioRad
Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020	Leica Biosystems
Heizplatte MR 3001 K	Omnilab
HTS Multiscreen IP 96-well Platten	Omnilab
IVIS-200 Optical Imaging System	Xenogen
Inkubator für Zellkultur	Sanyo
Kühlplatte TES 99	Medite
Kühlzentrifugen J2-21/Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge GS-6R	Beckman
Kühlzentrifuge 2 K 15	Sigma
Kryoröhrchen	Nunc
Lumat LB 9507	Berthold
Mikroskop CKX41	Olympus
Microtom HM 335 E	Microm
Neubauer Zählkammer	Brand
Rotoren (SW28i, SW32, JA-10, JA-20)	Beckman
Röntgenfilm	Amersham
Sterilbank 164 HERA safe	Heraeus
Spektralphotometer	MWG
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette	Pierce
Suspensionsflaschen für Zellkultur	Sarstedt
Spannungsquellen	Biometra, Gibco
Tankblot Apparatur	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge 5415D/5417R	Eppendorf
Transfermembran	Millipore
Ultrazentrifuge LE-80K	Beckman
Ultra Turrax Homogenisator	Kika-Werke
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph
Vortexer	Heidolph
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifugenröhrchen Ultra Clear	Beckman
Zentrifugenröhrchen 15ml/50ml	Greiner
Zellsieb 40 µm	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner

Zellkulturflaschen  
96-well Platten

Greiner  
Greiner

### 5.1.15 Nährmedien und Pufferlösungen

#### Nährmedien für Zellkultur

Für die Zellkultur adhärenter Zelllinien wurde das Nährmedium DMEM + Glutamax<sup>TM</sup> verwendet. Das Medium wurde mit 10 % (v/v) gefiltertem FCS sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin zur antibakteriellen Prophylaxe versetzt.

Alle Suspensionszelllinien wurden in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10 % (v/v) gefiltertem FCS sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur Kultivierung von Primärzellen wurde das RPMI 1640-Nährmedium noch zusätzlich mit Natriumpyruvat (1mM), nicht-essentiellen Aminosäuren und  $\beta$ -Mercaptoethanol (50 $\mu$ M) versetzt. Zur Kultivierung primärer dendritischer Zellen wurde dem RPMI 1640-Nährmedium für Primärzellen noch GM-CSF-haltiger Überstand beigemischt.

#### Nährmedien für Bakterien

SOC-Medium:

2 g Bacto-Tryptone, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g Natriumchlorid und 0,4 g Glukose wurden mit 1 ml 1M Magnesiumchlorid und 1 ml 1M Magnesiumsulfat versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Das Medium wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert. Das Medium wurde zur kurzzeitigen Regeneration transformierter Bakterien verwendet.

LB-Medium:

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Inkulturnahme transformierter Bakterien wurde dem LB-Medium zur plasmidspezifischen Selektion Antibiotika zugesetzt.

LB-Agarplatten:

15 g Agar wurden mit 1 l LB-Medium versetzt und autoklaviert. Zur plasmidspezifischen Selektion der transformierten Klone wurde das erforderliche Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

#### Pufferlösungen

PBS	10 mM Natriumphosphat pH 7.4 150 mM NaCl
ELISA-Puffer	200 mM NaHCO <sub>3</sub> 80 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Erythrozyten-Lysepuffer	0,1 M Ammoniumchlorid 10 mM KHCO <sub>3</sub> 1 mM EDTA (sterilfiltrieren)
Dialysepuffer	20 mM Tris pH 8.0 25 mM NaCl 0,1 % MSA
FACS-Puffer	PBS 0,1 % BSA 0,09 % NaN <sub>3</sub>

5x Extraktions-Puffer	125 mM Tris/Phosphat pH 7.8 10 mM EDTA 50 % Glycerol 5 % Triton X 100
Luciferase-Messpuffer	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> 5 mM ATP
Phosphat-Puffer pH 8.0	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
β-Gal Reaktionspuffer	1 mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) 2mM DTT 1 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM KCl 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
TBS-Tween	20 mM Tris-HCl pH 7,6 100 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE pH 8.0	10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA
1x TAE	40 mM Tris/Acetat pH 8.5 2 mM EDTA
Fixier-Puffer	100 mM Phosphat-Puffer 1mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 % Glutaraldehyd
X-Gal Färbelösung	1mM Phosphat-Puffer 1mM MgCl <sub>2</sub> 33 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) 33 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) 0,1 % X-Gal
10x Bindepuffer	500 mM Phosphat-Puffer pH 8.0 1,5 M NaCl
Protein-Waschpuffer	50 mM Phosphat-Puffer pH 8.0 300 mM NaCl 1,5 mM Imidazol
Protein-Elutionspuffer	50 mM Phosphat-Puffer pH 8.0 300 mM NaCl 150 mM L-Histidin
STET-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA 5 % Triton X 100
10 x DNA Ladepuffer	20 % (w/v) Ficoll 400

	0,1 M EDTA pH 8.0
	1 % SDS
	0,25 % Bromphenolblau (w/v)
	0,25 % Xylencyanol FF (w/v)
5 x SDS Protein Ladepuffer	150 mM Tris-HCl pH 6.8
	6 % SDS
	15 mM DTT
	0,25 % Bromphenolblau (w/v)
	30 % Glycerol

## 5.2 Zellbiologische Methoden

### 5.2.1 Zellkultur

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten adhärennten Zellen wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 12 ml DMEM-Medium (supplementiert mit 10 % FCS (v/v)), Penicillin und Streptomycin (0,1 mg/ml), bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verschiedenen Zelllinien wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90% passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin für 2–5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert, in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 mit frischem DMEM-Medium verdünnt und in Zellkulturflaschen ausgesät.

Nicht-adhärennte Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Suspensionskulturflaschen mit 20 bis 30 ml RPMI-Medium (supplementiert mit 10 % FCS (v/v)), Penicillin und Streptomycin (0,1 mg/ml), bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde das verbrauchte Medium der Suspensionszellen vorsichtig abgenommen und durch frisches RPMI-Medium ersetzt.

### 5.2.2 Einfrieren von Zellen

Zellen werden über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, in 12 ml Medium aufgenommen und bei 200 x g (10 Minuten, RT) zentrifugiert. Das Zellpellet einer konfluenten Kulturflasche wurde in Einfriermedium (DMEM mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei -80°C vorgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

### 5.2.3 Auftauen von Zellen

Die eingelagerten Zellen wurden in der Handfläche oder im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde nach Aufnahme in 10 ml zellspezifischem Medium für 10 Minuten bei 200 x g und 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 12 ml Kulturmedium resuspendiert und nach der Überführung in eine 250 ml Kulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Erreichen der Adhäsion wurde das Medium erneut gewechselt.

### 5.2.4 Zellkultur primärer Zellen

Für die Untersuchung immunologischer Ansätze wurden primäre dendritische Zellen aus dem Knochenmark und Lymphozyten aus der Milz der Maus gewonnen. Zur Generierung dendritischer Zellen wurde den getöteten Mäusen Femur und Tibia entnommen. Die Knochen wurden anschließend von Gewebe und Muskulatur befreit und in 70% Ethanol desinfiziert. Nach dem Entfernen der Enden konnten die Knochenmarkzellen mit PBS mittels einer Spritze (27 G Kanüle) ausgespült und durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gefiltert werden. Nach einer Zentrifugation (200 x g, 7 Minuten, 4°C)

wurde das Zellpellet in Erythrozyten-Lyse Puffer resuspendiert und nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Knochenmarkzellen wurden in DC-RPMI (10% FCS (v/v)), Penicillin und Streptomycin (0,1 mg/ml) resuspendiert und in 6 *well* Platten verteilt. Dabei wurden  $2-3 \times 10^6$  Zellen in 3 ml Primärzell-RPMI mit 50  $\mu$ l GM-CSF haltigem Überstand pro *well* ausgesät. Die primären dendritischen Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung für Tierversuche 7 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei an jedem zweiten Tag das Medium erneuert wurde.

Für die Gewinnung muriner Lymphozyten wurde den getöteten Mäusen die Milz entnommen und durch ein Zellsieb (Porengröße 40  $\mu$ m) vorsichtig gedrückt. Die Milz-Lymphozyten wurden dann mit PBS durch das Zellsieb nachgespült, kräftig geschüttelt und zentrifugiert (200 x g, 7 Minuten, 4°C). Nach einer Resuspension in Erythrozyten-Lyse Puffer und einer erneuten Zentrifugation (200 x g, 7 Minuten, 4°C), konnten die aufgereinigten Lymphozyten in serumfreien RPMI-Medium aufgenommen werden. Nach einer erneuten Vereinzelung durch ein Zellsieb konnte die Lymphozytensuspension für immunologische Assays verwendet werden.

### 5.2.5 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Zum Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wurde das lineare kationische Polymer Polyethylenimin (PEI, MW 25.000, 1 mg/ml) als Transfektionsreagenz verwendet. In Lösung bilden PEI und DNA durch elektrostatische Wechselwirkung stark kondensierte Aggregate mit einer leicht positiven Nettoladung. Das führt nach einer Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran zu einer erleichterten endocytotischen Aufnahme der PEI-DNA-Komplexe in die Zelle.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 6 cm Schalen ausgesät, durch gleichmäßiges Schwenken in 3 ml Kulturmedium homogen verteilt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Transfektionsansatz aus 5  $\mu$ g Gesamt-DNA, 15  $\mu$ l PEI (1 mg/ml) und 300  $\mu$ l serumfreies Medium wurde nach vorsichtigem Vortexen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und durch 1,5 ml serumfreies DMEM ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen pipettiert, durch Schwenken der Kulturschale gut verteilt und für 4 bis 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium für 24 bis 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 5.2.6 Transiente Transfektion mit Lipofectamine™

Die Liposomenpräparation Lipofectamine™ besteht aus kationischen und neutralen Lipiden, die in Lösung vorliegende DNA umschließen können und nach Fusion mit der Zellmembran die gebundene DNA endocytotisch in das Cytoplasma transferieren.

Wie bereits bei der PEI-Transfektion beschrieben, wurden am Tag vor der Transfektion  $1 \times 10^6$  Zellen in 6 cm Schalen ausgesät, durch gleichmäßiges Schwenken in 3 ml Kulturmedium homogen verteilt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurden 4  $\mu$ g Gesamt-DNA (2  $\mu$ g Expressionsplasmid, 0,5  $\mu$ g CMV-GFP Kontrollplasmid zur Transfektionseffizienz, 1,5  $\mu$ g pBS Nonsens-DNA) in eine Mischung aus 20  $\mu$ l Lipofectamine™ und 300  $\mu$ l OptiMEM gegeben, kurz gevortext und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und durch 1,5 ml OptiMEM ersetzt. Nach der Inkubation wurde das DNA-Lipofectamine-Gemisch auf die Zellen pipettiert, durch leichtes Schwenken verteilt und für 4 bis 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium für 24 bis 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 Präparation von Proteinextrakten aus Gewebe

Für die Gewinnung von Gesamtproteinextrakten wurden den getöteten Mäusen Leber-, Lungen- und Tumorgewebe entnommen und gründlich mit PBS auf Eis gewaschen. Die verschiedenen Gewebe

wurden mit einem Skalpell zerkleinert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 300  $\mu$ l 1 x Extraktionspuffer mit Hilfe eines Ultra-Turrax Homogenisators behandelt. Die homogene Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen für 10 Minuten bei 10000 x g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration für Luciferaseassays und SDS-PAGE verwendet.

### 5.3.2 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkultur

Die zu untersuchenden Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion oder Infektion mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur mit 300  $\mu$ l 1 x Extraktionspuffer oder RIPA-Puffer lysiert. Das Lysat wurde nach der Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei 10000 x g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration für SDS-PAGE verwendet.

### 5.3.3 Luciferaseassay

Bei der Luciferase-Messung wird mit Hilfe eines Luminometers emittiertes Licht quantifiziert, welches bei einer durch das Enzym Luciferase katalysierten Oxidation des Substrats Luciferin entsteht.

Die Infektion inokulierter Tumore (subkutan) und Lungenkolonien nach systemischer Gabe des onkolytischen Adenovirus hTert-AdLuc sowie die Infektion stabil transduzierter Zellen mit dem gleichen Adenovirus wurde anhand der Aktivität der viral eingeschleusten Luciferase quantifiziert. Den behandelten Mäusen wurde 72 Stunden nach der intravenösen Infektion mit hTERT-AdLuc Lungen- und Tumorgewebe entnommen, zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach dem Auftauen für 10 Minuten bei 10000 x g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Messung der Luciferaseaktivität in einem neuen Reaktionsgefäß auf Eis gelagert.

Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen 2 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 300  $\mu$ l 1 x Extraktionspuffer bei Raumtemperatur bis zur Lyse inkubiert. Das Zellysate wurde gründlich abgeschabt, für 10 Minuten bei 10000 x g, 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Nach Vermischen von 20 bis 50  $\mu$ l des Extraktionsüberstandes mit 300  $\mu$ l Luciferase Messpuffer wurde die Lumineszenz nach Zugabe von 100  $\mu$ l Luciferininjektionslösung und bei einer Messzeit von 10 sec am Luminometer ermittelt.

### 5.3.4 $\beta$ -Galactosidase-Assay

Diese Methode ermöglicht eine schnelle und effiziente Messung der Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase aus Extrakten transfizierter und infizierter Zellen. Dabei wird die Enzymaktivität in einer Farbreaktion bei der Umsetzung des zugeführten Substrates ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) spektrophotometrisch gemessen.

CHO- und CMT64- Zellen wurden am Vortag in 6 *well* Platten in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro *well* ausgesät und nach einer adenoviralen Infektion (AdLacZ, MOI 25, Infektionszeit 30 Minuten) für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Messung der Infektionseffizienz anhand der Aktivität des viral eingeschleusten  $\beta$ -Galactosidase- Gens wurden die Zellen 2 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 300  $\mu$ l 1 x Extraktionspuffer bei RT bis zur Lyse inkubiert. Das Zellysate wurde abzentrifugiert (10000 x g, 10 Minuten, 4°C) und 10  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 100  $\mu$ l  $\beta$ -Galactosidase Reaktionspuffer zur Messung der Enzymaktivität in einer 96 *well* Platte bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde bei einer leichten Gelbfärbung mit 50  $\mu$ l 1 M Natriumcarbonat abgestoppt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert (Zellextrakt aus nicht infizierten Zellen) gemessen.

### 5.3.5 Cytochemischer Nachweis von $\beta$ -Galactosidase (X- Gal staining)

Bei dieser Methode lässt sich die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase durch eine Blaufärbung der exprimierenden Zellen darstellen. In einer durch  $\beta$ -Galactosidase katalysierten Reaktion wird das zugegebene Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylgalactosid) zu einem blauen Präzipitat hydrolysiert, wodurch es zu einer Blaufärbung in den Zellen kommt, die das eingeschleuste  $\beta$ -Galactosidase Gen exprimieren.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in 6 *well* Platten in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro *well* ausgesät, für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend mit AdLacZ (MOI 25, Infektionszeit 30 Minuten) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen 2 x mit 2 ml PBS gewaschen und für 10 Minuten bei RT in absolutem Ethanol fixiert. Alternativ konnte zum Fixieren der Zellen auch ein Glutaraldehyd Puffer verwendet werden. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 2 ml PBS folgte die Überschichtung der Zellen mit 1,5 ml  $\beta$ -Galactosidase Färbelösung und eine Inkubation bei 37°C. Die Färbelösung wurde nach der deutlichen Blaufärbung der Zellen abgenommen und nach mehrmaligem Waschen mit PBS ersetzt. Die Infektionseffizienz wurde am Mikroskop dokumentiert.

### 5.3.6 Proteinassay nach Bradford

Der Bradford-Proteinassay ist eine gängige Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Der Assay beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Diese Methode diente der Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein aus Proteinaufreinigungen sowie aus Zell- und Gewebeextrakten.

Eine Mischung aus 2  $\mu$ l Zellextrakt bzw. Proteineluat in 798  $\mu$ l Wasser wurde mit 200  $\mu$ l Biorad-Dye-Reagent-Concentrate versetzt und gut durchgemischt. Die Färbung der Proben wurde in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration über eine BSA Eichgerade (0,5-12  $\mu$ g) bestimmt.

### 5.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus Zellextrakt oder Aufreinigung wurde in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt. Im SDS-Probenpuffer werden die Proteine durch das anionische Detergens denaturiert und in Polyanionen überführt. In der anschließenden Elektrophorese erfolgt die Auftrennung der Proteinproben im denaturierenden SDS-Gel aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Die Proteingröße wird anhand eines definierten Molekulargewichtsstandards abgeschätzt und die Proteinbanden können durch weitere Verfahren wie Coomassie Brilliant Blue Färbung und Western Blot Analyse dargestellt werden.

Die Proben aus 10 bis 20  $\mu$ g Proteinlösung wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 5 x SDS-Ladepuffer vermischt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Nach Auftragen der Proben und des definierten Standards auf ein 10%-iges SDS-Gel erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 30 mA im Sammelgel und 60 mA im Trenngel.

5 %-iges Sammelgel (add 5 ml)  
625  $\mu$ l 1M Tris/HCl pH 6,8  
850  $\mu$ l 30% Acrylamid/0,8% Bis  
3,47 ml H<sub>2</sub>O  
50  $\mu$ l 10%-ige APS-Lsg.  
5  $\mu$ l TEMED

10%-iges Trenngel (add 15 ml)  
3,75 ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8  
5 ml 30% Acrylamid/0,8% Bis  
6,1 ml H<sub>2</sub>O  
150  $\mu$ l 10%-ige APS-Lsg  
15  $\mu$ l TEMED

### 5.3.8 Western Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden mittels Western Blot spezifisch nachgewiesen. Die Proteinbanden werden in einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran (Immobilon<sup>®</sup>, Millipore) transferiert, wo sie für die spezifische Detektion durch primäre Antikörper zugänglich sind. Durch die Bindung sekundärer Peroxidase-gekoppelter Antikörper an die Erstantikörper, kann das gesuchte Protein anhand der Peroxidaseaktivität durch die Belichtung eines Röntgenfilms detektiert werden.

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteinbanden wurde in einer Semidry-Blotting Apparatur (Fastblot, Fa. Biometra) bei 30 Volt und 300 mA für 25 bis 40 Minuten durchgeführt. Dazu wurden das Gel und die zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran mit in Transferpuffer getränktem Filterpapier luftblasenfrei eingebettet. Durch eine 2-stündige Absättigung der Membran mit 5%-iger Magermilchlösung in TBS-Tween wurde der Anteil an unspezifischer Proteinbindung verringert. Nach kurzem Waschen in TBS-Tween wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert, der zuvor nach Herstellerangaben in 5%-iger Magermilchlösung in TBS-Tween verdünnt wurde. Anschließend wurde die Membran 3 x für 10 Minuten gewaschen und mit einer 1:10000 Verdünnung des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem erneuten mehrmaligen Waschen wurde die Membran mit 5 ml ECL-Substratmischung (ECL-Western-Blot analysis System-Enhanced Chemiluminescence, Fa. Amersham) entwickelt und die durch die Peroxidaseaktivität emittierte Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm dargestellt.

### 5.3.9 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Nach dem Auftrennen im SDS-Polyacrylamidgel können Proteinbanden mit dem Coomassie Brilliant Blue Farbstoff visualisiert werden. Durch dieses Färbeverfahren können die geladenen Proteinmengen bis zu der Nachweisgrenze von 2 µg pro Proteinbande semi-quantitativ bestimmt werden. Für die optische Bestimmung der Proteinbanden wurde eine fertige kolloidale Coomassie Lösung (Fa. Roth) nach Herstellerangaben verwendet.

### 5.3.10 Aufreinigung rekombinanter Adapterproteine

Die bispezifischen Adapterproteine CAR<sub>ex</sub>-Tat, CAR<sub>ex</sub>-VP22, GLAsc-pSia und CARsc-pSia wurden anhand ihres Histidin-*tags* mittels einer Ni-NTA Affinitätschromatographie aus dem Kulturmedium der jeweils mit dem entsprechenden Expressionsvektor stabil transduzierten 293 Zellen aufgereinigt. Dafür wurden die Zellen auf 25 Kulturflaschen (2% FCS (v/v) DMEM, 10 ml pro Flasche) expandiert und für 92 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei das Medium nach 48 Stunden ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden geerntet und zusammen mit den gesammelten Kulturüberständen nach einmaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 10 Minuten) und durch einen Filter (Porengröße 2 µm) in 75 cm<sup>2</sup> Suspensionskulturflaschen gefiltert. Zur Einstellung eines pH Wertes von 8,0 und zusätzlicher Optimierung der Bindungsbedingungen wurden die gefilterten Überstände (250 ml) mit 10 x Bindepuffer (1/10 Vol.) gemischt. Nach Zugabe von 900 µl Ni-NTA Agarose-*beads* (Fa. Qiagen) folgte eine Inkubation der Kulturüberstände in einem Überkopfschüttler über Nacht bei 4°C. Das ermöglichte die Interaktion der benachbarten Histidinreste der Adapterproteine mit den Ni<sup>2+</sup> Ionen der Chromatographiematrix. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 10 Minuten) wurden die Ni-NTA Agarose-*beads* mit den gebundenen Fusionsproteinen 2 x in 30 ml Waschpuffer geschwenkt und anschließend erneut sedimentiert (1200 rpm, 4°C, 10 Minuten). Nach dem gründlichen Entfernen des Überstandes wurden die rekombinanten Adapterproteine in einer 4 bis 5-stündigen Inkubation auf dem Überkopfschüttler (4°C) mit einem L-Histidin haltigen Elutionspuffer von den Ni-NTA Agarose-*beads* eluiert und nach einer anschließenden Zentrifugation (10000 x g, 10 Minuten, 4°C) in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde das proteinhaltige Eluat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der aufgereinigten Fusionsproteine wurde im Bradford-Proteinassay (Abschnitt 1.3.6) bestimmt und die Funktionalität mittels Luciferase- oder β-Galactosidase-Assay im Rahmen eines Infektionsversuches analysiert.

### 5.3.11 Enzymatischer Transaminasen Assay

Die enzymatische Aktivität der leberspezifischen Aminotransferasen GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) und GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) im Blutserum infizierter Mäuse wurde mit Hilfe der Alanin Transaminase (ALT) und Aspartat Transaminase (AST) Assay Kits (Fa. Bio Scientific) ermittelt. Der enzymatische Nachweis beider Enzyme beruht auf einem gekoppelten Reaktionsschema. Da während der Transaminierungsreaktion NADH reduziert wird, kann die Konzentration des entstandenen NAD<sup>+</sup> durch Messung der Extinktionsabnahme innerhalb des Absorptionsspektrums von NADH (340 nm) bestimmt werden. Die zeitliche Extinktionsabnahme ist der Aktivität der gemessenen Transaminase proportional.

Für die Messung wurden 10 µl Serumprobe mit 240 µl Reaktions Mix vermischt und die Extinktion sofort bei 340 nm gemessen. Die zweite Messung wurde exakt nach 5 Minuten durchgeführt und die Konzentration (U/l) der Transaminasen im Serum nach dem Herstellerprotokoll bestimmt.

### 5.3.12 Histologie

Für eine histologische Gewebeuntersuchung erfolgte im Rahmen einiger Tierversuche die Entnahme von Lungen zu definierten Zeitpunkten. Die Organe wurden zur Erhaltung ihrer Struktur für mindestens 24 Stunden in wässrigem Paraformaldehyd (4% Lösung) fixiert. Nach Überführung in spezielle Kassetten folgte die Weiterbehandlung der Gewebestücke in einer automatisierten Apparatur zur Gewebeeinfiltration (Leica TP 1020), die der Entwässerung und Klärung histologischer Gewebeproben mit anschließender Infiltration durch flüssiges Paraffin dient. Die Lungenproben durchliefen dabei folgende Schritte: Entwässerung in einer ansteigenden Ethanolreihe mit Ethanol 50%, 70%, 80%, 96%, 2x Ethanol absolut sowie 2x Xylol (jeweils 30 Minuten) und Infiltration mit 3x Paraffin bei 60°C (jeweils 30 Minuten). Nach der Einbettung der Proben zu ausgehärteten Paraffinblöcken erfolgte die Anfertigung histologischer Gewebeschnitte an einem Rotations-Mikrotom. Die 2µm dicken Gewebeschnitte wurden im Wasserbad bei 40°C gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet. Es folgte eine Entparaffinierung der Schnitte durch Inkubation in Xylol, einer Reihe absteigender Ethanolkonzentrationen (2x Ethanol absolut, Ethanol 96%, 70%, 50%) und H<sub>2</sub>O. Die Gewebeschnitte wurden anschließend einer Hämatoxylin/Eosin Färbung unterzogen. Dazu wurden die Gewebeproben für 30-90 Sekunden in Hämalaun gefärbt, in lauwarmem Wasser gebläunt und danach für 90 Sekunden mit Eosin eingefärbt. Nach der erneuten Inkubation in H<sub>2</sub>O, einer Reihe ansteigender Ethanolkonzentrationen (Ethanol 40%, 70%, 90%, 2x Ethanol absolut) sowie 2x Xylol wurden die histologischen Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt und im Mikroskop ausgewertet.

## 5.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation rekombinanter DNA wurden 100 µl kompetente Bakterien (*E. coli* JM 109) nach dem Auftauen auf Eis mit 1-20 ng Plasmid DNA oder 10-50 ng DNA aus einem vollständigen Ligationsansatz vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock (42°C, 90 Sekunden) wurden die Bakterien erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 900 µl SOC Medium aufgefüllt und bei 37°C für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf eine LB Agarplatte ausgestrichen. Die restlichen transformierten Bakterien wurden kurz bei 13000 rpm sedimentiert, in 100 µl SOC Medium resuspendiert und auf eine weitere LB Agarplatte ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden anschließend gemeinsam über Nacht bei 37°C inkubiert. Die LB Agarplatten enthielten Antibiotika entsprechend der Resistenzgene der transformierten Plasmide.

### 5.4.2 Transformation elektrokompenter Bakterien

Durch Elektroporation wird eine Steigerung der Transformationseffizienz besonders bei großen Plasmiden (zB. Adenovirusplasmide) erreicht.

Hierzu wurden 40 µl elektrokompente Bakterien (*E. coli* JM 109) langsam auf Eis aufgetaut und mit 5-100 ng DNA-Lösung vermischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) luftblasenfrei überführt und kurz gepulst (1,8 kV, 25 µF, 200 Ω Parallelwiderstand). Die transformierten Bakterien wurden in 900 µl SOC Medium aufgenommen und bei 37°C für 30 Minuten geschüttelt. LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit 100 µl Bakteriensuspension ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.4.3 Vermehrung transformierter Bakterien

Von den LB Agarplatten gepickte einzelne Bakterienklone wurden als Vorkultur in 2 ml LB Medium mit Antibiotikazusatz bei 37°C und 225 rpm über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Aus 1,5 ml der Bakteriensuspension konnte eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt werden. Für eine Midi- bzw. Maxi- Plasmidpräparation wurden 500 µl der Bakterienvorkultur in 300 bzw. 500 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika gegeben und bei 37°C und 225 rpm über Nacht geschüttelt.

### 5.4.4 Analytische Plasmidpräparation (Mini-Präp)

Diese Methode ermöglicht die schnelle Plasmidpräparation aus Vorkulturen einzelner, transformierter Bakterienklone. Die präparierten Plasmide konnten durch einen Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit im Agarosegel überprüft werden. Da die isolierte DNA nach einer Mini-Präparation stark verunreinigt ist, wird die Plasmid-DNA ausgewählter Bakterienklone durch eine Midi- oder Maxi-Präparation isoliert.

1,5 ml einer Vorkultur wurde im Reaktionsgefäß sedimentiert (13000 rpm, 60 Sekunden, RT), dekantiert und das Pellet in einem geringen Rest resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl STET-Puffer und 10 µl Lysozym wurde der Ansatz für 90 Sekunden bei 95°C erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation (20000 x g, 4°C 20 Minuten) wurde das Pellet mit einer sterilen Spitze entfernt und die DNA im Überstand mit 300 µl Isopropanol gefällt. Durch eine erneute Zentrifugation (20000 x g, 4°C 20 Minuten) wurde die präzipitierte Plasmid DNA pelletiert und in 100 µl Ethanol (70%) gewaschen. Das erneut sedimentierte DNA-Pellet wurde nach Entfernen des Ethanols an der Luft getrocknet und in 30-50 µl EB Puffer aufgenommen.

### 5.4.5 Präparative Plasmidpräparation (Midi-/Maxi-Präp)

Für die Isolierung von Plasmid DNA in höherer Reinheit und Ausbeute wurde das Plasmid Midi bzw. Maxi Kit und das EndoFree Buffer Set (Fa. Qiagen) verwendet. Die Methode wurde nach einem veränderten Protokoll des Herstellers zur Präparation endotoxinfreier Plasmid DNA durchgeführt, da bei Transfektionsexperimenten die Transfereffizienz durch endotoxinfreie DNA erhöht wird.

Die Bakterienkultur wurde bei 3800 x g und 4°C für 20 Minuten sedimentiert und das Pellet in 6 ml P1 resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte nach Zugabe von 6 ml P2 durch mehrmaliges Invertieren und einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz mit 5 ml vorgekühltem P3 durch erneutes Invertieren neutralisiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Mullbinden in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert, mit 1,5 ml ER Puffer vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Schritt war optional und wurde bei der Präparation von Zwischenvektoren, die nur für Klonierungen verwendet wurden, nicht durchgeführt. Zur Bindung der DNA wurde die Lösung auf eine zuvor mit 4 ml QBT Puffer äquilibrierte Qiagen Tipp 100 Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend 2 x mit 30 ml QC Puffer gewaschen und die Plasmid DNA mit 5 ml QF Puffer in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß eluiert. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und

sofort abzentrifugiert (13000 x g, 4°C, 30 Minuten). Das DNA Pellet wurde in 2 ml Ethanol (70%) gewaschen, nochmals zentrifugiert (13000 x g, 4°C, 5 Minuten) und nach Entfernen des Ethanols an der Luft getrocknet. Die Plasmid DNA wurde in 150 µl TE Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Ausbeute an Plasmid DNA nach der Midi-Präparation lag in der Regel bei 100-300 µg.

#### **5.4.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration einer DNA Lösung wird photometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine Extinktionsmessung von OD 1,0 ungefähr 50 µg/ml doppelsträngige DNA, 37 µg/ml einzelsträngige DNA oder 40 µg/ml RNA. Eine Verunreinigung der DNA Lösung durch Proteinrückstände kann durch eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Die Reinheit der gemessenen DNA Probe wird durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  dargestellt, wobei der Quotient bei geringer Verunreinigung von DNA zwischen 1,7-1,9 und von RNA zwischen 1,9-2,1 liegt.

Die DNA Proben wurden für die Konzentrationsbestimmung in TE Puffer (pH 8,0) verdünnt, der auch als Nullwert zum Abgleichen verwendet wurde. Geringere Mengen DNA konnten auch direkt im Agarosegel durch Vergleich mit der 1,6 kb Bande der 1 kb Leiter (Fa. Gibco) optisch abgeschätzt werden, da diese beim Auftragen von 10 µl einer Menge von 50 ng DNA entspricht.

#### **5.4.7 Agarose Gelelektrophorese**

Durch die Elektrophorese in der Agarose Gelmatrix können Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer negativen Ladung im gerichteten elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt, analysiert oder für weitere Verfahren aufgereinigt werden. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmente lassen sich nach Interkalation durch Ethidiumbromid bei Bestrahlung durch UV-Licht als fluoreszierende Banden optisch nachweisen.

Für analytische und präparative Gelelektrophoresen wurden 1 bis 2%-ige Gele in 1 x TAE Puffer mit 0,0005 Vol. Ethidiumbromid (10 mg/ml) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Vol. 10 x Ladepuffer vermischt und bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit 1 x TAE als Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

#### **5.4.8 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Aufreinigung**

Proteine und andere Zellrückstände lassen sich mit Hilfe dieser Methode aus DNA Lösungen entfernen.

Dazu wurden die DNA-Proben mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol zu einer homogenen Emulsion gevortext und nach anschließender Zentrifugation (15000 x g, RT, 2 Minuten) konnte die obere, wässrige Phase nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 4 Vol. Ethanol (100 %) für 30 Minuten bei -20°C gefällt werden. Nach einer erneuten Zentrifugation (20000 x g, 4°C, 15 Minuten) wurde der Überstand verworfen und die pelletierte DNA mit 100 µl Ethanol (70%) präzipitiert. Die aufgereinigte DNA wurde in TE pH 8,0 aufbewahrt.

#### **5.4.9 Aufreinigung geringer DNA-Mengen**

Für die Aufreinigung geringer DNA-Mengen aus enzymatischen Reaktionen wurde für DNA Fragmente von 100 bp bis 10 kb das QIAquick PCR Purification Kit und für kleinere Fragmente von 17 bis 100 bp das QIAquick Nucleotide Removal Kit (Fa. Qiagen) verwendet.

1 Vol DNA Lösung wurden mit 5 Vol Puffer PB (PCR-Purification) bzw. 10 Vol Puffer PN (Nucleotide Removal) vermischt und für 60 Sekunden bei 13000 rpm (6000 rpm bei Nucleotide Removal) auf eine QIAquick Säule gebunden. Die Säule wurde anschließend mit 750 µl PE Puffer für

60 Sekunden bei 13000 rpm (6000 rpm bei Nucleotide Removal) gewaschen. Nach einer Trockenzentrifugation (13000 rpm, RT, 60 Sekunden) konnte die gereinigte DNA im gewünschten Volumen mit EB Puffer von der Säule eluiert werden.

#### 5.4.10 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Nach dem Auftrennen der DNA Fragmente durch die Agarose Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA Banden mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Fa. Qiagen) aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Dazu wurde das unter UV-Licht fluoreszierende DNA Fragment aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit 300 µl QG Puffer pro 100 mg Gel vermischt. Das DNA haltige Gelstück wurde anschließend bis zur vollständigen Lösung bei 56°C geschüttelt und nach Zugabe von 1 Gel-Vol Isopropanol in eine QIAquick Säule überführt. Nach Bindung an die Säule (13000 rpm, RT, 60 Sekunden) wurde die DNA mit 750 µl PE-Puffer für 60 Sekunden bei 13000 rpm gewaschen und nach einer anschließenden Trockenzentrifugation (13000 rpm, RT, 60 Sekunden) konnte die extrahierte DNA im gewünschten Volumen mit EB-Puffer von der Säule eluiert werden.

#### 5.4.11 Rekombinante DNA Techniken

##### 5.4.11.1 Restriktionsspaltung von DNA

Durch Restriktionsendonukleasen werden DNA Doppelstränge an definierten, meist palindromischen Erkennungssequenzen gespalten. Dabei entstehen entweder stumpfe (*blunt*) oder 5'- bzw. 3'-überhängende (kohäsive) Enden am DNA-Strang.

Die enzymatische Spaltung von Plasmid DNA oder DNA Fragmenten aus PCR Ansätzen wurde mit Restriktionsenzymen und Puffern der Firma NEB bei 37°C nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Regel 1 U (Einheit) eines Enzyms schneidet 1 µg DNA in einer Stunde wurden die Enzyme in 3-bis 4-fachem Überschuss eingesetzt, wobei das Volumen der Enzymlösung maximal ein Zehntel des gesamten Restriktionsansatzes ausmachte.

##### 5.4.11.2 Dephosphorylierung von DNA

Nach dem enzymatischen Restriktionsverdau können linearisierte DNA-Vektoren intra- oder intermolekulare Reaktionen mit sich selbst eingehen. Um ein Religation der aufgetrennten DNA Enden zu verhindern wird die Vektor DNA vor der Ligationsreaktion mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) behandelt.

1 µg linearisierter Vektor wurde mit 1 Unit SAP für 1 Stunde bei 37°C dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde anschließend bei 75°C für 15 Minuten hitzeinaktiviert.

##### 5.4.11.3 Behandlung von DNA mit Klenow Polymerase

Das große Klenow Fragment der DNA Polymerase I (*E. coli*) kann bei DNA Fragmenten 5'-Überhänge auffüllen und 3'-Überhänge entfernen, es besitzt jedoch keine 5'→3' Exonukleaseaktivität. Zum Auffüllen der durch Restriktionsverdau erhaltenen 5'-Überhänge wurde 1 µg linearisierte Plasmid DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml mit 2 U des Klenow Fragments und dNTPs (50 µM) in Klenow Puffer für 30 Minuten bei 28°C inkubiert. Während der Reaktion erfolgte auch der Abbau von 3'-Überhängen. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA und Hitzeinaktivierung (75°C, 15 Minuten) der Klenow Polymerase abgestoppt.

#### 5.4.11.4 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Komplementäre DNA Einzelstränge (je 10 µg) wurden im gleichen Volumen TE Puffer (pH 8,0) für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Während des langsamen Abkühlens bei Raumtemperatur erfolgte die Hybridisierung der komplementären Einzelstränge zum DNA Doppelstrang. Der Ansatz wurde mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt und bei -20°C gelagert.

#### 5.4.11.5 Ligation von DNA Enden

Die nach Restriktionsspaltung entstandene homolog-kohäsive (*sticky ends*) bzw. stumpfe Enden (*blunt ends*) der DNA Fragmente werden in einer Ligationsreaktion miteinander verknüpft. Die Eigenschaft des Enzyms DNA Ligase, aufgebrochene Phosphodiesterbindungen der DNA wieder zu verknüpfen, macht es zu einem unverzichtbaren Werkzeug bei der *in vitro* Klonierung rekombinanter DNA.

Die Ligationsansätze wurden unter Verwendung des Enzyms T4 DNA Ligase (Fa. NEB) in T4 DNA Ligase Puffer unter Zusatz von 1 µl 10 mM ATP in einem Reaktionsvolumen von 20 µl bei 16°C über Nacht angesetzt. Bei kohäsiven Ligationen wurden der restringierte, dephosphorylierte Vektor und das zu ligierende Insert in einem molaren Verhältnis zwischen 1:6 und 1:50 (falls Insert <100 bp) bei einer angestrebten DNA Gesamtmenge von 500 ng eingesetzt. Die eingesetzte Menge an Insert DNA wurde folgendermaßen abgeschätzt:

$$\frac{\text{Vektormenge (ng)} \cdot \text{Insertgrösse (bp)}}{\text{Vektorgrösse (bp)}} \cdot \text{Mengenverhältnisfaktor} \left( \frac{\text{X}}{1} \right) = \text{Insertmenge (ng)}$$

Nach der Ligation wurde rekombinante Plasmid DNA in kompetente Bakterien transformiert, durch analytische Präparation isoliert und nach Restriktionsverdau im Agarosegel identifiziert.

#### 5.4.11.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion können anhand komplementärer Primer definierte DNA Fragmente spezifisch amplifiziert sowie gezielt verändert werden. Für die Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen und zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen wurde die Herculase™ Hotstart DNA Polymerase (Fa. Stratagene) oder die Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (Fa. Thermo Scientific) verwendet. Der Enzymkomplex beider Polymerasen enthält neben der Hauptkomponente *Pfu* Polymerase auch eine DNA bindende Domäne, wodurch die Prozessivität der Polymerasen erhöht und die PCR Reaktion verbessert wird.

In einem PCR Ansatz mit der Polymerase Herculase wurden 20 ng Plasmid DNA, jeweils 100 pmol Primer, 10 U Herculase™, 200 mM dNTPs in einem Gesamtvolumen von 100 µl in 1 x PCR-Puffer (Fa. Stratagene) vermischt. Die Polymerasereaktion wurde in einem Thermocycler (Fa. Biometra) in 25-35 Reaktionszyklen nach folgenden Zyklusparameter durchgeführt: Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 3 Minuten, Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, 30 Sekunden Hybridisierung, 60 Sekunden Polymerisation bei 72°C mit Verlängerung im letzten Zyklus auf 10 Minuten, Abkühlen auf 4°C. Die Temperatur des Hybridisierungszyklus lag 2°C unter der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Bei Verwendung degenerierter Primer zum Anhängen von Restriktionsschnittstellen wurden 5 Zyklen mit einer dem komplementären Bereich entsprechender Hybridisierungstemperatur vorgeschaltet. Anschließend folgten 30 Zyklen mit einer dem gesamten Primerbereich entsprechenden Hybridisierungstemperatur.

Die Schmelztemperatur von Primern ≤20 bp wurde anhand der Formel  $T_M = 2^\circ\text{C} \times (\text{AT}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{GC})$  und die für Primer ≥ 20 bp nach der Formel  $T_M = 59,9^\circ\text{C} + 0,41(\%GC) - 600/N$  (N = Primerlänge in bp) berechnet. Nach der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit dem PCR-Purification Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt.

#### 5.4.11.7 Quantitative PCR (qPCR)

Zur relativen Quantifizierung viraler DNA aus Gewebe infizierter Mäuse wurde der qPCR<sup>TM</sup> Mastermix Plus (Fa. Eurogentec) verwendet. Die Isolierung der DNA aus dem Gewebe mit anschließender Aufreinigung wurde mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Fa. Qiagen) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Für den qPCR-Reaktionsansatz wurden 10-100 ng Template-DNA, spezifische Primer (Hex-fw, Hex-rev, 3 µl aus 10 µM Primermix), Sonde (0.5 µl aus 10 µM Stock) und qPCR<sup>TM</sup> Mastermix Plus (12,5 µl) mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl vermischt. Die Hexon PCR (Primermix: Hex-fw / Hex-rev; Sonde: Hex-Sonde) wurde gegen endogene Templates mit käuflichen Kits normalisiert. Für humanes Genom wurde das Ubiquitin C Control Kit und für Maus Genom wurde das 18S Genomic Control Kit verwendet.

#### 5.4.11.8 Extraktion von RNA und Herstellung von cDNA

Isolierte mRNA aus eukaryotischen Zellen wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann anschließend als Ausgangsmaterial zur Amplifikation spezifischer Sequenzen durch PCR verwendet werden.

Die mRNA wurde mit peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup> (Fa. Peqlab), einer optimierten Säulen-freien Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, aus humanen, kleinzelligen Lungenkarzinomzellen isoliert. Hierzu wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen mit PBS gewaschen und 5 Minuten in 500 µl peqGOLD RNAPure<sup>TM</sup>-Reagenz lysiert. Das Zelllysat wurde nach Überführung in ein Reaktionsgefäß mit 0,2 ml Chloroform pro ml Reagenz vermischt und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 5 Minuten) wurde die wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt und inkubiert (RT, 10 Minuten). Die gefällte RNA wurde pelletiert (12000 x g, 4°C, 10 Minuten), mit Ethanol (75%) gewaschen und in RNase freiem Wasser aufgenommen. Nach Behandlung mit DNase (FA. Promega) wurde Konzentration und Reinheit der isolierten RNA photometrisch bestimmt.

Die reverse Transkription der mRNA wurde mit dem Taqman Reverse Transcription Kit (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz wurden Endkonzentrationen von 2 µg RNA, 2000 µM dNTP-Mix (500 µM/dNTP), 2,5 µM Oligo dT, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 U/µl RNase Inhibitor und 1,25 U/µl MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase in 100 µl Gesamtvolumen mit 1x TaqMan RT-Puffer eingesetzt. Im Anschluss an die reverse Transkription wurde die cDNA (20 ng/µl) direkt für weitere PCR-Reaktionen verwendet.

### 5.5 Immunologische Methoden

#### 5.5.1 ELISpot Assay

Der ELISpot Assay (*Enzyme-linked immunosorbent spot assay*) ermöglicht die Messung der Zytokinfreisetzung einzelner sezernierender Immunzellen. Zur Quantifizierung einzelner IFN  $\gamma$  sezernierender Zellen aus einer Milzzellsuspension wurde eine HTS Multiscreen<sup>TM</sup> 96-well Platte (Fa. Millipore) für 10 Minuten mit 200 µl Ethanol (35 %) aktiviert und anschließend 2 x mit 300 µl PBS gewaschen. Daraufhin wurde die ELISpot Platte mit 100 µl anti Maus IFN  $\gamma$  Antikörper (Klon AN-18, 7,5 µg/ml in ELISA-Puffer) pro well über Nacht bei 4°C beladen. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 300 µl PBS folgte das Blocken der Platte mit 300 µl RPMI Medium (10% FCS (v/v)) pro well für 2-4 Stunden bei 4°C. Im Anschluss wurden 2 x 10<sup>5</sup> bis 5 x 10<sup>5</sup> Zellen einer Einzelzellsuspension in 100 µl RPMI Medium (2% FCS (v/v)) mit dem entsprechenden Peptid (1 µg/ml) versetzt und für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Für jedes eingesetzte Peptid wurde eine Achtfachbestimmung durchgeführt und als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen verwendet. Nach der Stimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gründlich entfernt und die 96-well Platte mit 100 µl Biotin konjugierten anti Maus IFN  $\gamma$  Antikörper (Klon R4-6A2, 1µg/ml in FACS-Puffer) pro well für 90 Minuten bei RT geschwenkt. Es folgten zwei

Waschschritte mit 300 µl PBS pro well für 5 Minuten und anschließend die Inkubation mit jeweils 100 µl HRP-Avidin-Konjugat (0.5 µg/ml in FACS-Puffer) für 60 Minuten bei RT auf dem Schüttler. Die Platte wurde danach viermal für 5 Minuten mit 300 µl PBS gründlich gewaschen und mit 100 µl DAB-Substrat bis zur deutlich sichtbaren Entstehung der „Spots“ entwickelt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Spülen der Platte und Inkubation im Wasserbad gestoppt. Im Anschluss wurden nach dem Trocknen der Platte die IFN  $\gamma$  Spots quantifiziert.

## 5.5.2 FACS Analyse

Zur Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer wurden Antikörper und sekundäre Farbreagenzien der Firma eBioscience verwendet.

Im FACS Röhrchen wurden 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, für 5 Minuten bei 250 x g, 4°C abentrifugiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für die Färbung wurde der entsprechende primäre Antikörper in der Konzentration nach Herstellerangaben zugegeben und die FACS Röhrchen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen der Primärfärbung durch Zugabe von 1 ml FACS Puffer wurde der Überstand nach Pelletieren der Zellen (250 x g, 4°C, 5 Minuten) abgenommen. Die Sekundärfärbung der Zellen mit biotinylierten Antikörpern wurde für 20-30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Dazu wurden die sekundären Streptavidin-Konjugate in 100µl FACS-Puffer in den Verdünnungen 1:100 SA-FITC oder 1:500 SA-APC angesetzt. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit 1 ml FACS Puffer gewaschen und zur Analyse in 350 µl FACS-Puffer aufgenommen. Zur FACS Analyse wurden die Proben mit dem Gerät FACS Canto<sup>TM</sup> II (Fa. BD) aquiriert und mit der Software FACS-Diva bzw. FlowJo analysiert.

## 5.5.3 Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorantigenen

Zur Induktion einer zellulären Immunantwort gegen Tumorantigenen wurden isolierte dendritische Zellen vor der Vakzinierung entweder mit Lysat aus Tumorzellen oder mit entsprechendem Antigen in Peptidform beladen. Die antigenspezifischen Peptide wurden in DMSO gelöst (2 µg/µl) und bei -80°C gelagert.

Am sechsten Tag einer Knochenmarkskultur zur Generierung von dendritischen Zellen (Abschnitt 1.2.4) wurde das Medium aus den 6-well Platten vorsichtig abgenommen und durch 3 ml RPMI Nährmedium für Primärzellen ersetzt, welches mit 50 µl GM-CSF haltigem Überstand, antigenspezifischem Peptid (0,5 µg/ml) und zur Aktivierung der dendritischen Zellen mit Poly I:C (1µg/ml) versetzt war. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und nach dem Ablösen durch enzymfreien Zelldissoziations Puffer mit den zuvor aus dem Überstand gesammelten dendritischen Zellen vereint. Anschließend wurden die Zellen gezählt und für dendritische Zellvakzinierung im Tierversuch eingesetzt.

## 5.6 Virale Arbeitstechniken

### 5.6.1 Retrovirale Transduktion von Zellen

Zur stabilen Expression rekombinanter Adapterproteine (CARsc-pSia, GLAsc-pSia) oder Tumor-assoziiierter Oberflächenantigene (PolySia) wurden 293 bzw. CMT64 Zellen stabil transduziert. Die Generierung transgener Zelllinien erfolgte durch wiederholte Transduktion VSV-G pseudotypisierter retroviraler Partikel und anschließender Selektion in Antibiotika haltigem Medium.

Zur Generierung retroviraler Partikel im Zellüberstand wurden 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen der Verpackungszelllinie Phoenix-ampho mit 5 µg Gesamt-DNA der Plasmide pVSV-G und pQCXI N/P in 6 cm Schalen transfiziert. Anschließend wurde das Retrovirus haltige Medium gefiltert, mit Polybren (4µg/ml) vermischt und auf die Zielzellen gegeben. Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurden Überstände von zwei Schalen Phoenix-ampho Zellen über mehrere Tage für eine Schale Zielzellen

verwendet. Nach den Infektionszyklen wurden die transduzierten Zellen in Selektionsmedium expandiert und auf Expression des Transgens untersucht.

### 5.6.2 Präparation adenoviraler DNA

Zur Klonierung rekombinanter Adenoviren wurde als adenoviraler Zielvektor pAdHM4 verwendet, ein 30,3 kb großer Vektor mit *Pac* I flankierten Sequenzen, die eine Replikation in *E. coli* unter Selektion mit Ampicillin ermöglichen. Die Genomsequenzen in AdHM4 haben Deletionen im E1 und E3 Bereich, wobei die E1 DNA durch die Zielsequenzen (Polylinker) zur Insertion heterologer DNA ersetzt wurde. Die heterologe DNA wurde nach einer Zwischenklonierung in den speziellen *shuttle*-Vektor pHM3 über *I-Ceu* I und *PI-Sce* I isoliert und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den Zielvektor pAdHM4 ligiert.

Zur Präparation des in pHM3 enthaltenen Inserts wurden zunächst 2 µg des *shuttle*-Vektors mit 5 U *PI-Sce* I über Nacht bei 37°C verdaut und nach Aufreinigung mit QIAquick PCR Purification Kit für maximal 2 Stunden mit 1 U *I-Ceu* I bei 37°C inkubiert. Nach Auftrennung der verdauten DNA durch Gelelektrophorese wurde das Insert aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraktion Kit extrahiert und in 15 µl EB-Puffer eluiert.

Der Vektor pAdHM4 wurde aufgrund seiner Größe und Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften nach einer Mini-Präparation durch eine Phenol/Chloroform Isoamylalkohol Extraktion aufgereinigt und nach dem Restriktionsverdau mit *I-Ceu* I / *PI-Sce* I erneut mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und in 10 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Die Konzentration der restringierten Insert und Vektor DNA wurde im Agarosegel abgeschätzt.

Das heterologe Insert wurde durch eine *in vitro* Ligation in den adenoviralen Vektor in einem molaren Vektor:Insert Verhältnis von 1:4 bis 1:6 ligiert. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend nach Zugabe von 1 µl T4 DNA Ligase weitere 4-6 Stunden bei 4°C gelagert. Für die Transformation in elektrokompente Bakterien wurden 1,5 µl Ligationsansatz verwendet.

### 5.6.3 Präparation adenoviraler Plasmide und infektiöser Viren

Da adenovirale Ligationsansätze aufgrund der DNA Größenverhältnisse eher eine geringe Ligationseffizienz aufweisen, erfolgt die Transformation der viralen Plasmide durch Elektroporation. Von den über Nacht inkubierten Ampicillin LB Agarplatten wurden nur kleine Kolonien ausgewählt und in 2 ml LB mit 125 µg Ampicillin für 6 Stunden bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Nach anschließender Mini-Plasmidpräparation wurden durch analytischen Restriktionsverdau die adenoviralen Vektoren nachgewiesen. Mit der Bakteriensuspension positiver Klone wurde in 400 ml mit Carbenicillin (Ampicillin Derivat) eine Vorkultur für 10-16 Stunden angesetzt. Die durch Midi-Präparation isolierte endotoxinfreie, adenovirale DNA wurde zur Transfektion in permissive Zellen verwendet.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten replikationskompetenten Adenoviren (hTERT-Ad, hTERT-AdLuc, hTERT-AdGFP, Ad499) und replikationsdefiziente Adenoviren (AdLacZ, AdGFP) wurden in der permissiven Zelllinie 293 vermehrt. Da in 293-Zellen die adenovirale E1 Region stabil im Genom integriert ist, wird in diesen Zellen die Vermehrung von Adenoviren ermöglicht, die eine Deletion im E1 und E3 Bereich aufweisen.

Zur Herstellung infektiöser adenoviraler Partikel wurden adenovirale Plasmide mit *Pac* I linearisiert und in 293 Zellen transfiziert. Die Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease *Pac* I führt zur Freisetzung der ITR Sequenzen (*inverted terminal repeats*) und zum Verlust der für die stabile Replikation in *E. coli* notwendigen DNA Abschnitte. Dazu wurden 5 µg Adenovirus Plasmid mit *Pac* I über Nacht inkubiert und anschließend zur PEI Transfektion (Abschnitt 1.2.5) der Zelllinie 293 verwendet (1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen in T25 Zellkulturflaschen). Die transfizierten Zellen wurden für 5-6 Tage in DMEM (2% FCS (v/v)) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und durch drei Einfrier und Auftau Zyklen lysiert. Im Anschluss einer zehnminütigen Zentrifugation bei 500 x g und 4°C wurde der abgenommene Überstand zur Infektion neuer 293 Zellen (1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen in T25-Zellkulturflaschen, (2% FCS (v/v))) eingesetzt. Nach 60 Stunden wurden die Zellen nach oben beschriebener Prozedur

geerntet und der virushaltige Überstand für weitere Infektionszyklen bis zum Eintritt eines cytopathischen Effekts (CPE) verwendet. Der CPE beinhaltet die morphologische Veränderung (Zellabrundung) und den Verlust der Adhäsionsfähigkeit adenoviral infizierter Zellen. Anschließend erfolgte die Präparation rekombinanter Adenoviren im größeren Maßstab.

#### 5.6.4 Vermehrung und Präparation von Adenoviren

Permissive 293 Zellen wurden in T75 Zellkulturflächen bei einer Konfluenz von 80-90% mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10 infiziert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Mit der MOI wird das zahlenmäßige Verhältnis der infektiösen Partikel pro Zielzelle beschrieben. Der geeignete Erntezeitpunkt der infizierten Zellen konnte aufgrund des einsetzenden cytopathischen Effekts nach 48-60 Stunden Inkubation gewählt werden.

Für eine hohe Ausbeute an infektiösen Viruspartikel wurden 293 Zellen auf mindestens 20 Zellkulturflaschen ausgesät und in 2%-igem DMEM-Medium infiziert. Nach Einsetzen des CPE wurden die abgelösten Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden alle Zellpellets in 6 ml Dialysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Um die viralen Partikel vollständig aus den Zellen zu isolieren wurde die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, wieder aufgetaut und kräftig gevortext. Nach anschließender Zentrifugation der Suspension (2000 x g, 4°C, 10 Minuten) wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei das Pellet nach Zugabe von 2 ml Dialysepuffer erneut sedimentiert wurde. Nach dem Vereinen des Überstandes mit dem Überstand der ersten Zentrifugation erfolgte die Anreicherung und Aufreinigung der Adenoviruspräparation auf einem Cäsiumchlorid Stufengradienten. Dazu wurde in einem Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Fa. Beckmann) für den Rotor SW32 der Gradient aus jeweils 3,5 ml CsCl<sub>2</sub> der Dichten 1,4 g/ml und 1,2 g/ml aufgebaut und anschließend mit der 7 ml Virussuspension vorsichtig beschichtet. Die Ultrazentrifugation (Rotor SW32, Fa. Beckmann) erfolgte für 4 Stunden bei 27000 rpm und 4°C. Im Anschluss konnte die angereicherte Virusbande mittels einer feinen Kanüle (Ø 0,8 mm, Fa. Braun) durch seitliches Einstechen in das Röhrchen aus dem CsCl<sub>2</sub> Gradienten gezogen werden. Die Viruslösung wurde mit 1 Volumen 2 x Lagerungspuffer vermischt und bei -20°C gelagert. Zur Nutzung im Tierversuch wurde die Viruslösung zum Entfernen des Lagerungspuffers und des Cäsiumchlorids in einer Dialysekassette gegen physiologischen Puffer dialysiert und anschließend bei -80°C kurzfristig gelagert.

Der Gehalt an viralen Partikeln wurde durch die photometrische Bestimmung der OD bei 260 nm einer 1:20 Verdünnung in 0,1 % SDS ermittelt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht 10<sup>12</sup> viralen Partikeln pro ml. Die Konzentration an infektiösen Partikeln (pfu) pro Volumeneinheit stellt das Maß für die Infektiosität einer Viruspräparation dar und kann durch eine Infektionsquantifizierung (*Rapid Titer*) bestimmt werden.

#### 5.6.5 Bestimmung des Titers infektiöser Adenoviren

Da durch die Bestimmung der optischen Dichte lediglich die Gesamtzahl der Viruspartikel ermittelt werden kann, wurde die tatsächliche Infektiosität der adenoviralen Partikel mit Hilfe des Adeno-X Rapid Titer Kit (Fa. Clonotech) quantifiziert. Diese Titerbestimmung basiert auf der immuncytometrischen Färbung des adenoviralen Hexonproteins in infizierten Einzelzellen.

Dazu wurden am Vortag permissive 293 Zellen in eine 24 well Platte (1,7 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well) ausgesät und mit einer Verdünnungsreihe von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-8</sup> der Adenoviruspräparation infiziert. Nach 42-48 Stunden wurde der infizierte Zellrasen vorsichtig gewaschen (500 µl PBS), für kurze Zeit an der Luft getrocknet und danach mit Ethanol bei -20°C fixiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung einzelner Infektionsereignisse nach Herstellerprotokoll. Angefärbt wurden die wells, die zwei logarithmische Verdünnungsstufen höher lagen als das well mit mikroskopisch erkennbarem cytopathischen Effekt. Die Berechnung des infektiösen Titers erfolgte anhand der Zählung gefärbter Einzelzellen im Lichtmikroskop bei definierter Vergrößerung nach folgender Formel:

$$\text{pfu/ml} = \frac{X \cdot Y}{\text{Vf} \cdot \text{Vol}}$$

pfu:	infektiöse Partikel
Vf:	Verdünnungsfaktor
Vol:	eingesetztes Virusvolumen
X:	Mittelwert gefärbter Zellen im Sichtfeld
Y:	Faktor für die Anzahl der Sichtfelder für ein <i>well</i> bei definierter Vergrößerung
	10x = 79
	20x = 331

## 5.7 Tierexperimentelle Methoden

Verwendet wurden weibliche, spezifisch pathogenfreie Mäuse der Inzuchtstämme NMRI nu/nu und C57/BL6 im Alter von 5-8 Wochen, die aus der Tierzucht des zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover oder von der Firma Charles River bezogen wurden. Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu sechs Tieren in durchsichtigen Polycarbonat-Käfigen (Fa. Makrolon) des Typs II auf staubfreiem Weichholzgranulat unter folgenden Bedingungen gehalten: Raumtemperatur 22 +/- 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55+/- 5 %, Belichtung 07.00 bis 18.00 MEZ, kontinuierliche Fütterung mit einer pelletierten, autoklavierten Alleindiät (Fa. Altromin, Gesamtprotein 19 %, Fett 4 %, N-freie Extraktstoffe 50,5 %. Steriles Leitungswasser wurde über Tränkflaschen zugeführt. Die Tiere wurden hinter einer Infektionsbarriere gehalten und monatlich auf Erregerfreiheit entsprechend der GV-SOLAS-Liste getestet.

Für die Auswertung nach Versuchende oder zur Gewinnung primärer Zellen wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation und nachfolgendem Genickbruch getötet. Nach der Tötung wurde den Mäusen gegebenenfalls zur Serumanalyse das Blut aus dem Herzen abgenommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche und Tötungen zur Isolierung primärer Zellen erfolgten gemäß dem Tierversuchsantrag 08/1578 und der Anzeige §04/86.

### 5.7.1 Tumoretablishung

Zur Etablierung von Lungenkolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms wurden 5 x 10<sup>5</sup> CMT64 Zellen intravenös in eine der Kollateralvenen des Mausschwanzes injiziert. Die vereinzelt Zellen wurden in einer Infusionslösung (0,9% NaCl) oder in serumfreien DMEM-Medium aufgenommen und in einem Volumen von 150 µl pro Maus mit Hilfe einer 27 G Injektions-Kanüle appliziert.

Die Etablierung solider Tumore der Zelllinien CMT64, H146 und TE671 erfolgte durch eine subkutane Inokulation von 10<sup>7</sup> Zellen in die Flanke der Maus. Die Zellen wurden in serumfreien DMEM-Medium in 50 µl Endvolumen aufgenommen und mit einer 24 G Injektionskanüle verabreicht. Dazu wurden die Tiere durch eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Die Mäuse wurden 15 Tage nach der intravenösen Applikation der Tumorzellen bzw. bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 0,4-0,6 cm therapeutisch behandelt oder auf eine gezielte adenovirale Infektion des Tumorgewebes untersucht. Nach der Zellapplikation wurden die Tiere täglich beobachtet und bei Anzeichen von übermäßiger Belastung und Schmerzen getötet.

### 5.7.2 Dendritische Zellvakzinierung

Im Rahmen der therapeutischen Behandlung von Lungenkolonien des kleinzelligen Lungenkarzinoms und solider subkutaner Tumore erfolgte drei Tage nach Verabreichung onkolytischer Adenoviren eine Applikation mit dendritischen Zellen. Zur therapeutischen Vakzinierung wurden 5 x 10<sup>5</sup> aktivierte und mit Antigen Peptid oder Lysat von Tumorzellen beladene dendritische Zellen in den Bereich zwischen Tumor und inguinalen Lymphknoten subkutan appliziert. Als eine zweite Möglichkeit der Vakzinierung wurde die intravenöse Injektion der vorbehandelten dendritischen Zellen in einer Zellzahl von 1-2 x 10<sup>6</sup> in die Schwanzvene eingesetzt.

### 5.7.3 Applikation onkolytischer Adenoviren

Zur therapeutischen Behandlung und zur Untersuchung der gezielten Infektion von Tumorzellen (transduktionelles Retargeting) erfolgte die Applikation der rekombinanten Adenoviren je nach Versuchsaufbau intratumoral oder intravenös über die Schwanzvene. Die viralen Partikel wurden intratumoral in einer Dosis von  $0,5 \times 10^8$  pfu/g Körpergewicht und in einem Injektionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  verabreicht. Zum spezifischen Retargeting polysialylierter Oberflächen auf Tumorzellen wurden onkolytische Adenoviren mit bispezifischen Fusionsproteinen beschichtet. Dazu wurden  $5-8 \times 10^8$  infektiöse Partikel mit 100  $\mu\text{l}$  Eluat des aufgereinigten, bispezifischen Adapterproteins CARsc-pSia vermischt und bei 4°C unter leichtem Schütteln für eine Stunde inkubiert. Zur systemischen Applikation wurden die behandelten Adenoviren mit serumfreien DMEM Medium auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  eingestellt und intravenös in die Kollateralvene injiziert. Für die Virusgabe wurde in beiden Fällen 27 G Injektionskanülen verwendet.

Da nach einer systemischen Applikation bis zu 90% der Adenoviren innerhalb des Lebergewebes von Kupffer-Zellen abgefangen und zerstört werden können, wurden in einigen Tierversuchen vor der Virusgabe die Kupffer-Zellen depletiert. Eine transiente Depletion der Kupffer-Zellen und anderer Makrophagen wurden durch eine intravenöse Gabe von Gadoliniumchlorid ( $\text{GdCl}_3$ ) erreicht.  $\text{GdCl}_3$  wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgelöst und in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht und einem Injektionsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  ungefähr 30 Stunden vor der Virusgabe intravenös verabreicht.

### 5.7.4 *In vivo* Imaging

Das Beschichten adenoviraler Partikel mit dem bispezifischen Adapter CARsc-pSia führt zu einem gerichteten Tropismus der Viren zu polysialyliertem Tumorgewebe und Lungenkolonien. Dieses transduktionale Retargeting der Adenoviren zu Tumorzellen konnte nach systemischer Applikation des Luciferase exprimierenden Adenovirus hTERT-AdLuc durch Darstellung der Biolumineszenz in einem optischen Imaging-System untersucht werden.

Die Quantifizierung der *in vivo* Luciferaseaktivität erfolgte 48-72 Stundennach systemischer Infektion der Tiere mit CARsc-pSia beschichtetem, onkolytischen Adenovirus hTERT-AdLuc. Die Messung der Mäuse oder entnommener Gewebe (Lunge, Leber, subkutaner Tumor) wurde mit dem Gerät Xenogen IVIS-200 Optical Imaging System durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Gabe von Ketamin/Rompun (450  $\mu\text{l}$  Ketamin 100 mg/ml, 50  $\mu\text{l}$  Rompun 2% ad 5 ml mit isotonomischer NaCl Lösung) mit D-Luciferin Natriumsalz (585  $\mu\text{g}$  pro Maus) im Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l}$  narkotisiert. Die Tiere wurden 10 Minuten nach der Narkose in die IVIS Messkammer gelegt, wo die Photonenemission für 30 Sekunden bis maximal 2 Minuten quantifiziert wurde. Die Auswertung und Bildbearbeitung der *in vivo* Luciferaseaktivität wurde mit Hilfe der Software Living Image 3D™ durchgeführt.

## 5.8 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde in dieser Arbeit mittels *Logrank* Test und *parametric, unpaired t*-Test mit der Software GraphPad Prism berechnet.

## 6 Literaturverzeichnis

Aghi M and Martuza RL (2005) Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene*, **24**, 7802-7816.

Akiyama M, Thorne S, Kirn D, Roelvink PW, Einfeld DA, King CR, and Wickham TJ (2004) Ablating CAR and integrin binding in adenovirus vectors reduces nontarget organ transduction and permits sustained bloodstream persistence following intraperitoneal administration. *Mol Ther*, **9**, 218-230.

Alba R, Bradshaw AC, Parker AL, Bhella D, Waddington SN, Nicklin SA, van RN, Custers J, Goudsmit J, Barouch DH, McVey JH, and Baker AH (2009) Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer. *Blood*, **114**, 965-971.

Alemanly R, Suzuki K, and Curiel DT (2000) Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol*, **81**, 2605-2609.

Alimonti J, Zhang QJ, Gabathuler R, Reid G, Chen SS, and Jefferies WA (2000) TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells in vivo. *Nat Biotechnol*, **18**, 515-520.

Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M, Barnes MN, Strong TV, Arani RB, Arafat W, Hughes JV, Siegal GP, and Curiel DT (2000) Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther*, **2**, 524-530.

Armentano D, Smith MP, Sookdeo CC, Zabner J, Perricone MA, St George JA, Wadsworth SC, and Gregory RJ (1999) E4ORF3 requirement for achieving long-term transgene expression from the cytomegalovirus promoter in adenovirus vectors. *J Virol*, **73**, 7031-7034.

Armentano D, Zabner J, Sacks C, Sookdeo CC, Smith MP, St George JA, Wadsworth SC, Smith AE, and Gregory RJ (1997) Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J Virol*, **71**, 2408-2416.

Arnberg N, Kidd AH, Edlund K, Nilsson J, Pring-Akerblom P, and Wadell G (2002) Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology*, **302**, 33-43.

Belousova N, Korokhov N, Krendelshchikova V, Simonenko V, Mikheeva G, Triozzi PL, Aldrich WA, Banerjee PT, Gillies SD, Curiel DT, and Krasnykh V (2003) Genetically targeted adenovirus vector directed to CD40-expressing cells. *J Virol*, **77**, 11367-11377.

Belousova N, Krendelchchikova V, Curiel DT, and Krasnykh V (2002) Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *J Virol*, **76**, 8621-8631.

Belousova N, Mikheeva G, Gelovani J, and Krasnykh V (2008) Modification of adenovirus capsid with a designed protein ligand yields a gene vector targeted to a major molecular marker of cancer. *J Virol*, **82**, 630-637.

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

Bernt KM, Ni S, Tieu AT, and Lieber A (2005) Assessment of a combined, adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy. *Cancer Res*, **65**, 4343-4352.

- Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, and Flanagan JM (1999) Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*, **286**, 1579-1583.
- Bilzer M, Roggel F, and Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, **26**, 1175-1186.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, and McCormick F (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.
- Bouri K, Feero WG, Myerburg MM, Wickham TJ, Kovesdi I, Hoffman EP, and Clemens PR (1999) Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum Gene Ther*, **10**, 1633-1640.
- Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY, Horowitz JA, Shahin M, Bueckers T, Petrauskas S, Kreienberg R, Slamon D, and Pegram M (2002) A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*, **9**, 553-566.
- Carlisle RC, Di Y, Cerny AM, Sonnen AF, Sim RB, Green NK, Subr V, Ulbrich K, Gilbert RJ, Fisher KD, Finberg RW, and Seymour LW (2009) Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1. *Blood*, **113**, 1909-1918.
- Chaudhry A, Carrasquillo JA, Avis IL, Shuke N, Reynolds JC, Bartholomew R, Larson SM, Cuttitta F, Johnson BE, and Mulshine JL (1999) Phase I and imaging trial of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients with lung cancer. *Clin Cancer Res*, **5**, 3385-3393.
- Chen CY, May SM, and Barry MA (2010) Targeting adenoviruses with factor x-single-chain antibody fusion proteins. *Hum Gene Ther*, **21**, 739-749.
- Chen M, Barnfield C, Naslund TI, Fleeton MN, and Liljestrom P (2005) MyD88 expression is required for efficient cross-presentation of viral antigens from infected cells. *J Virol*, **79**, 2964-2972.
- Chillon M, Lee JH, Fasbender A, and Welsh MJ (1998) Adenovirus complexed with polyethylene glycol and cationic lipid is shielded from neutralizing antibodies in vitro. *Gene Ther*, **5**, 995-1002.
- Corjon S, Wortmann A, Engler T, van RN, Kochanek S, and Kreppel F (2008) Targeting of adenovirus vectors to the LRP receptor family with the high-affinity ligand RAP via combined genetic and chemical modification of the pIX capsomere. *Mol Ther*, **16**, 1813-1824.
- Curtis S, Wilkinson GW, and Westmoreland D (1998) An outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 37. *J Med Microbiol*, **47**, 91-94.
- Davydova J, Le LP, Gavrikova T, Wang M, Krasnykh V, and Yamamoto M (2004) Infectivity-enhanced cyclooxygenase-2-based conditionally replicative adenoviruses for esophageal adenocarcinoma treatment. *Cancer Res*, **64**, 4319-4327.
- de Jong JC (1996) [Adenoviruses as causative agents in gastroenteritis]. *Ned Tijdschr Geneesk*, **140**, 536-541.
- De GB, Snoeys J, Van LS, Lievens J, and Collen D (2005) Elimination of innate immune responses and liver inflammation by PEGylation of adenoviral vectors and methylprednisolone. *Hum Gene Ther*, **16**, 1439-1451.
- Delgado C, Pedley RB, Herraiez A, Boden R, Boden JA, Keep PA, Chester KA, Fisher D, Begent RH, and Francis GE (1996) Enhanced tumour specificity of an anti-carcinoembryonic antigen Fab' fragment by poly(ethylene glycol) (PEG) modification. *Br J Cancer*, **73**, 175-182.

- Di Paolo NC, Tuve S, Ni S, Hellstrom KE, Hellstrom I, and Lieber A (2006) Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses. *Cancer Res*, **66**, 960-969.
- Dmitriev I, Kashentseva E, Rogers BE, Krasnykh V, and Curiel DT (2000) Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol*, **74**, 6875-6884.
- Dmitriev IP, Kashentseva EA, and Curiel DT (2002) Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol*, **76**, 6893-6899.
- Doronin K, Shashkova EV, May SM, Hofherr SE, and Barry MA (2009) Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic adenovirus. *Hum Gene Ther*, **20**, 975-988.
- Eckhardt M, Muhlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M, and Gerardy-Schahn R (1995) Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature*, **373**, 715-718.
- Enders JF, BELL JA, DINGLE JH, FRANCIS T, Jr., HILLEMANN MR, Huebner RJ, and PAYNE AM (1956) Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, **124**, 119-120.
- Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, and Wilson JM (1994) Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6196-6200.
- Fasbender A, Zabner J, Chillon M, Moninger TO, Puga AP, Davidson BL, and Welsh MJ (1997) Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 6479-6489.
- Fisher KD, Stallwood Y, Green NK, Ulbrich K, Mautner V, and Seymour LW (2001) Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther*, **8**, 341-348.
- Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, and Wilson JM (1996) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, **217**, 11-22.
- Franks LM, Carbonell AW, Hemmings VJ, and Riddle PN (1976) Metastasizing tumors from serum-supplemented and serum-free cell lines from a C57BL mouse lung tumor. *Cancer Res*, **36**, 1049-1055.
- Freimuth P, Springer K, Berard C, Hainfeld J, Bewley M, and Flanagan J (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol*, **73**, 1392-1398.
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, and Bitter-Suermann D (1985) NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1194-1198.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, and Lieber A (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, **9**, 1408-1412.
- Gao GP, Yang Y, and Wilson JM (1996) Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*, **70**, 8934-8943.
- Gascon E, Vutskits L, and Kiss JZ (2007) Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev*, **56**, 101-118.

- Glick MC, Livingston BD, Shaw GW, Jacobs JL, and Troy FA (1991) Expression of polysialic acid on human neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res*, **366**, 267-274.
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, and Pluckthun A (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, **29**, 1362-1367.
- Gluer S, Schelp C, Madry N, von SD, Eckhardt M, and Gerardy-Schahn R (1998a) Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. *Br J Cancer*, **78**, 106-110.
- Gluer S, Schelp C, von SD, and Gerardy-Schahn R (1998b) Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Res*, **43**, 145-147.
- Graham FL and Prevec L (1995) Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol*, **3**, 207-220.
- Green NK, Herbert CW, Hale SJ, Hale AB, Mautner V, Harkins R, Hermiston T, Ulbrich K, Fisher KD, and Seymour LW (2004) Extended plasma circulation time and decreased toxicity of polymer-coated adenovirus. *Gene Ther*, **11**, 1256-1263.
- Gurlevik E, Woller N, Struver N, Schache P, Kloos A, Manns MP, Zender L, Kuhnel F, and Kubicka S (2010) Selectivity of oncolytic viral replication prevents antiviral immune response and toxicity, but does not improve antitumoral immunity. *Mol Ther*, **18**, 1972-1982.
- Haisma HJ, Boesjes M, Beerens AM, van der Strate BW, Curiel DT, Pluddemann A, Gordon S, and Bellu AR (2009) Scavenger receptor A: a new route for adenovirus 5. *Mol Pharm*, **6**, 366-374.
- Hallden G, Hill R, Wang Y, Anand A, Liu TC, Lemoine NR, Francis J, Hawkins L, and Kirn D (2003) Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy. *Mol Ther*, **8**, 412-424.
- Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
- Harbury PB, Zhang T, Kim PS, and Alber T (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*, **262**, 1401-1407.
- Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, and Koudstaal J (1992) Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol*, **52**, 296-302.
- Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L, and Kirn D (2000) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, **6**, 1134-1139.
- Henning P, Andersson KM, Frykholm K, Ali A, Magnusson MK, Nygren PA, Granio O, Hong SS, Boulanger P, and Lindholm L (2005) Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains. *Gene Ther*, **12**, 211-224.
- Henning P, Magnusson MK, Gunneriusson E, Hong SS, Boulanger P, Nygren PA, and Lindholm L (2002) Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A. *Hum Gene Ther*, **13**, 1427-1439.
- Hildebrandt H, Muhlenhoff M, Weinhold B, and Gerardy-Schahn R (2007) Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J Neurochem*, **103 Suppl 1**, 56-64.
- Hofherr SE, Adams KE, Chen CY, May S, Weaver EA, and Barry MA (2011) Real-time dynamic imaging of virus distribution in vivo. *PLoS One*, **6**, e17076.

Hofherr SE, Mok H, Gushiken FC, Lopez JA, and Barry MA (2007) Polyethylene glycol modification of adenovirus reduces platelet activation, endothelial cell activation, and thrombocytopenia. *Hum Gene Ther*, **18**, 837-848.

Hofherr SE, Shashkova EV, Weaver EA, Khare R, and Barry MA (2008) Modification of adenoviral vectors with polyethylene glycol modulates in vivo tissue tropism and gene expression. *Mol Ther*, **16**, 1276-1282.

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, and . (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5879-5883.

Jacobs F, Wisse E, and De GB (2010) The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *Am J Pathol*, **176**, 14-21.

Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, and Leckband DE (2005) Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem*, **280**, 137-145.

Kaiser U, Auerbach B, and Oldenburg M (1996) The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, **20**, 389-395.

Kalyuzhnyi O, Di Paolo NC, Silvestry M, Hofherr SE, Barry MA, Stewart PL, and Shayakhmetov DM (2008) Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5483-5488.

Kashentseva EA, Seki T, Curiel DT, and Dmitriev IP (2002) Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain. *Cancer Res*, **62**, 609-616.

Khare R, Reddy VS, Nemerow GR, and Barry MA (2012) Identification of adenovirus serotype 5 hexon regions that interact with scavenger receptors. *J Virol*, **86**, 2293-2301.

Kim J, Smith T, Idamakanti N, Mulgrew K, Kaloss M, Kylefjord H, Ryan PC, Kaleko M, and Stevenson SC (2002) Targeting adenoviral vectors by using the extracellular domain of the coxsackie-adenovirus receptor: improved potency via trimerization. *J Virol*, **76**, 1892-1903.

Klebert S, Kratzin HD, Zimmermann B, Vaesen M, Frosch M, Weisgerber C, Bitter-Suermann D, and Hilschmann N (1993) Primary structure of the murine monoclonal IgG2a antibody mAb735 against alpha (2-8) polysialic acid. 2. Amino acid sequence of the heavy (H-) chain Fd' region. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **374**, 993-1000.

Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, and Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5731-5736.

Korn T, Nettelbeck DM, Volkel T, Muller R, and Kontermann RE (2004) Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med*, **6**, 642-651.

Korokhov N, Mikheeva G, Krendelshchikov A, Belousova N, Simonenko V, Krendelshchikova V, Pereboev A, Kotov A, Kotova O, Triozzi PL, Aldrich WA, Douglas JT, Lo KM, Banerjee PT, Gillies SD, Curiel DT, and Krasnykh V (2003) Targeting of adenovirus via genetic modification of the viral capsid combined with a protein bridge. *J Virol*, **77**, 12931-12940.

- Kraaij R, van Rijswijk AL, Oomen MH, Haisma HJ, and Bangma CH (2005) Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a tissue-specific target for adenoviral transduction of prostate cancer in vitro. *Prostate*, **62**, 253-259.
- Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N, Mikheeva G, and Curiel DT (2001) Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *J Virol*, **75**, 4176-4183.
- Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N, and Curiel DT (1998) Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol*, **72**, 1844-1852.
- Kreppel F, Gackowski J, Schmidt E, and Kochanek S (2005) Combined genetic and chemical capsid modifications enable flexible and efficient de- and retargeting of adenovirus vectors. *Mol Ther*, **12**, 107-117.
- Krystal GW, Honsawek S, Kiewlich D, Liang C, Vasile S, Sun L, McMahon G, and Lipson KE (2001) Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 3660-3668.
- Kuhnel F, Schulte B, Wirth T, Woller N, Schafers S, Zender L, Manns M, and Kubicka S (2004) Protein transduction domains fused to virus receptors improve cellular virus uptake and enhance oncolysis by tumor-specific replicating vectors. *J Virol*, **78**, 13743-13754.
- Lackie PM, Zuber C, and Roth J (1991) Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development. *Differentiation*, **47**, 85-98.
- Lanciotti J, Song A, Doukas J, Sosnowski B, Pierce G, Gregory R, Wadsworth S, and O'Riordan C (2003) Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates. *Mol Ther*, **8**, 99-107.
- Li E, Brown SL, Stupack DG, Puente XS, Cheresh DA, and Nemerow GR (2001) Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol*, **75**, 5405-5409.
- Li HJ, Everts M, Pereboeva L, Komarova S, Idan A, Curiel DT, and Herschman HR (2007) Adenovirus tumor targeting and hepatic untargeting by a coxsackie/adenovirus receptor ectodomain anti-carcinoembryonic antigen bispecific adapter. *Cancer Res*, **67**, 5354-5361.
- Li HJ, Everts M, Yamamoto M, Curiel DT, and Herschman HR (2009) Combined transductional untargeting/retargeting and transcriptional restriction enhances adenovirus gene targeting and therapy for hepatic colorectal cancer tumors. *Cancer Res*, **69**, 554-564.
- Li Y, Chen Y, Dilley J, Arroyo T, Ko D, Working P, and Yu DC (2003) Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1003-1009.
- Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, and Kay MA (1997) The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*, **71**, 8798-8807.
- Litz J, Sakuntala Warshamana-Greene G, Sulanke G, Lipson KE, and Krystal GW (2004) The multi-targeted kinase inhibitor SU5416 inhibits small cell lung cancer growth and angiogenesis, in part by blocking Kit-mediated VEGF expression. *Lung Cancer*, **46**, 283-291.
- Lortat-Jacob H, Chouin E, Cusack S, and van Raaij MJ (2001) Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, **276**, 9009-9015.

- Magnusson MK, Hong SS, Boulanger P, and Lindholm L (2001) Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *J Virol*, **75**, 7280-7289.
- Manickan E, Smith JS, Tian J, Eggerman TL, Lozier JN, Muller J, and Byrnes AP (2006) Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors. *Mol Ther*, **13**, 108-117.
- Mellor AL and Munn DH (2008) Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol*, **8**, 74-80.
- Miyahara R, Tanaka F, Nakagawa T, Matsuoka K, Isii K, and Wada H (2001) Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state. *J Surg Oncol*, **77**, 49-54.
- Moolten FL, Wells JM, Heyman RA, and Evans RM (1990) Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum Gene Ther*, **1**, 125-134.
- Morral N, Parks RJ, Zhou H, Langston C, Schiedner G, Quinones J, Graham FL, Kochanek S, and Beaudet AL (1998) High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther*, **9**, 2709-2716.
- Morrison J, Briggs SS, Green N, Fisher K, Subr V, Ulbrich K, Kehoe S, and Seymour LW (2008) Virotherapy of ovarian cancer with polymer-cloaked adenovirus retargeted to the epidermal growth factor receptor. *Mol Ther*, **16**, 244-251.
- Nettelbeck DM, Miller DW, Jerome V, Zuzarte M, Watkins SJ, Hawkins RE, Muller R, and Kontermann RE (2001) Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol Ther*, **3**, 882-891.
- Nettelbeck DM, Rivera AA, Davydova J, Dieckmann D, Yamamoto M, and Curiel DT (2003) Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma. *Melanoma Res*, **13**, 287-292.
- Ni S, Gaggari A, Di PN, Li ZY, Liu Y, Strauss R, Sova P, Morihara J, Feng Q, Kiviat N, Toure P, Sow PS, and Lieber A (2006) Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther*, **13**, 1072-1081.
- Nilsson EC, Storm RJ, Bauer J, Johansson SM, Lookene A, Angstrom J, Hedenstrom M, Eriksson TL, Frangsmyr L, Rinaldi S, Willison HJ, Pedrosa DF, Stehle T, and Arnberg N (2011) The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat Med*, **17**, 105-109.
- O'Riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, Parkes V, Wadsworth SC, Smith AE, and Francis GE (1999) PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, **10**, 1349-1358.
- Onn A, Isobe T, Itasaka S, Wu W, O'Reilly MS, Ki HW, Fidler IJ, and Herbst RS (2003) Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*, **9**, 5532-5539.
- Othman M, Labelle A, Mazzetti I, Elbatarny HS, and Lillicrap D (2007) Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood*, **109**, 2832-2839.
- Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H, and Christofori G (1999) Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med*, **5**, 286-291.

Prestwich RJ, Errington F, Diaz RM, Pandha HS, Harrington KJ, Melcher AA, and Vile RG (2009) The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum Gene Ther*, **20**, 1119-1132.

Prill JM, Espenlaub S, Samen U, Engler T, Schmidt E, Vetrini F, Rosewell A, Grove N, Palmer D, Ng P, Kochanek S, and Kreppel F (2011) Modifications of adenovirus hexon allow for either hepatocyte detargeting or targeting with potential evasion from Kupffer cells. *Mol Ther*, **19**, 83-92.

Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, and Henderson DR (1997) Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, **57**, 2559-2563.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, and Wickham TJ (1998) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, **72**, 7909-7915.

Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU, Goridis C, and Bitter-Suermann D (1988) Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2999-3003.

Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, and zur HH (1998) Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, **72**, 9470-9478.

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

Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 26-35.

Salone B, Martina Y, Piersanti S, Cundari E, Cherubini G, Franqueville L, Failla CM, Boulanger P, and Saggio I (2003) Integrin alpha3beta1 is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5. *J Virol*, **77**, 13448-13454.

Santra S, Seaman MS, Xu L, Barouch DH, Lord CI, Lifton MA, Gorgone DA, Beaudry KR, Svehla K, Welcher B, Chakrabarti BK, Huang Y, Yang ZY, Mascola JR, Nabel GJ, and Letvin NL (2005) Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol*, **79**, 6516-6522.

Schagen FH, Wensveen FM, Carette JE, Dermody TS, Gerritsen WR, and van Beusechem VW (2006) Genetic targeting of adenovirus vectors using a reovirus sigma1-based attachment protein. *Mol Ther*, **13**, 997-1005.

Scheidegger EP, Lackie PM, Papay J, and Roth J (1994) In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab Invest*, **70**, 95-106.

Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, and Kochanek S (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*, **18**, 180-183.

Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma YT, Flavell RA, Liljestrom P, and Reis e Sousa (2005) Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, **433**, 887-892.

- Seidenfaden R, Krauter A, Schertzinger F, Gerardy-Schahn R, and Hildebrandt H (2003) Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol*, **23**, 5908-5918.
- Sharma MD, Hou DY, Baban B, Koni PA, He Y, Chandler PR, Blazar BR, Mellor AL, and Munn DH (2010) Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity*, **33**, 942-954.
- Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li ZY, and Lieber A (2005) Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol*, **79**, 7478-7491.
- Short JJ, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT, and Pereboev A (2006) Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res*, **122**, 144-153.
- Strelkov SV, Tao Y, Rossmann MG, Kurochkina LP, Shneider MM, and Mesyanzhinov VV (1996) Preliminary crystallographic studies of bacteriophage T4 fibrin confirm a trimeric coiled-coil structure. *Virology*, **219**, 190-194.
- Takamatsu K, Auerbach B, Gerardy-Schahn R, Eckhardt M, Jaques G, and Madry N (1994) Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res*, **54**, 2598-2603.
- Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, and Wada H (2000) Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **60**, 3072-3080.
- Tao N, Gao GP, Parr M, Johnston J, Baradet T, Wilson JM, Barsoum J, and Fawell SE (2001) Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther*, **3**, 28-35.
- Tao Y, Strelkov SV, Mesyanzhinov VV, and Rossmann MG (1997) Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure*, **5**, 789-798.
- Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, and Philipson L (2000) Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res*, **255**, 47-55.
- van Beusechem VW, van Rijswijk AL, van Es HH, Haisma HJ, Pinedo HM, and Gerritsen WR (2000) Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther*, **7**, 1940-1946.
- van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, and Cusack S (1999) A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature*, **401**, 935-938.
- Volk AL, Rivera AA, Kanerva A, Bauerschmitz G, Dmitriev I, Nettelbeck DM, and Curiel DT (2003) Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism. *Cancer Biol Ther*, **2**, 511-515.
- Volpers C, Thirion C, Biermann V, Hussmann S, Kewes H, Dunant P, von der MH, Herrmann A, Kochanek S, and Lochmuller H (2003) Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *J Virol*, **77**, 2093-2104.
- Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SM, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IM, Monteiro RQ, Barouch DH, van RN, Napoli C, Havenga MJ, Nicklin SA, and Baker AH (2008) Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell*, **132**, 397-409.

- Wang H, Li ZY, Liu Y, Persson J, Beyer I, Moller T, Koyuncu D, Drescher MR, Strauss R, Zhang XB, Wahl JK, III, Urban N, Drescher C, Hemminki A, Fender P, and Lieber A (2011) Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med*, **17**, 96-104.
- Wickham TJ, Carrion ME, and Kovesdi I (1995) Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*, **2**, 750-756.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, and Nemerow GR (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**, 309-319.
- Wickham TJ, Roelvink PW, Brough DE, and Kovesdi I (1996) Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotechnol*, **14**, 1570-1573.
- Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL, Roelvink PW, Li Y, Lee GM, Brough DE, Lizonova A, and Kovesdi I (1997) Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol*, **71**, 8221-8229.
- Windfuhr M, Manegold A, Muhlenhoff M, Eckhardt M, and Gerardy-Schahn R (2000) Molecular defects that cause loss of polysialic acid in the complementation group 2A10. *J Biol Chem*, **275**, 32861-32870.
- Wirth T, Zender L, Schulte B, Mundt B, Plentz R, Rudolph KL, Manns M, Kubicka S, and Kuhnel F (2003) A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res*, **63**, 3181-3188.
- Woller N, Knocke S, Mundt B, Gurlevik E, Struver N, Kloos A, Boozari B, Schache P, Manns MP, Malek NP, Sparwasser T, Zender L, Wirth TC, Kubicka S, and Kuhnel F (2011) Virus-induced tumor inflammation facilitates effective DC cancer immunotherapy in a Treg-dependent manner in mice. *J Clin Invest*, **121**, 2570-2582.
- Wortmann A, Vohringer S, Engler T, Corjon S, Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, and Kreppel F (2008) Fully detargeted polyethylene glycol-coated adenovirus vectors are potent genetic vaccines and escape from pre-existing anti-adenovirus antibodies. *Mol Ther*, **16**, 154-162.
- Wu E and Nemerow GR (2004) Virus yoga: the role of flexibility in virus host cell recognition. *Trends Microbiol*, **12**, 162-169.
- Wu H, Han T, Belousova N, Krasnykh V, Kashentseva E, Dmitriev I, Kataram M, Mahasreshti PJ, and Curiel DT (2005) Identification of sites in adenovirus hexon for foreign peptide incorporation. *J Virol*, **79**, 3382-3390.
- Wu H, Seki T, Dmitriev I, Uil T, Kashentseva E, Han T, and Curiel DT (2002) Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther*, **13**, 1647-1653.
- Xu Z, Tian J, Smith JS, and Byrnes AP (2008) Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement. *J Virol*, **82**, 11705-11713.
- Yang P, Yin X, and Rutishauser U (1992) Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol*, **116**, 1487-1496.
- Yang X, Florin L, Farzan M, Kolchinsky P, Kwong PD, Sodroski J, and Wyatt R (2000) Modifications that stabilize human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimers in solution. *J Virol*, **74**, 4746-4754.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, and Wilson JM (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4407-4411.

Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, and Welsh MJ (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*, **75**, 207-216.

Zhang KJ, Wang YG, Cao X, Zhong SY, Wei RC, Wu YM, Yue XT, Li GC, and Liu XY (2009) Potent antitumor effect of interleukin-24 gene in the survivin promoter and retinoblastoma double-regulated oncolytic adenovirus. *Hum Gene Ther*, **20**, 818-830.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ALT	Alanin Transaminase
AST	Aspartat Transaminase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>american tissue culture company</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-gal	β-Galaktosidase
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CMV	Cytomegalo-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
FU	Fluoruracil
g (x-fach)	Erdbeschleunigung
-g	Gramm
GdCl <sub>3</sub>	Gadoliniumchlorid
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HSV-tk	Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase
IL	Interleukin

i.v.	intravenös
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase
Luc	Luciferase
LB	Luria-Broth
max.	maximal
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Anzahl infektiöser Partikel/Zielzelle)
m-	Milli
mm	Millimeter
n-	Nano
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBS	<i>plasmid Bluescript</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
$\mu$ -	Mikro
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease A
RLU	<i>relative light units</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS	sodiumdodecylsulfate/Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2,2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

---

U	<i>units</i> (Einheiten)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
wt	Wildtypisch

## 8 Lebenslauf

### Curriculum Vitae:

Name: Arnold Kloos

Anschrift: Porscheweg 8  
30165 Hannover

Geburtsdatum: 25.09.1978

Geburtsort: Hermannstadt/ Rumänien

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1985-1990 Volksschule Hermannstadt  
1990-1995 Konrad-von-Dürn Realschule Walldürn  
1995-1998 Wirtschaftsgymnasium Frankenlandschule Walldürn

Schulabschluß: 1998 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 1998-1999 4/ Raketenartilleriebataillon 122, Walldürn

Studium: 1999-2006 Studium der Biologie an der bayer. Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg  
2005-2006 Diplomarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg zum Thema: *„Herstellung eines  
retroviralen Expressionssystems zur Untersuchung der  
Virusinhibition“*

Studienabschluß: 2006 Diplom Biologe Univ.

Wissenschaftliche  
Tätigkeit: 2007-2012 Charakterisierung des transduktionellen Retargetings  
onkolytischer Adenoviren zur Therapie polysialylierter  
Tumoren in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie  
und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule  
Hannover

## 9 Publikationen und Posterpräsentationen

Woller N, Knocke S, Mundt B, Gurlevik E, Struver N, **Kloos A**, Boozari B, Schache P, Manns MP, Malek NP, Sparwasser T, Zender L, Wirth TC, Kubicka S\*, and Kühnel F\*. Virus-induced tumor inflammation facilitates effective DC cancer immunotherapy in a Treg-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest*, 121(7): 2570-82, 2011

Gürlevik E, Woller N, Strüver N, Schache P, **Kloos A**, Manns M, Zender L, Kühnel F\*, Kubicka S. Selectivity of oncolytic viral replication prevents antiviral immune response and toxicity, but does not improve antitumoral immunity. *Mol Ther*, 18(11): 1972-82, 2010

Boozari B, Mundt B, Woller N, Strüver N, Gürlevik E, Schache P, **Kloos A**, Knocke S, Manns MP, Wirth TC, Kubicka S, Kühnel F. Proteasome inhibition during oncolytic infection improves antitumoral immunity and inhibits metastatic growth of HCC. *GUT*, 59, 1416-1426, 2010

### Posterpräsentationen:

E. Gürlevik, A. Kloos, et al. Selectivity of oncolytic viral replication prevents antiviral immune response and toxicity, but does not improve antitumoral immunity. Jahrestagung der GASL, 2010, Bonn.

Kloos A. et al. Targeting of polysialic acid positive tumors by adapter-modified oncolytic adenoviruses. Poster abstract, ESGCT Annual Meeting, Brighton, England. *Human Gene Therapy*, Vol. 22, 10, p. A111 (2011).

Kloos A. et al. Transductional Targeting of oncolytic adenoviruses by CAREx-pSia adapter molecules improves therapy of pSia-expressing tumors and reduces viral liver load, Selected Abstract auf der Jahrestagung der GASL, 2012, Hamburg

Kloos A. et al. Transductional Targeting of oncolytic adenoviruses by CAREx-pSia adapter molecules improves therapy of pSia-expressing tumors and reduces viral liver load. 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy (DG-GT) 2012, Frankfurt

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stefan Kubicka möchte ich sehr herzlich danken für die Übernahme der Begutachtung sowie für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Seine fundierten Kenntnisse und sein Ideenreichtum waren stets eine treibende Kraft während dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn danke ich sehr für ihre Bereitschaft, die Zweitbegutachtung dieser Doktorarbeit zu übernehmen. Bedanken möchte ich mich auch für die freundliche und hilfreiche Bereitstellung von Materialien, die eine essentielle Grundlage des Projekts waren. Ohne die Vorarbeiten Ihrer Arbeitsgruppe wäre dieses Projekt kaum vorstellbar.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael P. Manns für die gewährte Unterstützung und die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und Arbeitsplatz in den Laboren der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei PD Dr. Florian Kühnel bedanken, der die engagierte und fachlich kompetente Betreuung dieser Doktorarbeit vor Ort übernommen hat. Seine geduldige und didaktisch einzigartige Art bei wissenschaftlichen Fragestellungen, die stetige Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge haben zu einem erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit geführt. Durch seine Förderung und die gegebene Möglichkeit zur Verwirklichung eigener Ideen ist ihm ein sehr angenehmes Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe gelungen.

Einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit haben meine Arbeitskollegen geleistet. Für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, ihre Hilfs- und Gesprächsbereitschaft, ihre Zuverlässigkeit, der produktiven Zusammenarbeit und der ausgesprochen guten Stimmung im Labor danke ich Engin Gürlevik, Norman Woller, Bettina Fleischmann-Mundt, Sarah Knocke, Nina Armbrecht, Peter Schache und Cristina-Ileana Ureche.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin, meinen Eltern, meinem Bruder sowie meinen Freunden, den wichtigen Menschen im Leben, auf die man immer zählen kann.

## 11 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Modifikation des Tropismus onkolytischer Adenoviren mittels bispezifischer Adapterproteine für die Therapie Polysialinsäure-exprimierender Tumoren“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 25.09.2012

Arnold Kloos