

**Untersuchung immunologischer Aspekte einer
onkolytischen Virotherapie von Tumoren im murinen
Modellsystem**

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

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Norman Woller

geboren am 19.04.1976 in Gehrden

2008

Tag der Promotionsprüfung: 23.06.2008

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Kalesse

Referenten: Prof. Dr. Jürgen Alves

Prof. Dr. Stefan Kubicka

PD Dr. Detlef Neumann

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung incl. Schlagwörter (Abstract).....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Mechanismen der malignen Entartung von Zellen.....	2
2.2	Krankheitsbild von pulmonalen Tumoren.....	2
2.3	Adenoviren und adenovirale Vektoren.....	3
2.4	Ansätze der onkolytischen Virotherapie.....	4
2.5	Tumormodelle mit konditionell replikationskompetenten Adenoviren.....	5
2.6	Funktionen regulatorischer T-Zellen.....	6
2.7	Funktionen und klinische Relevanz dendritischer Zellen.....	8
2.8	Kreuzpräsentation und –aktivierung.....	11
2.9	Mechanismen der Tumortoleranz.....	13
2.10	Zielsetzung der Arbeit.....	14
3	Ergebnisse.....	15
3.1	Etablierung eines immunkompetenten Modells zur Untersuchung onkolytischer adenoviraler Vektoren.....	15
3.1.1	Das onkolytische Adenovirus hTERT-Ad.....	15
3.1.2	Identifikation einer murinen Zelllinie permissiv für ein immunkompetentes Onkolysemodell.....	15
3.1.3	MHC-Klasse-I-Charakterisierung der Zelllinie KLN 205.....	18
3.1.4	Immunogenität adenoviraler Vektoren.....	20
3.1.5	Onkolytische Virotherapie im murinen, replikationskompetenten KLN 205-Tumormodell.....	21
3.2	Etablierung eines Modells zur dendritischen Zell- Vakzinierung.....	23
3.2.1	Generierung und Charakterisierung primärer dendritischer Zellen.....	23
3.2.2	Intensitätsmessung der NF κ B-Aktivierung durch den TLR3 Ligand Poly I:C bei der dendritischen Zelllinie DC2.4.....	26

3.3	Einflüsse der Virotherapie auf die Immunreaktion gegen den Tumor.....	29
3.3.1	Etablierung des HA-Systems.....	29
3.3.2	Inaktivierung von Adenoviren durch Hitzeeinwirkung.....	30
3.3.3	Einfluss der viralen Infektion auf die anti-tumorale Immunreaktion durch Kreuzpräsentation phagozytierter Antigene ...	33
3.4	Therapeutisches Mausmodell zur onkolytischen Virotherapie in Kombination mit Immuntherapie.....	35
3.4.1	Tierversuch zur Untersuchung kombinierter Therapieansätze.....	35
3.4.2	Bestimmung des optimalen Zeitraums der effektiven Vakzinierung während der Virotherapie.....	38
3.4.3	Wirkung der Therapie auf T-regs.....	40
3.4.4	Wirkung der Therapie auf tumorinfiltrierende dendritische Zellen.....	46
3.4.5	Immunologische Aspekte der Viroimmunotherapie im HA-System.....	47
3.4.5.1	Experimenteller Ansatz des HA-Systems im KLN 205-Modell in der Kombinationstherapie..	47
3.4.5.2	Humorale Immunantwort gegen Adenovirus....	50
3.4.5.3	Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen Adenovirus.....	54
3.4.6	Virale Persistenz von hTERT-Ad <i>in vivo</i> im immuntherapeutischen Ansatz.....	55
4	Diskussion.....	58
4.1	Etablierung eines murinen immunkompetenten Tumormodells zur onkolytischen Virotherapie.....	58
4.1.1	Syngenes Virotherapiemodell mit subkutanem KLN 205-Tumor.....	58
4.1.2	Immunogenität adenoviraler Vektoren.....	59
4.1.3	Einfluss viraler Komponenten bei Phagozytose von Tumorantigenen auf die Kreuzaktivierung von T-Zellen.....	60

4.2	Etablierung von dendritischer Zellvakzinierung gegen Tumorantigene im KLN 205-Modell.....	62
4.3	Therapeutisches Modell aus Kombination von Virotherapie und Vakzinierung.....	62
4.4	Auswirkungen der Virotherapie auf das Immunsystem.....	65
4.4.1	Quantitative Auswirkungen der Viroimmunotherapie auf regulatorische T-Zellen.....	65
4.4.2	Auswirkungen der Viroimmunotherapie auf dendritische Zellen.....	67
4.5	Immunologische Aspekte der Viroimmunotherapie im HA-System.....	67
4.6	Drift antiviraler Immunantwort in Richtung antitumorale Immunität in der Viroimmunotherapie durch Immuninterferenz.....	69
4.7	Theoriemodell zur Viroimmunotherapie.....	73
5	Material und Methoden.....	77
5.1	Material.....	77
5.1.1	Eukariontische Zelllinien.....	77
5.1.2	Bakterienstämme.....	78
5.1.3	Mausstämme.....	78
5.1.4	Plasmide.....	78
5.1.5	Im Rahmen der Arbeit generierte Plasmide.....	79
5.1.6	Rekombinante Adenoviren.....	81
5.1.7	Oligonukleotide.....	81
5.1.8	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	82
5.1.9	Chemikalien.....	83
5.1.10	Molekulargewichtstandard.....	85
5.1.11	Enzyme.....	85
5.1.12	Peptide.....	85
5.1.13	Kits.....	86
5.1.14	Sonstiges Material und Geräte.....	86
5.1.15	Standardpuffer und Medien.....	87
5.2	Zellbiologische Methoden.....	89
5.2.1	Zellkultivierung.....	89

5.2.2	Herstellung von GM-CSF-haltigem Überstand.....	89
5.2.3	Zellkultivierung primärer dendritischer Zellen.....	89
5.2.4	Einfrieren von Zellen.....	90
5.2.5	Auftauen von Zellen.....	90
5.2.6	Transiente Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation.....	91
5.2.7	Luziferaseassay.....	91
5.2.8	Herstellung von Milz- und Lymphknoten- einzelzellsupensionen.....	91
5.2.9	Magnetische Zellseparation.....	92
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	93
5.3.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure.....	93
5.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	93
5.3.3	Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA.....	93
5.3.3.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien..	93
5.3.3.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	94
5.3.3.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	94
5.3.3.4	Transformation elektrokompetenter Bakterien..	95
5.3.3.5	Vermehrung transformierter Bakterien.....	95
5.3.3.6	Analytische Plasmidpräparation.....	96
5.3.3.7	Aufreinigung geringer DNA-Mengen.....	96
5.3.3.8	Präparative Plasmidpräparation.....	96
5.3.3.9	Isolierung von RNA und Herstellung von cDNA	97
5.3.3.10	Konservierung der Bakterienklone.....	97
5.3.4	Rekombinante DNA-Techniken.....	98
5.3.4.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	98
5.3.4.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	98
5.3.4.3	Auffüllen von 5'-Überhängen und Verdau von 3'-Überhängen durch das große Klenow- Fragment.....	98
5.3.4.4	Dephosphorylierung von 5'-Enden der	

	linearisierten Vektoren.....	99
5.3.4.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	99
5.3.4.6	Ligation von DNA-Enden.....	99
5.3.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	99
5.4	Immunologische Methoden.....	100
5.4.1	ELISpot.....	100
5.4.2	Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer.....	101
5.4.3	Durchflusszytometrische Zellsortierung.....	101
5.4.4	ELISA.....	102
5.4.5	Titration neutralisierender Antikörper gegen Adenoviren.....	102
5.4.6	Präparation von Tumorantigenen für dendritische Zellen.....	103
5.4.7	Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorantigen.....	104
5.4.8	Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe.....	104
5.5	Virale Arbeitstechniken.....	104
5.5.1	Herstellung und Titerung lentiviraler Partikel.....	104
5.5.1.1	Transfektion der Verpackungszelllinie 293T....	104
5.5.1.2	Aufkonzentrieren der lentiviralen Partikel durch Ultrazentrifugation.....	105
5.5.1.3	Bestimmung des Titers lentiviraler Partikel.....	105
5.5.2	Präparation adenoviraler Plasmide und infektiöser Viren.....	106
5.5.3	Vermehrung und Großpräparation von Adenoviren.....	107
5.5.4	Bestimmung des infektiösen Titers von adenoviralen Präparationen.....	108
5.5.5	Dialyse der Adenoviren.....	109
5.5.6	Retrovirale Arbeitstechnik zur Generierung stabiler transgener Zelllinien.....	109
5.6	Genotypisierung transgener Mäuse.....	109
5.7	Tierexperimentelle Methoden.....	110
6.	Literatur.....	112
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	122
8.	Lebenslauf und Publikationen.....	124

Abstract

Several conditionally replicating adenoviral vectors (CRAds) have been established for oncolytic purposes. These vectors have been conventionally investigated in xenograft models using nude mice. However, these models are inconvenient for investigations regarding potential influences of the immune system. In the course of the study present here a fully immunocompetent murine model was established to allow assessment of CRAds *in vivo*. As oncolytic vector hTert-Ad was used, that has previously shown to replicate selectively in telomerase-active tumor cells. The results demonstrate that this vector showed *in vivo* enhanced crosspriming of tumor-specific T-cells, since apoptotic tumor cells are exposed together with viral danger signals during oncolysis. However, virotherapy induces a rapid and strong cellular and humoral vector-immunity, especially after repetitive vector-application. To potentially influence immune responses during virotherapy, DC-vaccination against tumor-associated antigens was additionally applied in different setups. The outcome is a dramatic reduction of the tumor burden if the DC-vaccination is applied in a defined timeframe after virotherapy. T-regs appeared to play a pivotal role in the induction of immune responses in this setting. Moreover, the HA-tumor model showed diminished humoral vector immunity beside a strong anti-tumor immune response. This effect could be detected quantitatively and qualitatively in sera of treated animals. These results indicate an immune interference of anti-tumor- and anti-virus immunity when regimen of highly specific oncolytic vector application was combined with DC-vaccination against tumor-associated antigens. The biological effect of this interference could be further observed in a luciferase-*in vivo*-model by demonstrating prolonged persistence of hTERT-Ad.

Taken together these findings suggest yet unknown immunological aspects of viroimmunotherapy and furthermore provide a promising approach of combining viro- and immunotherapy to successfully treat highly malignant solid tumors.

Schlagworte: *Virotherapie, Immuntherapie, Immuninterferenz*

keywords: *virotherapy, immunotherapy, immuneinterference*

1. Zusammenfassung

Zahlreiche konditionell replizierende Adenoviren wurden bereits für onkolytische Therapieansätze generiert. Getestet wurden diese bisher ausschließlich im immundefizienten Nacktmausmodell mit xenotransplantierten Tumoren. Diese Modelle lassen nur ein unvollständiges Bild der Therapie zu, da immunologische Aspekte der Virotherapie außer Acht gelassen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Identifizierung geeigneter Zelllinien ein vollständig immunkompetentes Mausmodell zur *in vivo* Untersuchung virotherapeutischer Ansätze mittels adenoviraler Vektoren etabliert und untersucht. Der in dieser Arbeit verwendete onkolytische Vektor hTERT-Ad basiert auf der transkriptionellen Kontrolle durch Telomeraseaktivität. Mit Hilfe dieses adenoviralen Vektors wurden zunächst im Mausmodell grundlegende Fragestellungen zur Tumor- und Vektorimmunität aufgeklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kreuzpräsentierte Tumorantigene von hTERT-Ad infiziertem Tumorgewebe zu einer verstärkten Kreuzaktivierung tumorspezifischer T-Zellen führt, jedoch gleichzeitig starke Vektorimmunität nur zu einer ungenügenden Tumorreduktion führt. Eine Strategie zur potentiellen Verbesserung der Virotherapie bestand aus der Beeinflussung der Immunreaktionen durch DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene und einem darauf basierenden Ansatz der Viroimmunotherapie. Das Ergebnis der Viroimmunotherapie war eine erhebliche Induktion antitumoraler Immunität, wenn die Impfung gegen Tumorantigene in einem definierten Zeitraum nach Virusapplikation erfolgte. Die Untersuchungen zeigen, dass regulatorische T-Zellen dabei in der Modulation dieser Immunantwort involviert sind. Weiterhin konnten erstmals Phänomene einer Immuninterferenz von Tumor- und Virusimmunität festgestellt werden. Das HA-Tumormodell zeigte durch eine Tumorantigen-spezifische Impfung in Verbindung mit Virotherapie eine abgeschwächte adenovirale Immunität bei gleichzeitiger Aktivierung einer deutlichen Tumorimmunantwort. Die schwächere Vektorimmunität wurde im Antiserum quantitativ und qualitativ nachgewiesen und der Effekt der Tumor-/Virusimmuninterferenz in einem Luziferase-*in vivo*-Modell durch verlängerte Therapie-vermittelte Persistenz des Vektors veranschaulicht.

Das Mausmodell zur onkolytischen Viroimmunotherapie zeigte demnach bislang unbekannte immunologische Aspekte und einen neuen, vielversprechenden Ansatz einer synergistischen Kombinationstherapie für die Behandlung solider Tumoren.

2. Einleitung

2.1 Mechanismen der malignen Entartung von Zellen

Die Entstehung eines Tumors wird als eine klonale Expansion einer einzelnen transformierten Zelle verstanden, die sich in einem Mehrstufenprozess durch genetische Aberationen entwickelt hat (Kinzler and Vogelstein, 1996). In diesem Mehrstufenprozess reichern sich auf DNA-Ebene Mutationen an, die letztendlich in die maligne Entartung der Zelle münden. Der Prozess zieht sich oft über Jahre hin, und einige Voraussetzungen müssen für die Entstehung eines Tumors erfüllt sein (RMITAGE and Doll, 1957). Zum einen müssen Protoonkogene alteriert sein, sodass sie die unphysiologische Zellteilung begünstigen, zum anderen müssen Funktionen der Tumorsuppressorgene als wichtige Kontrollstellen der Zellhomöostase ausgeschaltet werden. Weiterhin benötigt die Zelle für die maligne Transformation eine Überwindung der limitierten Zahl von Zellzyklen. Dazu müssen die natürlichen Telomerverkürzungen nach jeder Zellteilung wieder verlängert werden, um einer Seneszenz entgegenzuwirken. Die zelluläre Immortalität wird u.a. durch Aktivierung der Telomerase erreicht, die für die Regeneration der Chromosomenenden verantwortlich ist. Aus diesem Grund kommt der Reaktivierung der Telomerasefunktion bei Tumoren eine wichtige Bedeutung zu (Meyerson et al., 1997; Meyerson, 2000). Ein weiterer wichtiger Aspekt des Tumorgeschehens ist die aktive Induktion einer immunologischen Toleranz gegen das Tumorgewebe, um eine Abstoßung und eine damit verbundene Zerstörung des Tumors durch das Immunsystem zu verhindern (Walker et al., 1997; Wiendl et al., 2002).

2.2 Krankheitsbild von pulmonalen Tumoren

Pro Jahr erkranken in Deutschland über 32500 Menschen an bösartigen Tumoren der Lunge. Lungenkrebs ist damit die dritthäufigste Krebserkrankung. Der größte Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist mit Abstand das Rauchen. Jeder zehnte Raucher entwickelt etwa 30-40 Jahre nach dem Beginn des Rauchens einen malignen Lungentumor. Auch das Passivrauchen ist ebenfalls ein hoher Risikofaktor für die Erkrankung an Lungenkrebs. Bei Frauen z.B. wird bei drei bis sechs von zehn Erkrankungen das Passivrauchen als Hauptrisikofaktor angenommen. Als weitere Risikofaktoren seien hier noch Dieselruß und Feinstaub, sowie das radioaktive Edelgas Radon genannt.

Der histologische Befund für die Typisierung des Lungenkarzinoms unterscheidet im Wesentlichen das nicht-kleinzellige und das kleinzellige Lungenkarzinom. Die Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ist, wenn überhaupt möglich, die Operation. Beim kleinzelligen Lungenkarzinom steht die Chemo- und Strahlentherapie im Vordergrund. Cytostatika werden je nach Zustand des Patienten verabreicht, dabei kommen hauptsächlich Platinsalze (Cisplatin und Carboplatin), Vinblastin, Etoposid und neuere Substanzen wie Taxole und Gemcitabin zum Einsatz.

In fortgeschrittenen Stadien metastasiert das Karzinom in die Lymphknoten im Mediastinum und später in Leber, Knochen, Nebennieren und Gehirn. Eine dauerhafte Heilung ist dann nicht mehr möglich. Eine Chance auf Heilung besteht oft nur in frühen Stadien (I und II) durch Operation. Die Rückfallrate ist jedoch hoch, so dass selbst nach vollständiger Remission über 50 % der Patienten ein Rezidiv erleiden.

Zur Zeit nur palliativ kommen Antikörpertherapien in Frage, wenn die Tumoren nicht mehr auf Zytostatika ansprechen. Diese Therapie, sowie Therapien mit Angiogeneseinhibitoren werden derzeit klinisch getestet. Insgesamt ist Lungenkrebs eine schlecht therapierbare Erkrankung und mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert („*American Society of Clinical Oncology, 2007 Annual Meeting Summaries*“).

2.3 Adenoviren und adenovirale Vektoren

Adenoviren wurden 1953 erstmalig identifiziert und beschrieben (ROWE et al., 1953). Die Gruppe der Adenoviren umfasst bisher 51 Serotypen, die vorwiegend Erkrankungen der Atemwege, des Gastrointestinalbereichs und Keratokonjunktivitis verursachen.

Das Adenovirus besitzt ikosaedrische Form und besteht aus insgesamt 252 Capsomeren, welche aus 240 Hexonen und zwölf Pentonen eine starre Hülle aufbauen. Das Genom aus doppelsträngiger, linearer DNA hat eine Länge von 36-38 kb. Ein Infektionsereignis durch Adenoviren ist abhängig von der Expression des CAR (*coxsackie adenovirus receptor*)-Rezeptors auf der Oberfläche der Zielzelle.

Das Adenovirus Serotyp 5 ist das am besten untersuchte und am weitesten verbreitete Vehikel zum Gentransfer. Zahlreiche Vektoren wurden bereits auf der Grundlage dieses Serotyps generiert, weil die Vorteile gegenüber anderen Viren, wie z.B. Retroviren und adenoassoziierten Viren in vielen Anwendungsbereichen

überwiegen. Adenovirale Vektoren vom Serotyp 5 lassen sich leicht in großer Zahl in geeigneten Verpackungszelllinien herstellen und aufreinigen (Graham and Prevec, 1995). Die Kapazität für das Einbringen fremder DNA bei gentherapeutischen Anwendungen liegt weitaus höher als in den oben genannten alternativen Vektoren. Adenoviren sind für den Gentransfer in Tumorgewebe die am häufigsten verwendeten Vektortypen. Sie erweisen sich als physikochemisch stabil und infizieren, im Gegensatz zu Retroviren, die Zielzellen unabhängig vom Zellzyklus. Erstmals wurde dieser Vektor in der Gentherapie zur Korrektur der zystischen Fibrose eingesetzt (Zabner et al., 1993), die Vektorimmunität hat jedoch eine klinische Anwendung unmöglich gemacht.

Genereller Nachteil adenoviraler Vektoren ist die hohe Immunogenität. Eine humorale und zelluläre Immunantwort wird nach Applikation sehr rasch initiiert (Yang et al., 1994). Besonders bei repetitiver Gabe dieser Vektoren ist die Effizienz durch die schnelle Immunsystem-vermittelte Eliminierung deutlich limitiert. Diese Effekte wurden unter anderem in einem Primaten-Modell gezeigt (Santra et al., 2005).

2.4 Ansätze der onkolytischen Virotherapie

Die für die Krebsbehandlung speziell entwickelten therapeutischen Viren erschließen das Feld zur onkolytischen Virotherapie. Einige natürlich vorkommende Viren wie etwa VSV (Vesicular Stomatitis Virus), Herpes- oder Polioviren besitzen onkolytische Eigenschaften, d.h. sie infizieren und zerstören bevorzugt maligne Zellen (Gromeier et al., 2000; Porosnicu et al., 2003). Durch diese Eigenschaften erhöht sich, bedingt durch Replikation und Tumorzelllyse, die Anzahl des onkolytischen Vektors im Bereich des Tumorgewebes. Der Vorgang der Infektion des Tumorgewebes ist hauptsächlich vom Tropismus des Virus und den Eigenschaften des Tumors abhängig; Optimierung der Tumor-spezifischen Infektion durch onkolytische Vektoren gehört zum Bereich des transduktionellen Targetings. Weiterhin ist es möglich, essentielle virale Gene zur Initiation der Replikation transkriptionell zu kontrollieren, was durch Wahl eines tumorspezifischen Promotors ermöglicht wird. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Kontrolle durch Attenuation. Die Optimierung dieser drei Regulationsmechanismen, transduktionelle Targeting, transkriptionelle Kontrolle und Attenuation, entscheidet im großen Maß die biologische Sicherheit des therapeutischen Vektors.

Für das transduktionelle Targeting wurden u.a. bispezifische Fusionsproteine entwickelt, sogenannte Adaptermoleküle, die aus dem Zielrezeptorprotein des viralen Vektors auf der einen Seite und einem natürlichen Liganden für einen tumorassoziierten Oberflächenrezeptor auf der anderen Seite bestehen. Die Beschichtung der Adenoviren mit solchen Adaptern haben stark erhöhte Transduktionsraten des Tumors gezeigt (Wickham, 2003; Kuhnel et al., 2004). Weitere Möglichkeiten bestehen in der direkten Modifikation des natürlichen Tropismus durch Mutation des Fiberknobproteins (Krasnykh et al., 1996).

Das erste entwickelte konditionell replikationskompetente Adenovirus (CRAd) ist ONYX-015, ein attenuiertes Adenovirus mit Deletion des p53-bindenden Proteins E1B-55k. Diese Deletion soll dadurch in natürlichen Zellen ohne alterierten p53-Status Apoptose induzieren (Bischoff et al., 1996). Weiterhin wurden zahlreiche Vektoren mit transkriptioneller Kontrolle entwickelt. Das Enzym der Zyklooxygenase-2 (Cox-2) ist in vielen Krebsarten erhöht, während es im natürlichen Gewebe weitaus schwächer exprimiert ist. Der Cox-2-Promotor wurde als Kontrolle des E1A-Locus in einem CRAd verwendet (Davydova et al., 2004). Weitere bekannte und etablierte Promotoren in CRAds sind z.B. der für Prostatakrebs spezifische Promotor des PSA (Prostata-spezifisches Antigen)-Gens (Rodriguez et al., 1997) und der TERT (Telomerase-reverse Transkriptase)-Promotor, der in nahezu allen Krebsarten aktiv ist (Wirth et al., 2003).

2.5 Tumormodelle mit konditionell replikationskompetenten Adenoviren

Durch die hohe Wirtsspezifität von humanen Adenoviren vermehren sich diese nach einer Infektion nur in humanen Zellen. Nach einer Infektion von Zellen anderer Spezies werden in der Regel keine oder nur eine sehr geringe Zahl an funktionellen Partikeln assembliert, was für ein Tumormodell nur die Verwendung von humanen Zelllinien erlaubt (Younghusband et al., 1979). Die Untersuchung von CRAds in Tumoren humaner Herkunft im Nacktmausmodell ist deshalb die gängigste Möglichkeit (Kawashima et al., 2004; Berry et al., 2008).

Nacktmäuse besitzen ihren Phänotyp aufgrund eines Gendefekts des *Foxn1*-Gens. Dieser Gendefekt führt zu einem degenerierten Thymusgewebe. Durch diese Degeneration können die Tiere keine reifen T-Lymphozyten bilden und haben demzufolge stark geschwächte Immunreaktionen. Transplantiertes xenogenes

Gewebe wird aufgrund dieses Immundefekts nicht abgestoßen. Generell ist es daher für die Untersuchung von xenogenem Gewebe *in vivo* ein wertvoller Ansatz.

Die subkutan inokulierten Tumoren in diesem Modell bestehen aus humanen, für Adenoviren permissiven Zelllinien. Nach intratumoraler Injektion des therapeutischen Vektors können Tumorregressionen ermittelt und verschiedene Virotherapieansätze miteinander verglichen werden. Der Vorteil der Akzeptanz des xenogenen Gewebes aufgrund des Immundefekts bringt allerdings auch gleichzeitig den Nachteil mit sich, dass natürliche Immunreaktion gegen den CRAd wird in diesem Modell außer Acht gelassen werden. Bekannt ist, dass die starke Immunogenität dieser Vektoren eine effektive B- und T-Zell-Immunreaktion forciert, die einen signifikanten Effekt auf die Eradizierung des therapeutischen Vektors hat (Zabner et al., 1993, Santra et al., 2005).

Für die Etablierung von onkolytischen Adenoviren für die klinische Anwendung wäre die Klärung von grundlegenden Fragestellungen im Rahmen eines vollständig immunkompetenten murinen Modells sehr wichtig. Bisher stehen jedoch nur zwei Modelle zur Verfügung: ein syngenes und immunkompetentes Mausmodell mit murinen Zellen, in denen sich CRAds nicht vermehren oder ein Nacktmausmodell mit humanen Zellen, in denen ein CRAd zwar propagiert wird, dafür aber immunologische Einflüsse ignoriert werden.

2.6 Funktionen regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (T-regs) bilden eine Subpopulation von CD4⁺-T-Zellen, die auf die Inhibition von Immunreaktionen spezialisiert sind. Die Existenz solcher Zellen wurde bereits von Gershon im Jahre 1975 postuliert (Gershon, 1975). Die Charakterisierung solcher Zellen gestaltete sich jedoch aufgrund fehlender verlässlicher Marker als schwierig. Der Durchbruch gelang erst 1995 durch Sakaguchi *et al.* Sie konnten zeigen, dass CD4⁺-Zellen mit hoher Expression der membranständigen α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2Ra oder CD25) in der Lage waren, Autoimmunität zu unterdrücken (Sakaguchi et al., 1995). Die genaue Untersuchung dieser Population war jedoch weiterhin schwierig, da die Expression von CD25 allein nicht kennzeichnend für T-regs ist, da auch aktivierte CD4⁺-Zellen diesen Marker exprimieren. Auch weitere Marker, die zur Beschreibung von T-regs verwendet werden, wie GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor*), CTLA-4

(*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) und Galectin-1 sind auf anderen T-Zell-Populationen zu finden, die nicht zur Gruppe der T-regs gehören.

T-regs haben einen Anteil von etwa 5-10 % an der Gesamtpopulation der CD4⁺-T-Zellen in der Maus (Brunkow et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead winged/helix-transcription factor*) wird von natürlichen T-regs exprimiert, induziert den regulatorischen Phänotyp und ist der Marker für eine sehr spezifische Identifikation von natürlichen T-regs (Fontenot et al., 2003). Natürliche T-regs entstehen im Thymus und vermitteln ihre Funktion durch Zell-Zell-Kontakt. Es wird angenommen, dass natürliche T-regs selbstreaktiv sind und bei der Inhibition von Autoimmunität eine zentrale Rolle spielen. Die Untersuchung von Foxp3 hat die zentrale Rolle für den Erhalt der Selbsttoleranz gezeigt. Ein Gendefekt in dem auf dem X-Chromosom lokalisierten Foxp3-Gen führt bei hemizygoten männlichen Mäusen zu einem *scurfy*-Phänotyp, einem hyperlymphoproliferativen Syndrom mit pathogener Infiltration von Lymphozyten in multiple Organe und ist mit starken Inflammationen und Autoimmunität assoziiert. *Scurfy*-Mäuse sind postnatal nur wenige Wochen lebensfähig (Lyon et al., 1990; Clark et al., 1999).

Weiterhin umfasst die regulatorische Population auch T-Zellen, die aus CD4⁺ CD25⁻ in der Peripherie induziert werden können und zu CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen differenzieren. Hauptsächlich entfalten induzierte T-regs ihre inhibitorische Wirkung durch Sekretion der Zytokine TGF- β (*transforming growth-factor- β*) und IL-10 (Interleukin 10). Zu dieser Gruppe gehören die Th3- (T-Helferzelle Typ 3, vorwiegende Sekretion von TGF- β) und Tr1-Zellen (T-regulatorische Zelle Typ 1, vorwiegende Sekretion von IL-10), die ihre immunsuppressive Wirkung lokal durch diese Zytokine vermitteln (Groux et al., 1997).

T-regs supprimieren unter anderem die Antikörperproduktion von B-Zellen und die Funktionen von Monozyten und dendritischen Zellen als pAPC (*professional antigen presenting cell*) zelluläre Immunreaktionen zu initiieren. T-regs sind daher an nahezu jeder Immunreaktion beteiligt, die bei einer Fehlregulation zu zahlreichen Krankheiten wie etwa Autoimmunität, allergische Reaktionen, chronische Inflammationen und Krebs führen (Sakaguchi et al., 1995; Wilczynski et al., 2008). Auch die Existenz von Virus-induzierten T-regs, die bereits kontrovers diskutiert wurde, konnten erstmals im Fall von HIV von Garba beschrieben werden (Garba et al., 2002).

In Bezug auf Tumormunität konnte durch die Depletion mit CD25-spezifischen Antikörpern eine erhöhte antitumorale Tumormunität hervorgerufen und in

einigen Modellen eine Regression des Tumors erreicht werden (Liyanage et al., 2002; Ghiringhelli et al., 2004; Nicholl et al., 2004). Nicholl et al. konnte in einem Tumormodell zeigen, dass 48 % der tumorinfiltrierenden CD4⁺-T-Zellen regulatorische Funktionen zur Suppression von Tumorantigenen besitzen (Nicholl et al., 2004). Diese tumorassoziierten T-Zellen supprimieren naive CD4⁺-T-Zellen und inhibieren die Sekretion von IL-2 nach Aktivierung mit tumorspezifischen Liganden. Diese und viele weitere Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass antigenspezifische T-reg Zellen im Bereich des Tumors vorhanden sind und dort durch lokale Immunsuppression die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort unterbinden (Woo et al., 2001; Barnett et al., 2005).

2.7 Funktionen und klinische Relevanz dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind hoch spezialisiert auf die Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen. DCs gehören somit zu den pAPCs und regulieren die antigenspezifische Aktivierung von Lymphozyten. Sie nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein, denn sie fungieren als Bindeglied der angeborenen und erworbenen Immunität.

DCs entstehen aus Differenzierung von Knochenmarkszellen und bilden generell stark heterogene Populationen. Sie können grob in ein unreifes und reifes Stadium aufgeteilt werden können. Im unreifen Stadium nehmen die Zellen auf verschiedene Weise Antigene aus ihrer Umgebung durch Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose durch Rezeptoren (DEC-205, Mannose-Rezeptor, Fc-Rezeptoren etc.) oder Phagozytose auf und dirigieren die Produkte zu den Antigen-prozessierenden Kompartimenten (Liu et al., 2006; Dudziak et al., 2007; Burgdorf et al., 2007). *Toll-like* Rezeptoren (TLR) spielen dabei während der Aufnahme des Materials eine Schlüsselrolle. Eine Bindung des Liganden führt zur Stimulation der DC-Reifung und die Sekretion zahlreicher Zytokine. Bisher sind 11 TLRs in Säugern bekannt (Zhang et al., 2004). Diese Rezeptoren erkennen hoch konservierte Strukturen von pathogenen Organismen, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). PAMPs sind sehr variabel, sie umfassen die Erkennung der Strukturen von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten. Beispielhaft seien hier als Liganden für TLR4 die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien genannt, welches im Komplex mit dem myeloiden Differenzierungsprotein-2 (MD-2) an den Rezeptor bindet. Weiterhin erkennt TLR2 Peptidoglykane (PGN) von Gram-positiven Bakterien

im Komplex mit TLR1 oder TLR6. Doppelsträngige (ds) RNA von Viren ist spezifischer Ligand für TLR3, und TLR9 erkennt nicht-methylierte DNA viraler und bakterieller Herkunft.

Die genauen Umstände der Stimulation von DCs und in welcher Form die Antigene aufgenommen werden, haben einen entscheidenden Ausgang für die Reifung und der daraus folgenden Effektorfunktion (die sogenannte Polarisierung der DCs) (Huang et al., 2001). Das Zusammenspiel der TLRs wird heute erst im Ansatz verstanden und reguliert letztendlich die Effektivität und die Art der Aktivierung von T-Zellen. Nach der Aufnahme von Pathogenen durch DCs beginnen die Zellen zu Reifen und in nahe gelegene lymphoide Organe zu wandern, um dort als pAPC lokalen Lymphozyten ihre Antigene zu präsentieren. Dies geschieht über membrangebundene Moleküle, in denen die antigenen Peptide relativ stabil, jedoch nichtkovalent gebunden sind. Diese Moleküle werden als MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I und MHC-Klasse-II bezeichnet und bilden die Basis für die Aktivierung von T-Zellen.

Ein wichtiger Punkt bei der Aktivierung naiver T-Zellen ist die Bereitstellung von drei Signalen durch die pAPC. Der T-Zell Rezeptor (TCR) muss kompatibel zum MHC-Peptid-Komplex (sowohl bei der Präsentation mit MHC-Klasse-I, als auch bei MHC-Klasse-II) der pAPC sein (Signal 1), weiterhin ist für die erfolgreiche Aktivierung die Kostimulation über Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) an den Liganden CD28 der T-Zelle essenziell (Signal 2). Zusätzlich beeinflussen die Ausschüttung von Zytokinen und membranständige Moleküle wie OX40L und CD40L den charakteristischen Typ der entstehenden Immunreaktion (zusammengefasst in (Bevan, 2004)).

Antigen-spezifische T-Zellen, welche von pAPCs aktiviert wurden, vermitteln Immunreaktionen, die sich hauptsächlich in vier Typen einteilen lassen. Diese Typen unterscheiden Th1- (T-Helfer1-) und Th2 (T-Helfer-2)-Immunreaktionen, sowie T-regs und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*). Die Zellen einer Th1-vermittelten Immunreaktion sezernieren hauptsächlich Interferon- γ (IFN) und Tumornekrosefaktor- β (TNF), die daraufhin Makrophagen und andere Effektorzellen aktivieren. Zellen des Th2-Typs favorisieren humorale Immunantworten durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13. Aktivierte B-Zellen eines solchen Typs schalten beim Klassenwechsel ihre Isotypen auf Immunglobuline (Ig) des Typs G (IgG)1, IgA und IgE (zusammengefasst in (Murphy and Reiner, 2002)). CTLs wirken direkt

hochspezifisch durch Sekretion von Perforin und Granzymen zytotoxisch auf ihre Zielzellen.

Die Verwendung von DCs als pAPC für eine klinische Krebs-Immuntherapie ist abhängig von der Generierung von Zellen in klinisch relevanter Qualität und Quantität. Es sind allerdings nur solche Methoden zur Generierung relevant, die sich auch unter GMP-(*good manufacturing practise*) Protokollen verwirklichen lassen. Dazu ist die Isolierung *ex vivo* aus Patientenblut durch Positivselektion, Negativselektion oder beidem in einem geschlossenen System (z.B. durch Gebrauch eines CliniMACS-Systems, (Campbell et al., 2005)) ein viel versprechender Ansatz. Eine weitere Möglichkeit einer Quelle für die Generierung von DCs sind CD34⁺-Vorläuferzellen aus PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*), die, je nach Protokoll, für ein bis zwei Wochen mit GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) oder IL-4 oder IL-13 (Lopez et al., 1997; Luft et al., 1998; Chen and Wu, 1998) stimuliert werden.

Eine weitere Hürde für die klinische Verwendung von DCs ist das Beladen der Zellen mit Tumor-assoziiertem Antigen (TAA). Ein ideales TAA ist ausschließlich im Tumor zu finden und eng mit dem malignen Wachstum verknüpft, um die Möglichkeit einer immunologischen Selektion zu unterbinden. Leider sind TAA natürlich vorkommende Antigene selbsttoleranter Herkunft und deshalb oft nur sehr schwach immunogen. Außerdem sind sie häufig unbekannt oder erfordern aufwendige Analysen des individuellen Tumor-Materials des Patienten. Trotz dieser Gegebenheiten können DCs verwendet werden, um T-Zell-vermittelte Immunreaktionen hervorzurufen. Dazu wurden Strategien mit definierten Peptid-Epitopen, spezifischen TAA in Form von Proteinen oder ganzes Tumorzell-Material verwendet. Diese Ansätze wurden mit sowohl viralen als auch nicht-viralen Techniken verwirklicht (Parkhurst et al., 1996; Zwaveling et al., 2002; Zeng et al., 2002; Velders et al., 2003; Delluc et al., 2007).

Die Immunotherapie mittels DC-Vakzinierung hat sich im Verlauf des letzten Jahrzehnts enorm entwickelt. Eine große Zahl klinischer Studien sind dazu durchgeführt worden. Eine Liste aller publizierten Studien ist im Internet abrufbar (<http://www.mmri.mater.org.au>). Dort wird deutlich, dass Tumor-spezifische Immunreaktionen häufig beobachtet werden. Allerdings sind persistente Immunantworten von klinischer Relevanz gegen den Tumor höchst selten. Weiterhin zeigen die Studien, dass diese Art der Therapie mit keinen bis geringen Nebenwirkungen assoziiert ist. Die Immuntherapie mittels DC-Vakzinierung ist mit

relativ einfachen Mitteln auch im murinen Modellsystem anwendbar. Protokolle für die Generierung einer großen Zahl von DCs *in vitro* aus dem Knochenmark von Mäusen wurden bereits etabliert und optimiert (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999). Auch die Quelle der TAA ist hierbei in den meisten Fällen leicht zu erschließen. Tumorzell-Material steht häufig in Form einer etablierten Zelllinie zur Verfügung. Bei TAA in Form von gut charakterisierten Proteinen können leicht transgene Zellen durch retroviralen Gentransfer hergestellt und dazu die immunogenen Peptide für das Beladen der DCs verwendet werden (Fallarino et al., 1999; Nava-Parada et al., 2007). Die Methode der DC-Vakzinierung für immuntherapeutische Ansätze im Mausmodell erschließt demnach auf einfache Weise ein aussichtsreiches Feld zur alternativen Krebstherapie, welches z. Zt. intensiv im präklinischen Bereich untersucht wird (Velders et al., 2003; Delluc et al., 2007).

2.8 Kreuzpräsentation und -aktivierung

Die Kreuzpräsentation ist in der Immunologie ein zentraler Vorgang zur Initiation zellulärer Immunreaktionen. Die Präsentation von Antigenen durch pAPC für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen kann über zwei Pfade erfolgen. Zum Einen durch die direkte Präsentation von endogenen Antigenen, zum anderen über den Pfad der Kreuzpräsentation exogener Antigene. Der Vorgang von aufgenommenen exogenen Antigenen, die durch pAPCs prozessiert werden und deren Peptide dann im Kontext von MHC-Klasse-I Molekülen zur Präsentation auf der Zelloberfläche erscheinen, wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Von einer Kreuzaktivierung wird dann gesprochen, wenn dieses Phänomen zur Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen führt (Cresswell et al., 2005; Bevan, 2006).

Der erste Zelltyp, bei dem Kreuzpräsentation festgestellt wurde, konnte im Jahr 1993 identifiziert werden (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993). Vor dieser Zeit gab es bereits Hinweise auf diesen Vorgang (Bevan, 1976), jedoch wurde allgemein angenommen, dass exogene Antigene ausschließlich mit der Präsentation von MHC-Klasse-II assoziiert sind und CD8⁺-T-Zellen nur dann aktiviert werden können, wenn die Antigene des Pathogens zytosolisch in der pAPC vorhanden sind. Durch die Komplexität des Mechanismus der Kreuzpräsentation wurde dessen Existenz jedoch lange in Frage gestellt. Anschließend wurden jedoch neben Makrophagen noch weitere Zelltypen identifiziert, die zur Kreuzpräsentation fähig sind. Dazu gehören neutrophile Granulozyten (Potter and Harding, 2001; Tvinnereim et al., 2004), B-

Lymphozyten (Cho et al., 2001) und, auf den Prozess der Kreuzpräsentation spezialisiert, DCs (Mellman and Steinman, 2001). Generell können DCs Antigene in vielen Formen kreuzpräsentieren. Neben apoptotischen Zellen können opsonierte Tumorzellen, nekrotisches Material, Immunkomplexe und Fragmente lebender Zellen als Quelle der Antigene dienen (Albert et al., 1998; Sauter et al., 2000; Harshyne et al., 2001; Dhodapkar et al., 2002; Schuurhuis et al., 2006). Die genaue Route der Antigene für die weitere Prozessierung zur Kreuzpräsentation ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Prozess scheint einer komplexen Regulation zu unterliegen, bei der diverse Komponenten über die Art der Prozessierung und Präsentation entscheiden (Villadangos and Ploegh, 2000). Bekannt ist, dass Antigenenthaltende Phagosomen mit Komponenten des MHC-Klasse-I-Weges des ER (endoplasmatisches Retikulum) zu einem ER-Phagosom verschmelzen können und damit alle nötigen Bedingungen für die Präsentation erfüllen. Dieser prinzipiell attraktiv erscheinende Weg ist wahrscheinlich jedoch nicht der vorherrschende Mechanismus, weil die Antigene so nicht in jedem Fall vollständig prozessiert werden können (Touret et al., 2005).

Viele Studien konnten einen weiteren Weg der Kreuzpräsentation belegen. Phagozytose von Antigenen über Einstülpungen der Plasmamembran bilden Phagosomen mit Bestandteilen von Zelloberflächenmolekülen (Willinger and Frankel, 1979). Nach der Fusion der Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen treten die Proteine über einen noch unbekanntem Mechanismus in das Zytosol über. Dort werden sie vom Proteasom fragmentiert und die entstehenden Peptide über TAP (*transporter associated with antigen processing*), einem spezialisierten Transporter für die Peptidtranslokation, in das ER überführt. Im Lumen des ER werden die Peptide schließlich an neu synthetisierte MHC-Komplexe gebunden und über den Golgi-Apparat zur Präsentation an die Zelloberfläche transportiert.

Die Funktion der Kreuzpräsentation und –aktivierung ist sowohl für antivirale als auch für antitumorale Immunreaktionen von elementarer Bedeutung. Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen limitieren durch Abtöten infizierter Zielzellen die Replikation und Ausbreitung von Viren und eine CTL-vermittelte Lyse von malignen Zellen ist die effektivste Waffe des Immunsystems gegen Tumoren.

2.9 Mechanismen der Tumortoleranz

Immunologische Toleranz ist für das Überleben und den Progress des Tumors von grundlegender Bedeutung. Diese Toleranz etabliert der Tumor bereits in frühen Stadien seiner Entwicklung. Je nach Art des Tumors bewegt sich die Akzeptanz des malignen Gewebes zwischen völliger Toleranz (z.B. beim Pankreaskarzinom) oder einer chronischen Inflammation (z.B. beim Hodgkin-Lymphom).

Immunologische Toleranz eines Tumors basiert zumindest zum Teil auf der Präsentation von Selbst-Antigenen auf Tumorzellen. Die natürlichen tolerogenen Mechanismen des Immunsystems, die Autoimmunität verhindern, schützen auch den Tumor vor der Abstoßung. Diese zentrale Toleranz gegen Selbst-Antigene wird hauptsächlich von Epithelzellen des Thymus, DCs und Makrophagen vermittelt (Gallegos and Bevan, 2004). Autoimmune T-Zellen, die die Selektion im Thymus unterlaufen haben oder reaktiv gegen Selbst-Antigene sind, die nicht im Thymus präsentierte werden, unterliegen der Kontrolle der peripheren Toleranz. Tumorzellen mit der Expression von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen gegen Selbst-Antigene induzieren aufgrund der fehlenden kostimulatorischen Signale eine T-Zell-Anergie bei auto- oder tumorspezifischen T-Zellen (Wintterle et al., 2003). Anergie T-Zellen proliferieren nicht mehr effizient und können auch nicht mehr in bewaffnete Effektorzellen differenzieren, selbst bei nachträglicher Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen. Diese Interaktionen führen zu tumorspezifischer T-Zell-Toleranz. Diese Toleranz wird darüber hinaus auch durch tumorassoziierte unreife DCs aufgrund fehlender Gefahrensignale vermittelt (Kusmartsev et al., 2005) und durch AICD (*activation-induced cell death*) aufgrund kontinuierlicher Stimulation mit Tumorantigenen (Saff et al., 2004). Weiterhin wirken Toleranzmechanismen antigenspezifisch durch T-regs (Misra et al., 2004) oder durch die Beeinflussung der Tumorumgebung durch immunsupprimierende Faktoren wie Zytokine, Prostaglandine und Todesrezeptoren, um nur einige zu nennen (Bellgrau et al., 1995; Govinden and Bhoola, 2003; Grutz, 2005; Wang and DuBois, 2006).

Die Mechanismen der Tumortoleranz sind mitunter sehr komplex und können einander komplementieren. Sie sind in der Regel jedoch reversibel und können, zumindest zeitweise, z. B. durch Gabe von Antikörpern gegen bestimmte Faktoren bzw. Lymphozytenpopulationen, außer Kraft gesetzt werden (Sakaguchi et al., 1995).

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Die eingeschränkten Möglichkeiten der Behandlung solider, hochmaligner Tumoren, insbesondere im metastasierten Stadium, stellen eine Herausforderung für die Etablierung verbesserter und alternativer Therapiemöglichkeiten zu den Standardverfahren wie chirurgische Resektion bzw. der Chemo-/Radiotherapie dar. Eine neue, viel versprechende Alternative hierzu ist die Verwendung onkolytischer Adenoviren im Rahmen einer Virotherapie.

Das derzeit verwendete murine Nacktmausmodell zur Untersuchung onkolytischer Adenoviren erlaubt keine Rückschlüsse auf den Einfluss des Immunsystems auf sowohl den viralen Vektor als auch das therapierte Tumorgewebe. Bekannt ist bislang lediglich, dass Adenoviren *per se* eine starke Immunogenität aufweisen, die eine starke zelluläre und humorale Immunreaktion provoziert.

Zur Etablierung eines immunkompetenten Mausmodells zur Untersuchung der Virotherapie sollte deshalb zu Beginn dieser Arbeit eine murine Zelllinie identifiziert werden, die eine effektive Spezies-übergreifende Vermehrung humaner Adenoviren ermöglicht, um eine realistische Simulation des Infektionsgeschehens zu simulieren. Mit Hilfe einer solchen Zelllinie sollte ein syngenes Tumormausmodell als Basis für virotherapeutische Versuchsansätze generiert werden. Weiterhin sollte dieses Modell die Klärung von Fragestellungen bezüglich der Wechselwirkungen von humoralen und zellulären Immunreaktionen gegen den virotherapeutischen Vektor einerseits und dem Tumorgewebe andererseits im Rahmen der Virotherapie ermöglichen.

Bestehende Virotherapieprotokolle sollten durch den Einsatz einer akzessorischen Immuntherapie in spezieller Form der dendritischen Zellvakzinierung erweitert und deren Beeinflussung der Vektor- bzw. Tumormunität bezüglich potentieller synergistischer Wirkungen und der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht werden.

Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollten schließlich zur Entwicklung eines optimierten Therapiemodells zur Kombination von Viro- und Immuntherapie herangezogen werden. Eine effektive Kombinationstherapie würde nicht nur eine effiziente Therapiealternative zur Behandlung solider Primärtumoren darstellen, sondern könnte möglicherweise durch die Einbeziehung des Immunsystems auch die Behandlung nichtdetektierbarer Mikrometastasen ermöglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines immunkompetenten murinen Modells zur Untersuchung onkolytischer adenoviraler Vektoren

3.1.1 Das onkolytische Adenovirus hTERT-Ad

Das humane Telomerase-abhängig replizierende Adenovirus hTERT-Ad zeigt in Bezug auf die Replikation *in vitro* eine hohe selektive Lyse für hTERT⁺ (*human telomerase reverse transcriptase*)-Zellen (Wirth et al., 2003) und ist daher ein aussichtsreicher Ansatz in der Virotherapie solider hTERT⁺-Tumoren.

Dieser adenovirale Vektor vom Serotyp 5 besitzt eine Deletion im Bereich der frühen E3-Gene, welche für die Unterdrückung der antiviralen Immunantwort von Bedeutung, aber für die virale Replikation entbehrlich sind. Weiterhin ist der Wildtyp-Promotor für das replikationsessentielle Gen E1A gegen den humanen Promotor des *hTERT*-Gens ausgetauscht. Dem Gen E1B wurde eine IRES (*internal ribosome entry site*) mit EGFP angehängt, um den lytischen Zyklus verfolgen zu können. Ein lytischer Zyklus von Adenoviren (Ad) dauert etwa 48 Stunden ab dem Zeitpunkt der Infektion.

Aufgrund der hohen onkolytischen Selektivität sollte dieser Vektor die Basis für die Etablierung einer virotherapeutischen Behandlung von Tumoren im murinen Modell im Rahmen dieser Arbeit sein. Alle onkolytischen Therapien in dieser Arbeit wurden mit diesem CRAd durchgeführt.

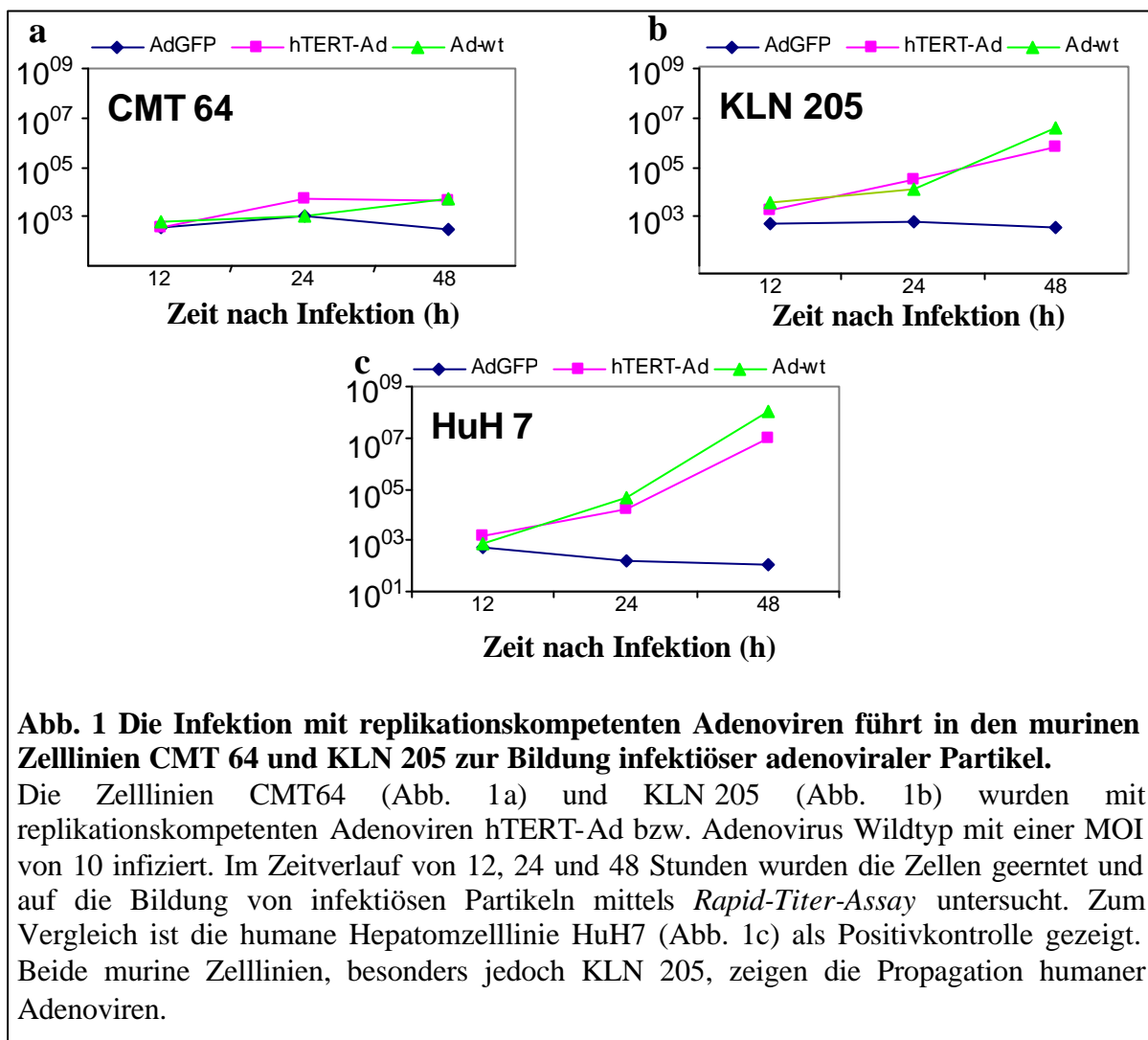
3.1.2 Identifikation einer murinen Zelllinie permissiv für ein immunkompetentes Onkolysemodell

Bisher existiert kein immunkompetentes Mausmodell für die Untersuchung von onkolytischen Adenoviren im immunkompetenten Wirt. Bisherige Untersuchungen solcher Viren *in vivo* beziehen sich auf immundefiziente Nacktmäuse mit xenogenen Tumoren humaner Herkunft (Heise et al., 1997; Georger et al., 2002).

Das Problem eines murinen Modells zur onkolytischen Virotherapie besteht darin, dass humane Adenoviren zwar CAR-abhängig murine Zellen infizieren können, aber aufgrund des humanen Ursprungs und der hohen Wirtsspezifität der Viren erzeugt ein Replikationszyklus nahezu keine funktionellen Partikel. Es lassen sich nach Infektion mit Ad-wt (Adenovirus-Wildtyp) große Mengen früher adenoviraler Gene,

geringe Mengen später Proteine und Synthese adenoviraler DNA feststellen, aber nur 0,2 PFU pro infizierter Zelle NIH 3T3-Zelle nachweisen (Younghusband et al., 1979).

Für die Etablierung eines immunkompetenten Onkolysemodell war es demnach essenziell eine murine Zelllinie zu finden, die humane Adenoviren propagiert. Deshalb wurden für zahlreiche Zelllinien murinen Ursprungs auf die Propagation von humanen Adenoviren getestet.



Für den Versuch wurden replikationskompetente Viren Ad-wt bzw. hTERT-Ad verwendet. Zellen wurden infiziert und nach 12, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen auf das Auftreten infektiöser adenoviraler Partikel untersucht. Als Kontrolle diente AdGFP. Zwei der untersuchten Zelllinien zeigten, wie in Abbildung 1 dargestellt, eine Propagation von Ad-wt und hTERT-Ad. Die Zelllinie CMT 64 weist eine Vermehrung der Viren nach 48 Stunden um den Faktor 10. Der Faktor für die

Zelllinie KLN 205 beträgt 10^4 im gleichen Zeitraum. Damit liegt die Viruspropagation in KLN 205 lediglich eine logarithmische Stufe unterhalb der von permissiven humanen HuH 7 Zellen (Propagation in der Größenordnung 10^5).

Anschließend sollte mit der Zelllinie KLN 205 gezeigt werden, wie effektiv die Propagation *in vivo* ist, um eine im Vergleich zu replikationsdefizienten Vektoren stärkere humorale Immunantwort zu induzieren. Dazu wurden KLN 205-Zellen jeweils drei Gruppen mit je zwei Tieren i.p. (intraperitoneal) appliziert. Eine Gruppe erhielt mit AdGFP transduzierte Zellen, einer weiteren Gruppe wurden hTERT-Ad-infizierte Zellen mit MOI 25 verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt nicht infizierte Zellen. Nach 18 Tagen wurden die vereinigten Seren im ELISA auf das Auftreten von IgG/IgM Immunglobulinen gegen adenovirale Hüllproteine untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant gesteigerte humorale Immunität durch die Propagation von hTERT-Ad in KLN 205-Zellen (s. Abb. 2).

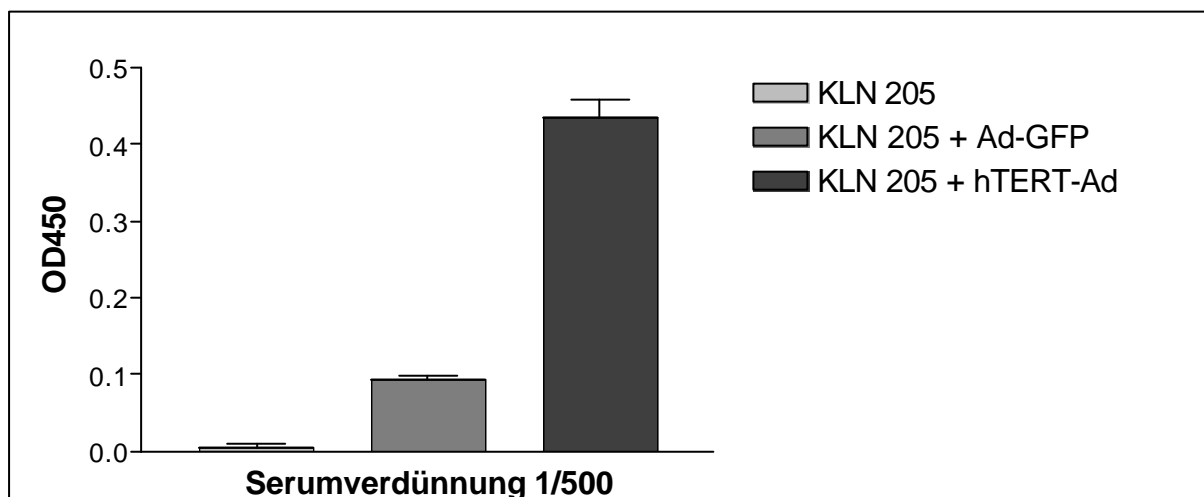


Abb. 2 Initiation einer starken humoralen Immunantwort durch virale Propagation von hTERT-Ad *in vivo*

Die *in vitro* Ergebnisse der Propagation von humanen Adenoviren in KLN 205 sollte auf die immunologische Relevanz für ein Tumormodell überprüft werden. Dazu wurden KLN 205-Zellen i.p. in DBA/2 Mäuse injiziert, die entweder mit replikationsdefizientem AdGFP transduziert wurden oder mit replikationskompetentem hTERT-Ad. Die Ergebnisse des ELISA gegen die Immunglobulinklassen IgG und IgM aus dem Serum der Mäuse zeigen einen deutlich erhöhten Antikörpertiter gegen Adenoviren (Faktor >4) durch Propagation von hTERT-Ad in den Zellen im Vergleich zum replikationsdefizienten Vektor. Uninfizierte KLN 205 dienten als Kontrolle.

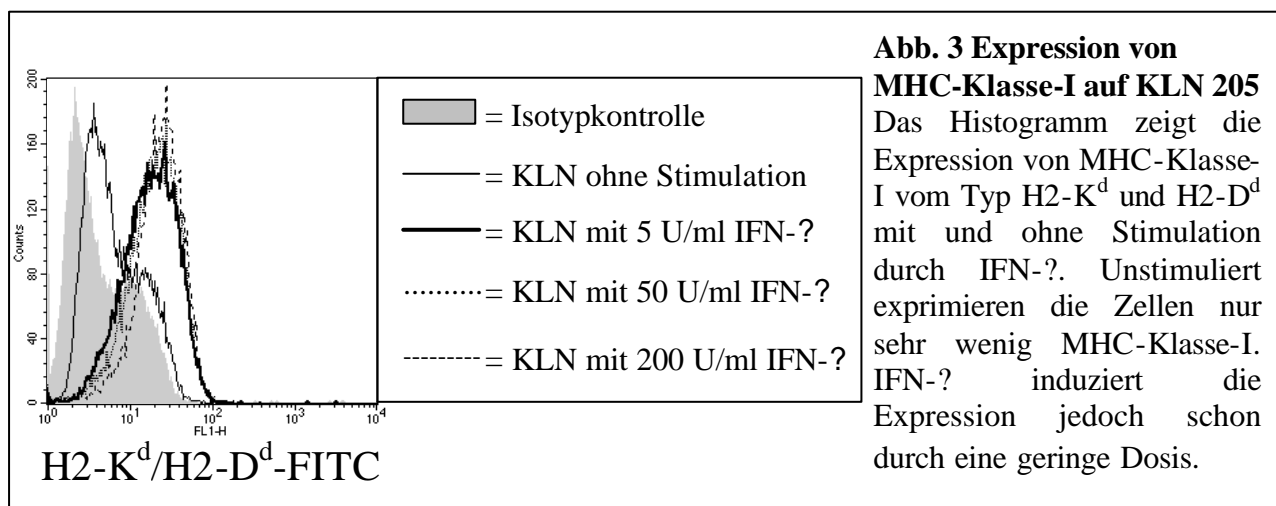
Dieser Versuch zeigt, dass die Fähigkeit der Propagation von hTERT-Ad in KLN 205 stark genug ist, um auch in einem immunkompetenten *in vivo*-Modell einen relevanten Effekt zu erzielen.

Mit der Fähigkeit, humane Adenoviren in relevantem Ausmaß im Vergleich zu humanen Zellen zu propagieren und der beobachteten Relevanz auf die humorale Immunität *in vivo*, wurde die Zelllinie für ein murines onkolytisches Tumormodell weiter untersucht.

3.1.3 MHC-Klasse-I-Charakterisierung der Zelllinie KLN 205

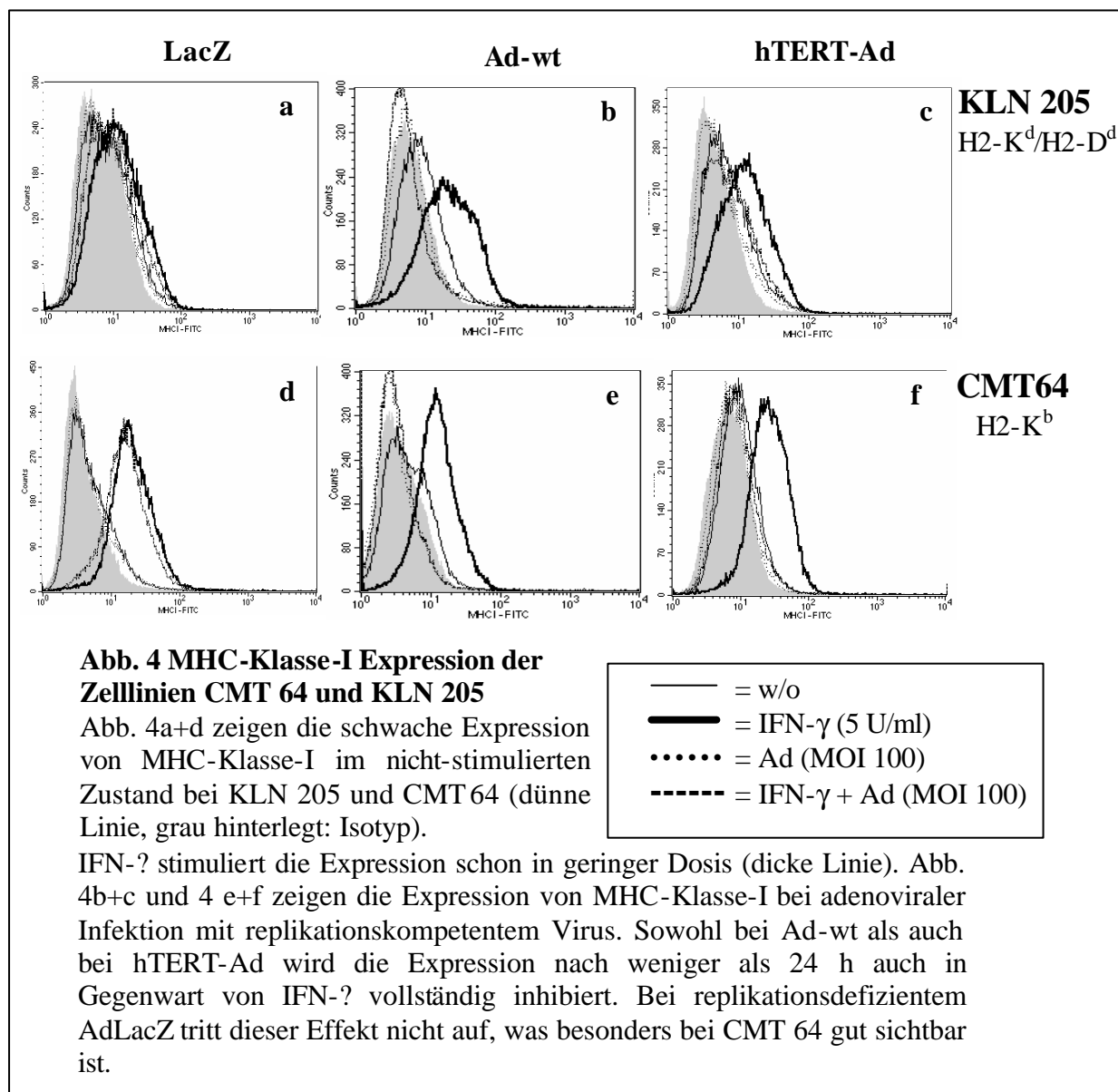
Die Plattenepithelkarzinomzelllinie KLN 205 wurde aus dem Mausstamm DBA/2 etabliert. Eine subkutane Injektion in DBA/2-Mäuse von $5 \cdot 10^6$ Zellen erzeugt einen rasch wachsenden Tumor *in situ*.

Bei der Verwendung von KLN 205 für ein immunologisches Untersuchungsmodell für Tumorthérapien ist gerade bei immunkompetenten Mäusen die Fähigkeit der Präsentation von zellulären Antigenen von Interesse. Prinzipiell kann die Präsentation von immunogenen Tumorantigenen in Form von Peptiden auf MHC-Klasse-I Molekülen zu einer Abstoßung des Tumors durch zytotoxische Lymphozyten führen. Die Expression ist daher in vielen Tumoren zur Immunevasion im Vergleich zu normalem Gewebe verringert. Die MHC-Klasse-I-Expression ist bei KLN 205 unter normalen Bedingungen in Zellkultur schwach, aber detektierbar. Durch relativ geringe Dosen von rekombinantem IFN- γ ist sie jedoch induzierbar (s. Abb. 3).



Häufig findet man eine verringerte MHC-Klasse-I-Expression auch im Rahmen viraler Infektion, Adenoviren verfügen in den E1- und E3-Regionen über Proteine, die mit der MHC-Klasse-I Präsentation negativ interferieren (Routes et al., 1993). Da das hTERT-Ad eine intakte E1 Region besitzt, wurde aus diesem Grund die Expression

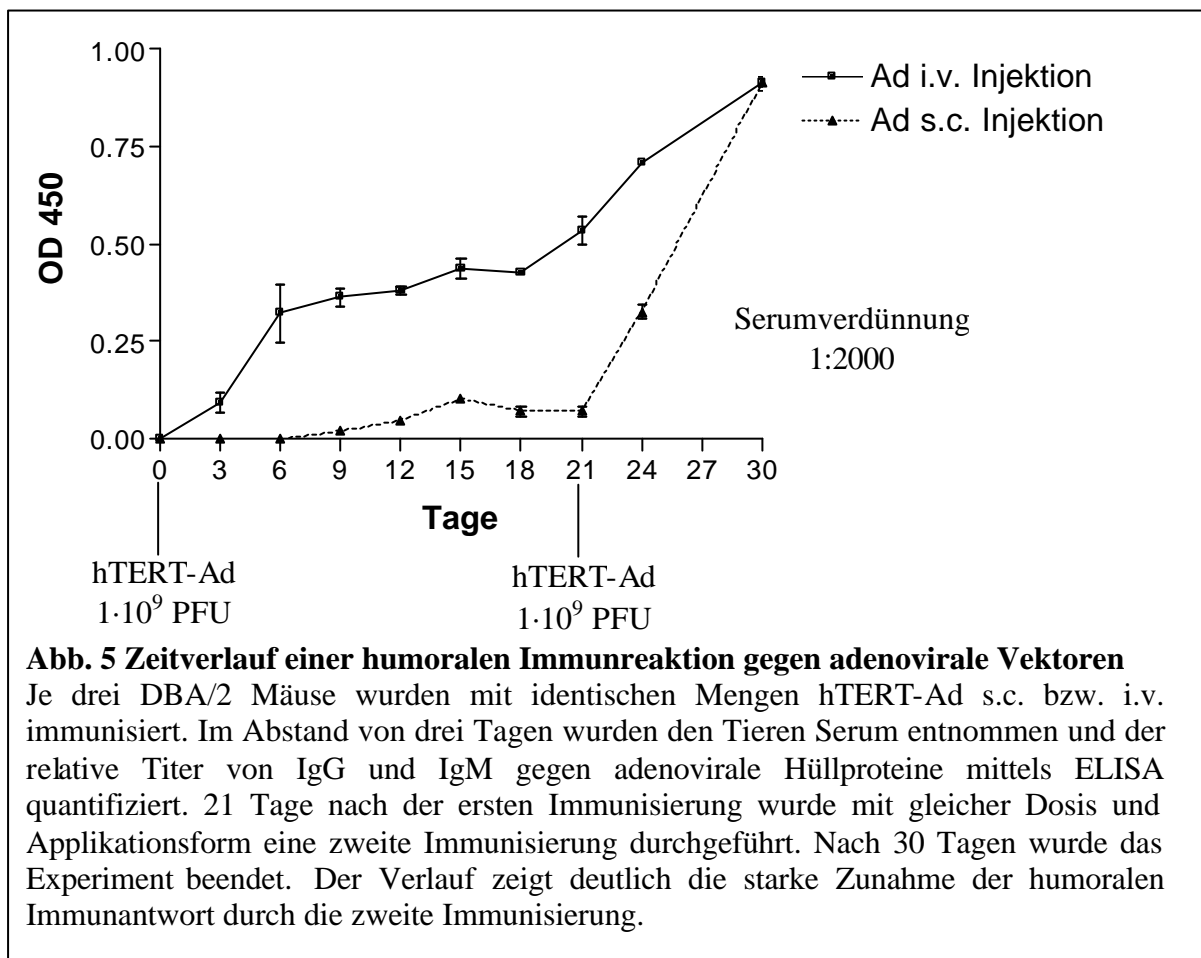
von MHC-Klasse-I bei KLN 205 und CMT 64 analysiert. Infolge viraler Infektion zeigt sich eine starke Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression, allerdings nur, wenn replikationskompetente Viren eingesetzt werden (s. Abb. 4 a-f).



Obwohl beide Zelllinien mit IFN- γ stimulierbar sind, kommt es trotz der Anwesenheit von IFN- γ bei adenoviraler Infektion mit intakter E1 Region zur Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression. Replikationsdefiziente Adenoviren wie AdLacZ mit deletierter E1 Region zeigen dieses Phänomen hingegen nicht. Die Ergebnisse zeigen den Verlust der MHC-Klasse-I-Expression bei Infektion von Tumorzellen mit replikationskompetenten Adenoviren und eine damit verbundene Resistenz gegen IFN- γ verursachte MHC-Klasse-I-Expression. Dieser Effekt könnte Einflüsse auf die Entwicklung der Immunantwort gegen Vektor und Tumor haben, insbesondere im Rahmen der Kreuzpräsentation bei den später gezeigten Therapien.

3.1.4 Immunogenität adenoviraler Vektoren

Ein weiterer bedeutender Aspekt für die Virotherapie ist die Vektorimmunität. Wie bereits in Kap. 2.3 erläutert, provozieren Adenoviren rasch eine adaptive Immunantwort auf humoraler und zellulärer Ebene. Die Abbildung 5 zeigt die relative Quantifizierung von Immunglobulinen des Typs M und G (IgG/IgM) gegen adenovirale Hüllproteine im Zeitverlauf nach intravenöser und subkutaner Applikation von hTERT-Ad in naive DBA/2 Mäuse. Im Abstand von drei Tagen wurden Serumproben der behandelten Mäuse gewonnen.



Am Tag 21 wurde eine zweite Immunisierung durchgeführt. Nach der Entnahme der letzten Probe wurden die Seren im ELISA auf anti-Adenovirus IgG/IgM untersucht. Die intravenöse Applikation des Adenovirus ergibt bereits nach drei Tagen einen messbaren Antikörpertiter, der sehr rasch ansteigt und bereits nach sechs bis neun Tagen ein Plateau erreicht. Die subkutane Injektion des Vektors erzeugt nur eine schwache humorale Immunantwort, die am Tag neun gerade detektierbar ist. Der

Titer erreicht auch hier ein Plateau, allerdings erst nach zwölf Tagen und auf deutlich niedrigerem Niveau.

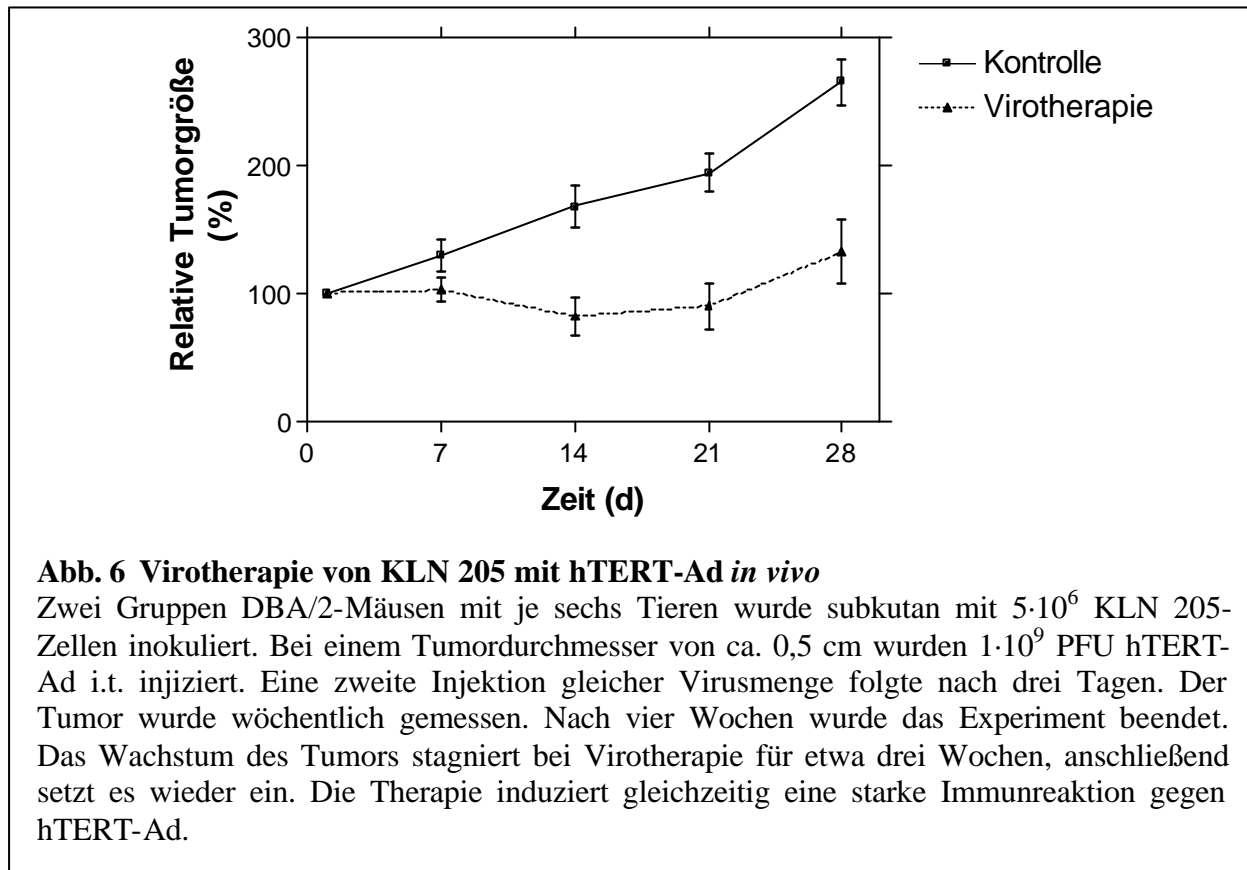
Die zweite Immunisierung am Tag 21 führt im weiteren Verlauf zu einem drastischen Anstieg des anti-adenoviralen Titers. Bei intravenöser Gabe verdoppelt sich das Signal nach neun Tagen nahezu und bei subkutaner Gabe erhöht sich das Signal um mehr als das 20-fache innerhalb weniger Tage und ist damit auf gleichem Niveau wie nach i.v. Immunisierung.

Das Ergebnis der Kurven im Zeitverlauf zeigt eine rasche Induktion von Antikörpern gegen adenovirale Vektoren, die bei zweiter Immunisierung noch einmal deutlich gesteigert wird. Die Induktion der humoralen Immunantwort im KLN 205-Tumormodell entspricht bei intratumoraler Injektion annähernd der intravenösen Applikation (Daten nicht gezeigt). Für die therapeutische Anwendbarkeit bedeuten diese Ergebnisse, dass eine repetitive Gabe adenoviraler Partikel keinen therapeutischen Nutzen suggeriert.

3.1.5 Onkolytische Virotherapie im murinen, immunkompetenten KLN 205-Tumormodell

Zur ersten Untersuchung der Wirksamkeit von hTERT-Ad im KLN 205-Tumormodell wurden pro Gruppe sechs DBA/2-Mäusen ein KLN 205-Tumor subkutan inokuliert. Bei einem Tumordurchmesser von etwa 0,5 cm wurde mit der Virotherapie begonnen. Im Abstand von drei Tagen wurde hTERT-Ad in den Tumor appliziert. Der Zeitpunkt der zweiten Injektion am Tag 3 wurde gewählt, um einen maximalen Therapieeffekt zu erzielen, da sich zu diesem Zeitpunkt noch keine starke Immunantwort etabliert hat. Der Tumordurchmesser wurde, wie im Kapitel 5.7 beschrieben, einmal wöchentlich gemessen. Die Ergebnisse der Tumorregression sind in Abb. 6 dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt das progrediente Wachstum des Tumors bei der Kontrollgruppe. Die Virotherapie-Gruppe zeigt ein über drei Wochen im Mittel stagnierendes Tumorstadium mit einsetzendem Progress in der letzten Woche des Experiments. Im Serum sind nach Beendigung des Versuchs hohe Konzentrationen von Antikörpern gegen Adenoviren nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Demnach wird mit der Virotherapie allein im immunkompetenten Mausmodell, bei gleichzeitig auftretender starker Immunreaktion gegen den Vektor, nur ein transienter Wachstumsarrest des Tumors erreicht. Eine wiederholte Gabe des adenoviralen Vektors erschien daher unangebracht. Diese Ergebnisse legen

nahe, die Virotherapie mit anderen Therapieansätzen zu kombinieren, um das Verhältnis der antitumoralen und antiviralen Immunreaktion eventuell zu beeinflussen und synergistische Wirkungen erzielen zu können.



3.2 Etablierung eines Modells zur dendritischen Zell-Vakzinierung

3.2.1 Generierung und Charakterisierung primärer dendritischer Zellen

Zur Induktion einer T-Zell Immunantwort gegen Tumorzellen werden in der Onkologie dendritische Zellen mittlerweile klinisch gegen z.B. Gliome oder Melanome eingesetzt (Yamanaka et al., 2005; de et al., 2006). Auch für die Maus lassen sich dendritische Zellen generieren, indem Knochenmark mit GM-CSF kultiviert wird. Daraus lassen sich dendritische Zellen in großer Zahl generieren (Inaba et al., 1992). Für dieses Protokoll wurde syngenes Knochenmark von DBA/2 Mäusen verwendet. Nach sieben Tagen wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt. GM-CSF wurde *in vitro* mit der Zelllinie EL4 - GM-CSF hergestellt.

Hier stellte sich heraus, dass ein Volumen von 50 µl in 3 ml Kulturmedium die besten Ergebnisse in Bezug auf Proliferation, Morphologie und CD11c-Expression ergibt (Daten nicht gezeigt). CD11c ist ein Integrin mit starker Expression auf myeloiden dendritischen Zellen (Nicod and el, 1992). Um eine maximale Reinheit der Zellen zu erreichen, wurden diese mit Hilfe der magnetischen Zellseparation CD11c-spezifisch aufgereinigt.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Zellen an Tag 6 mit 1 µg Poly I:C (Polyriboinosin-Polyribocytidylsäure) für 12 h stimuliert. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und nach der Aufreinigung mit CD11c-spezifischem Antikörper gefärbt und mittels FACS-Analyse untersucht.

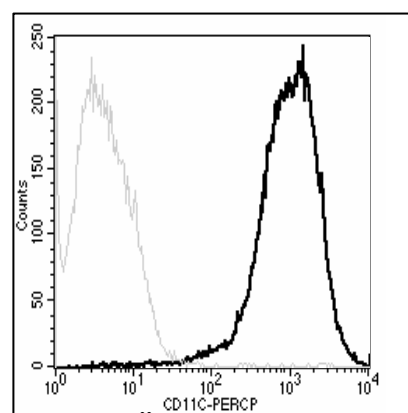
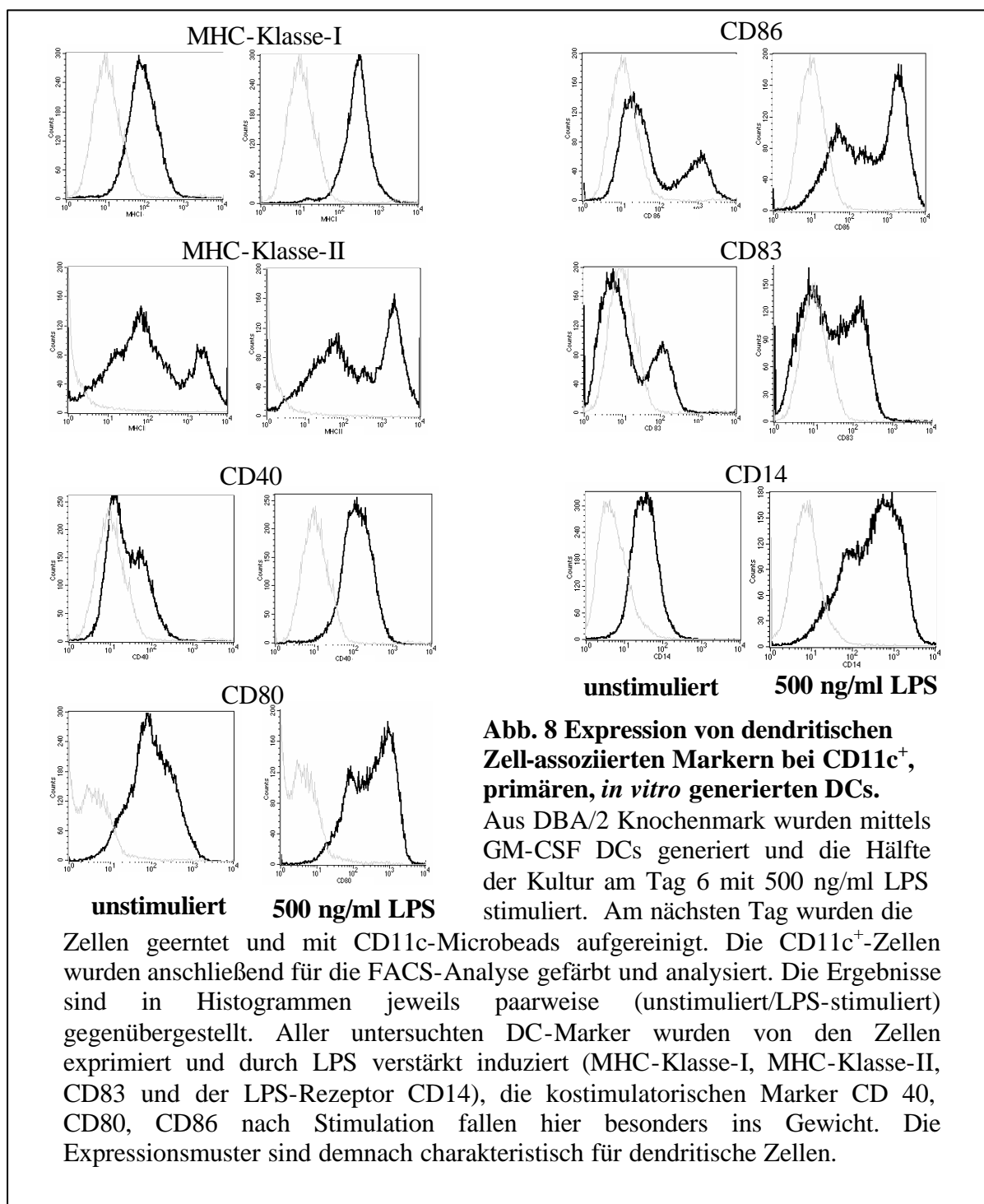


Abb. 7 Überprüfung der Reinheit von *in vitro* generierten DCs

An Tag 6 wurde die dendritische Zellkultur aktiviert und an Tag 7 mit CD11c-Microbeads über eine MACS-Säule aufgereinigt. Aus dem Histogramm wurde eine Reinheit von >98 % bestimmt.

Die Reinheit der Zellen mit dieser Methode erreicht mindestens 98 % (s. Abb 7). Anschließend sollte festgestellt werden, ob die Zellen DC-spezifische Marker exprimieren und ob Reifung nach TLR-Ligation induzierbar ist.

Typische Marker für dendritische Zellen sind neben CD11c die Antigene CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-Klasse-II. Zur Untersuchung der Reifung wurden die Zellen über Nacht mit LPS stimuliert und mit unstimulierten Kontrollzellen verglichen.



Die Ergebnisse zur Charakterisierung der dendritischen Zellen sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Inkubationsdauer der dendritischen Zellen mit LPS betrug 24 h. Die stärkste Induktion ist im Falle des kostimulatorischen Liganden CD86 zu beobachten, auch CD40, CD80, MHC-Klasse-I und CD14 nehmen deutlich zu. MHC-Klasse-II

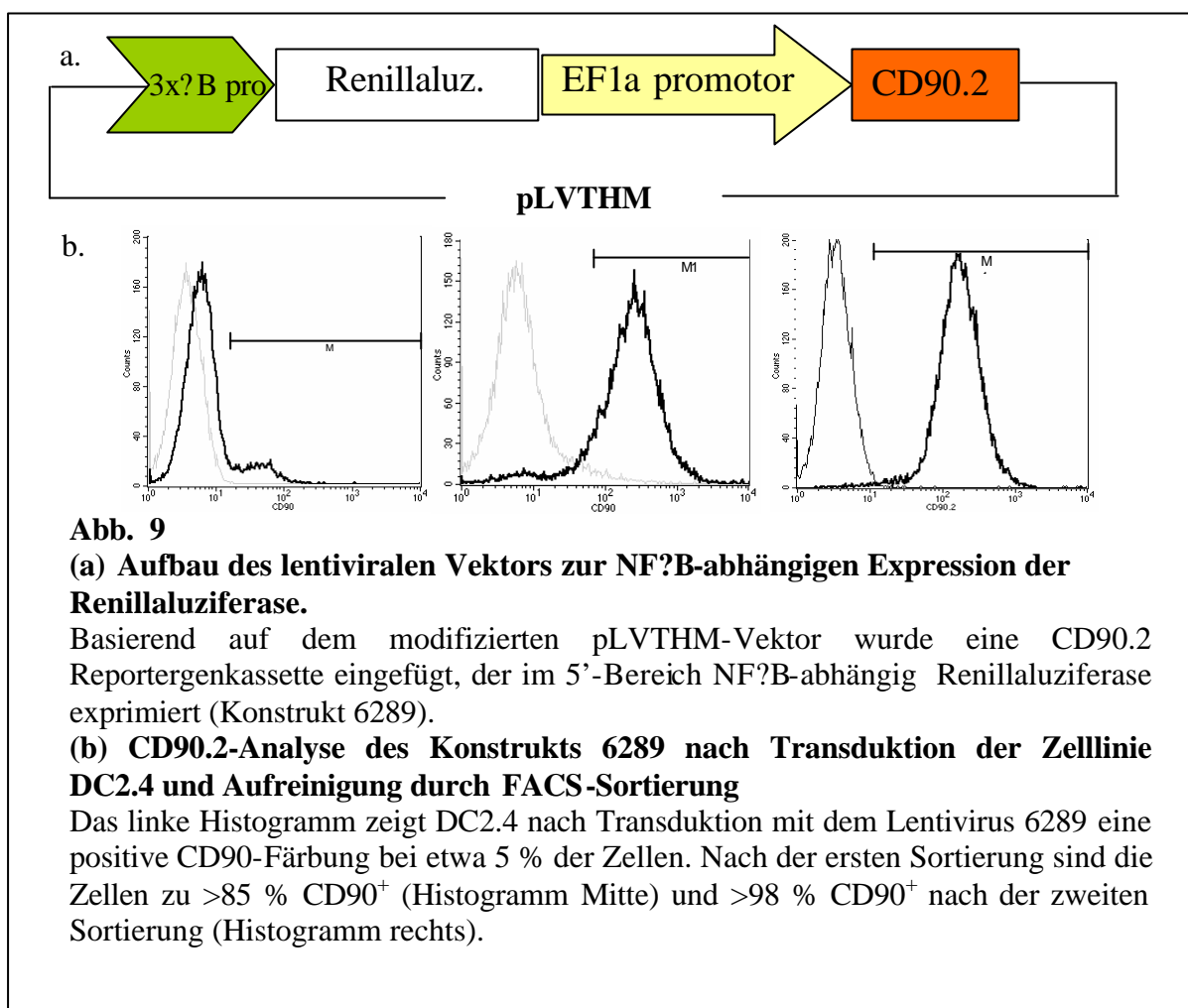
liefert auch im unstimulierten Zustand ein sehr intensives Signal, eine Verschiebung zum Maximum ist allerdings durch die Reifung zu beobachten. CD83 ist ein Marker für reife dendritische Zellen, nach LPS-Stimulation sind ca. 50 % positiv.

Insgesamt zeigen alle untersuchten Marker die typischen Charakteristika von myeloiden dendritischen Zellen. Die nach diesem Protokoll generierten Zellen wurden für die onkolytische Immuntherapie eingesetzt. Für die Präsentation von Tumorantigenen wurden die Zellen, je nach Fragestellung, entweder für den antigenunspezifischen Ansatz mit dem proteinhaltigen Überstand von Tumorzelllysaten oder im antigenspezifischen Ansatz mit dem tumorassoziierten Peptid aus Hämagglutinin IYSTVASSL (Aminosäuren 518-526, H-2K^d) beladen. Zur Kontrolle wurde das Peptid der β -Galaktosidase TPHPARIGL (Aminosäuren 876-884, H-2K^d) verwendet. Zusätzlich wurden die Zellen am Vortag der Injektion mit Poly I:C gereift. Gewählt wurde Poly I:C, da dieser TLR3-Ligand, im Gegensatz zu bakteriellem LPS, homolog zu adenoviralen Stoffwechselprodukten ist. Die Signaltransduktion von LPS über TLR4 führt zwar zu einer ausgeprägten Aktivierung der dendritischen Zellen (Xie et al., 2003), konnte jedoch eine für die therapeutische Anwendung abträgliche Effekte wie reduzierte Antigenpresentation, schlechtere Fähigkeit zur Kostimulation und Adhäsion nachweisen. Die Reifung mit Poly I:C lässt sich bei der verwendeten Konzentration aufgrund des schwächeren Stimulus schwerer nachweisen als bei LPS. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung separat über die Signaltransduktion von NF κ B in einer transgenen dendritischen Zelllinie untersucht, deren Generierung nachfolgend beschrieben wird.

3.2.2 Intensitätsmessung der NF κ B-Aktivierung durch den TLR3 Ligand Poly I:C bei der dendritischen Zelllinie DC2.4

Die Zelllinie DC2.4 wurde durch Immortalisierung einer GM-CSF-generierten dendritischen Zellkultur aus C57Bl6 Mäusen etabliert (Shen et al., 1997). Die Zellen wurden zunächst zur Charakterisierung mittels FACS-Analyse auf folgende Marker untersucht: MHC-Klasse-I⁺ (H-2^b), CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD11b⁺, CD83^{lo}, CD14⁺, CD90⁻, CD4⁻ und CD8⁻. Weiterhin wurde die cDNA der Zellen mit der PCR-Methode in 35 Zyklen positiv auf MyD88, TRIF, TLR3 und TLR9 getestet (Primersequenzen siehe 5.1.7), um zu überprüfen, ob diese Zelllinie prinzipiell über einen funktionsfähigen TLR-Signalweg verfügt.

Generell führt die Ligation von Toll-like Rezeptoren zur Aktivierung von NF κ B und initiiert nachfolgend eine proinflammatorische Genexpression, welche letztendlich *in vivo* zur Eliminierung des pathogenen Stimulus führt (Doyle and O'Neill, 2006). Für den Nachweis der Signaltransduktion von NF κ B wurde ein lentivirales Konstrukt basierend auf einem modifizierten pLVTHM kloniert. Das Konstrukt ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

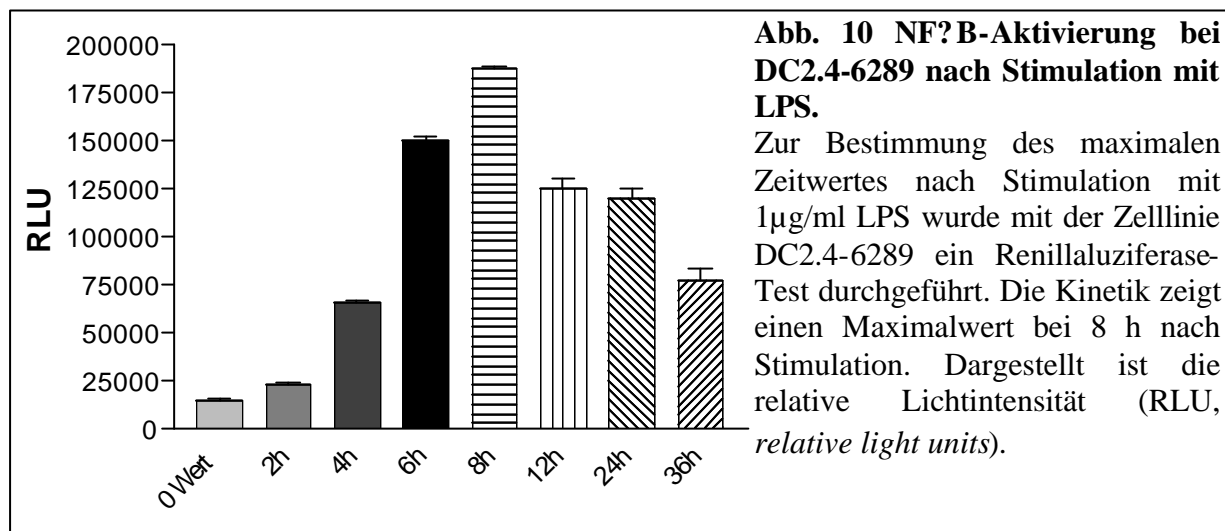


Die Reporterengenkassette besteht aus einem vollständigen EF1a-Promotor und dem Oberflächenrezeptor CD90.2. Im 5'-Bereich vor diesem Element wurde die Renillaluziferase unter der Kontrolle eines NF κ B-abhängigen Promotors (aus psiCheck, Promega) insertiert. Der Promotor mit einer Länge von 230 bp besteht aus drei hintereinander folgenden Bindungsstellen für NF κ B und einer TATA-Box.

Mit Hilfe dieses Konstrukts (NW6289) wurden lentivirale Partikel hergestellt, aufkonzentriert und der infektiöse Titer bestimmt (s. Kap. 5.5.1).

Die Zelllinie DC2.4 wurde darauf hin mit MOI 10 transduziert und vier Tage später zweimal sequenziell mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung aufgereinigt. Die Reinheit der verwendeten Zellen betrug mindestens 98% CD90.2⁺ (s. Abb. 9b).

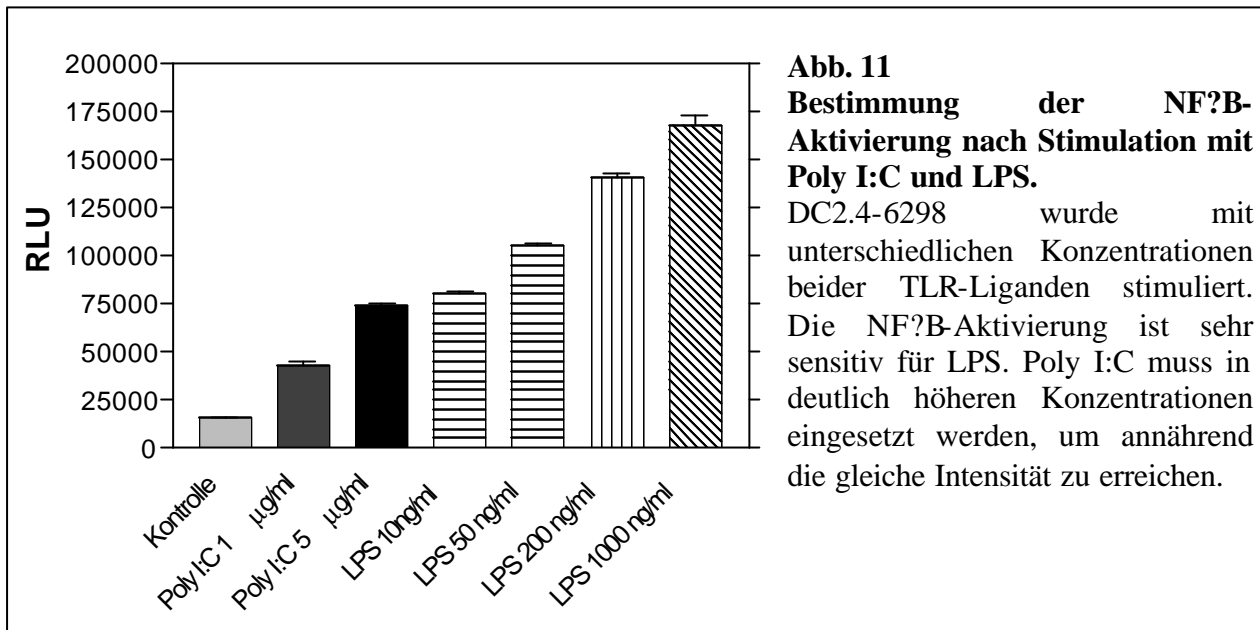
Die auf diese Weise generierte Zelllinie DC2.4-6289 wurde mit 1 µg/ml LPS stimuliert und eine Zeitreihe für die Induktion der Renillaluziferase erstellt, um den optimalen Zeitpunkt der Stimulation dieses Systems zu bestimmen.



Für den Test wurden DC2.4-6289-Zellen ausgesät und anschließend wurde mit LPS stimuliert. Nach Ernte der Zellen wurden die Proben aufgearbeitet, gemessen und ausgewertet. Die maximale Aktivierung von NF κ B liegt, wie in Abbildung 10 gezeigt, bei 8 h nach Stimulation.

Als nächstes wurden DC2.4-6289 erneut mit LPS und Poly I:C stimuliert, um die NF κ B-Aktivierung der beiden TLR-Liganden miteinander vergleichen zu können. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abb. 11 gezeigt. Das System ist sehr sensitiv für die Aktivierung durch LPS. Bereits 10 ng/ml sind ausreichend, um die Luziferase stark zu induzieren. Poly I:C führt ebenfalls zu einer NF κ B-Aktivierung, jedoch in schwächerem Ausmaß. In beiden Fällen ist die Dosisabhängigkeit der NF κ B-Aktivierung nicht linear. Eine fünffach höhere Dosis führt bei Poly I:C gerade zu einer Verdopplung des Signals. Bei LPS erreicht etwa eine Verdopplung bei Verhundertfachung der Dosis.

Die Verwendung von TLR-Liganden führt neben der Reifung auch zu Stress, der Apoptose induzieren kann. Daher wurde für eine Aktivierung eine niedrige Dosis gewählt.



Aufgrund der Toxizität von LPS und aufgrund des bakteriellen Ursprungs wurde auf die Verwendung von LPS für die Reifung dendritischer Zellen für die onkolytische Therapie verzichtet, und stattdessen Poly I:C verwendet. Die Aktivierung von NF κ B bei dendritischen Zellen mit 1 µg/ml Poly I:C ist signifikant nachweisbar. Für alle nachfolgenden *in vivo* Experimente wurde für die Stimulation der DCs im Rahmen der DC-Vakzinierung eine Poly I:C-Konzentration von 1 µg/ml für die Reifung eingesetzt.

3.3 Einflüsse der Virotherapie auf die Immunreaktion gegen den Tumor

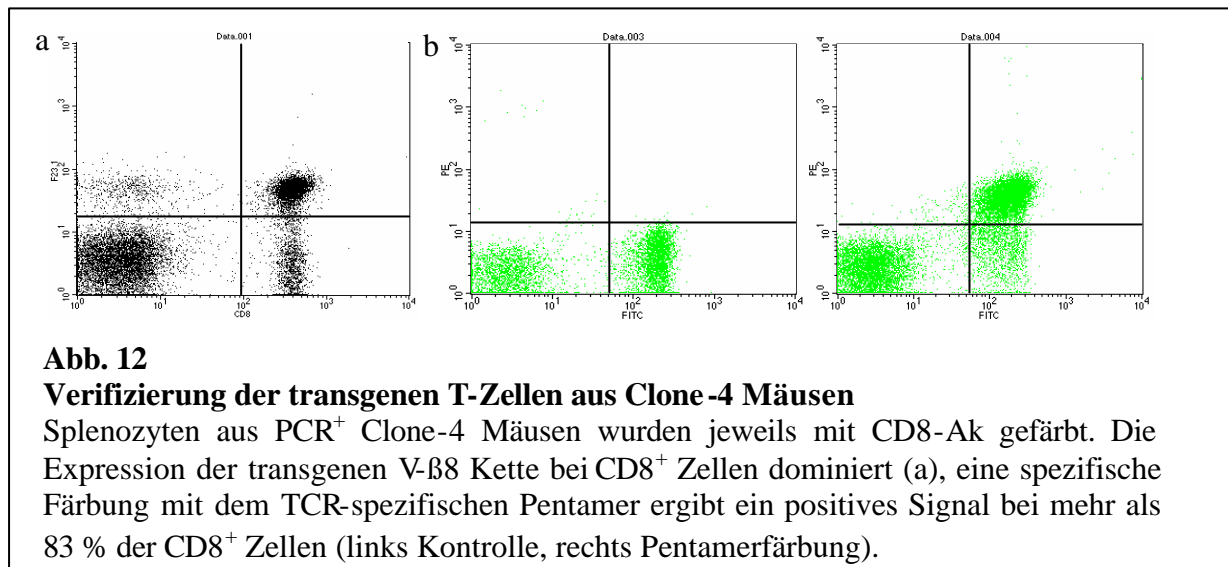
3.3.1 Etablierung des HA-Systems

Zur Einführung eines bekannten und gut charakterisierten Antigens in das KLN 205-Tumormodell wurde das HA (Hämagglutinin)-System ausgewählt, um Immunreaktionen gegen den Tumor antigenspezifisch nachweisen zu können. HA ist ein Glykoprotein aus dem Influenzavirus und das dominante antigene Epitop aus HA ist ein Nonamer der Aminosäuren 518-526 mit der Sequenz IYSTVASSL und ist mit dem MHC-Klasse-I-Allel H2K^d assoziiert. Die Stabilitätsberechnung mit SYFPEITHI (www.syfpeithi.com) ergibt für die Affinität zwischen Peptid und MHC-Klasse-I Komplex einen Wert von 30, was auf eine hohe Stabilität des Komplexes hinweist.

Zu diesem Antigen ist eine transgene Balb/c-Maus entwickelt worden, dessen T-Zellen spezifisch gegen das HA₅₁₈₋₅₂₆-Epitop sind. Die CD8⁺ T-Zellen einer solchen Maus sind zum Großteil monoklonal und tragen den transgenen T-Zell Rezeptor (TCR) gegen den IYSTVASSL-spezifischen Peptid-MHC-Klasse-I Komplex. Transgene T-Zellen wurden aus Splenozyten einer Maus in der FACS-Analyse nachgewiesen.

Wie Abbildung 12 zeigt, exprimieren CD8⁺-Zellen dieser Mäuse überwiegend die transgene TCR-Kette V-β8 (a) und in der Analyse nach Färbung mit dem Pentamer, das den Clone4-spezifischen TCR erkennt, sind die Zellen zu mindestens 83 % positiv (b).

Für den adoptiven Transfer wurden die Zellen durch magnetische Zellseparation mit CD8-Negativselektion aufgereinigt. Die Reinheit betrug hierbei im Durchschnitt 70 %. Zur Einführung eines bekannten Tumorantigens wurde das HA-Protein in die Zelllinie KLN 205 durch retroviralen Gentransfer stabil inseriert (s. Kap. 5.5.6). Die Zellen wurden nach der Expansion durch FACS-Sortierung auf mindestens 98 % hinsichtlich der GFP-Expression angereichert.

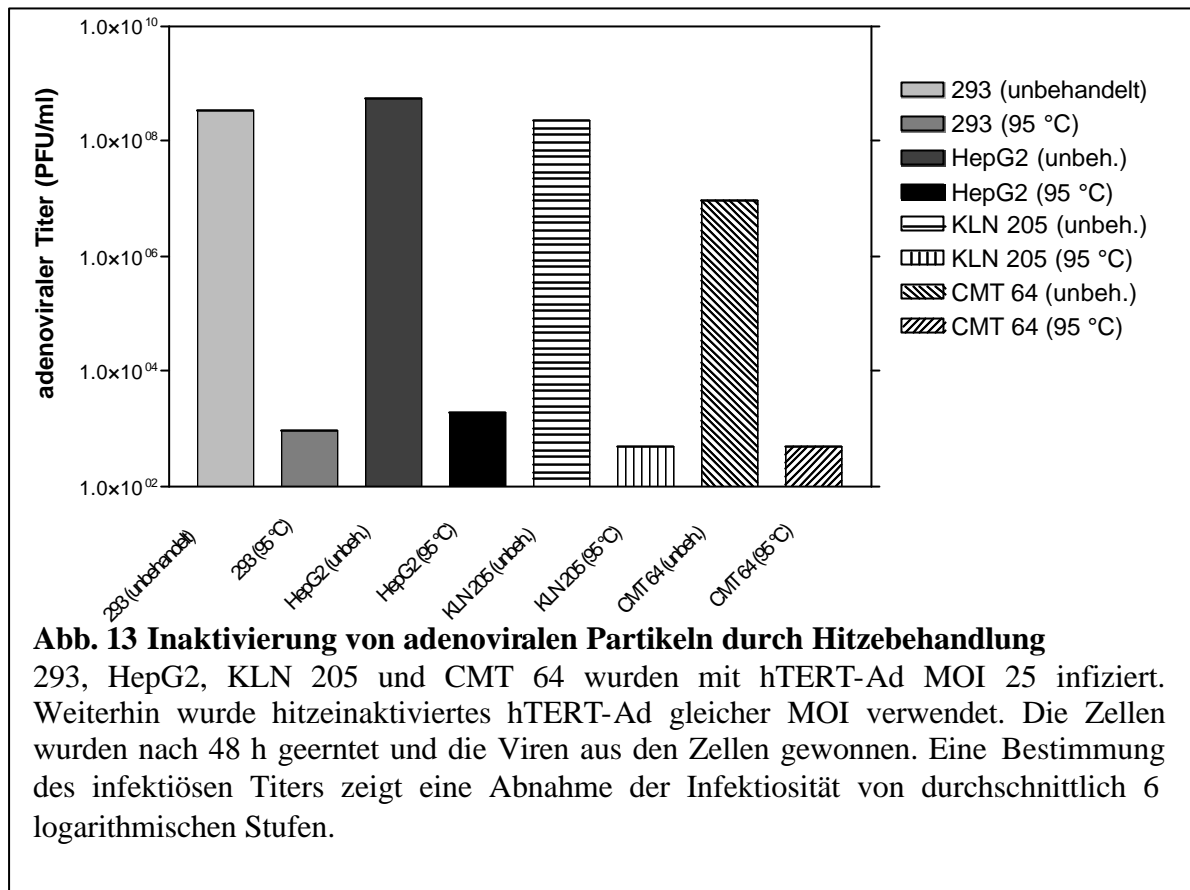


3.3.2 Inaktivierung von Adenoviren durch Hitzeeinwirkung

Zur Eliminierung der Infektiosität adenoviral infizierter Zellen sollten diese durch Hitze inaktiviert werden, um die Aktivierung des Immunsystems durch adenovirale Infektion ausschließen zu können (siehe auch Kap. 3.3.3). Aufgrund der hohen Stabilität von Adenoviren wurde eine Temperatur von 95 °C für 20 min gewählt. Als Kontrolle wurde hTERT-Ad unbehandelt verwendet. Zur Erhöhung der Sensitivität des Versuchs wurden die Viren mit einer (bei Hitzebehandlung entsprechend einer theoretischen) MOI 25 zur Amplifikation erneut auf 293-, HepG2, KLN 205, CMT 64-Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet. Aus diesen Proben wurde anschließend der infektiöse Titer mittels *Rapid Titer Assay* (s. Kap. 5.5.4) bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 13 zeigen durch die Hitzebehandlung eine Abnahme der Infektiosität um im Mittel 6 logarithmische Stufen. Verwendet man eine theoretische MOI von 10 bei $5 \cdot 10^5$ Zellen einer 6 cm-Schale, so bleiben rechnerisch nach der Hitzebehandlung 5 residuale infektiöse Partikel pro Schale erhalten, also entsprechend 10^{-4} PFU/Zelle.

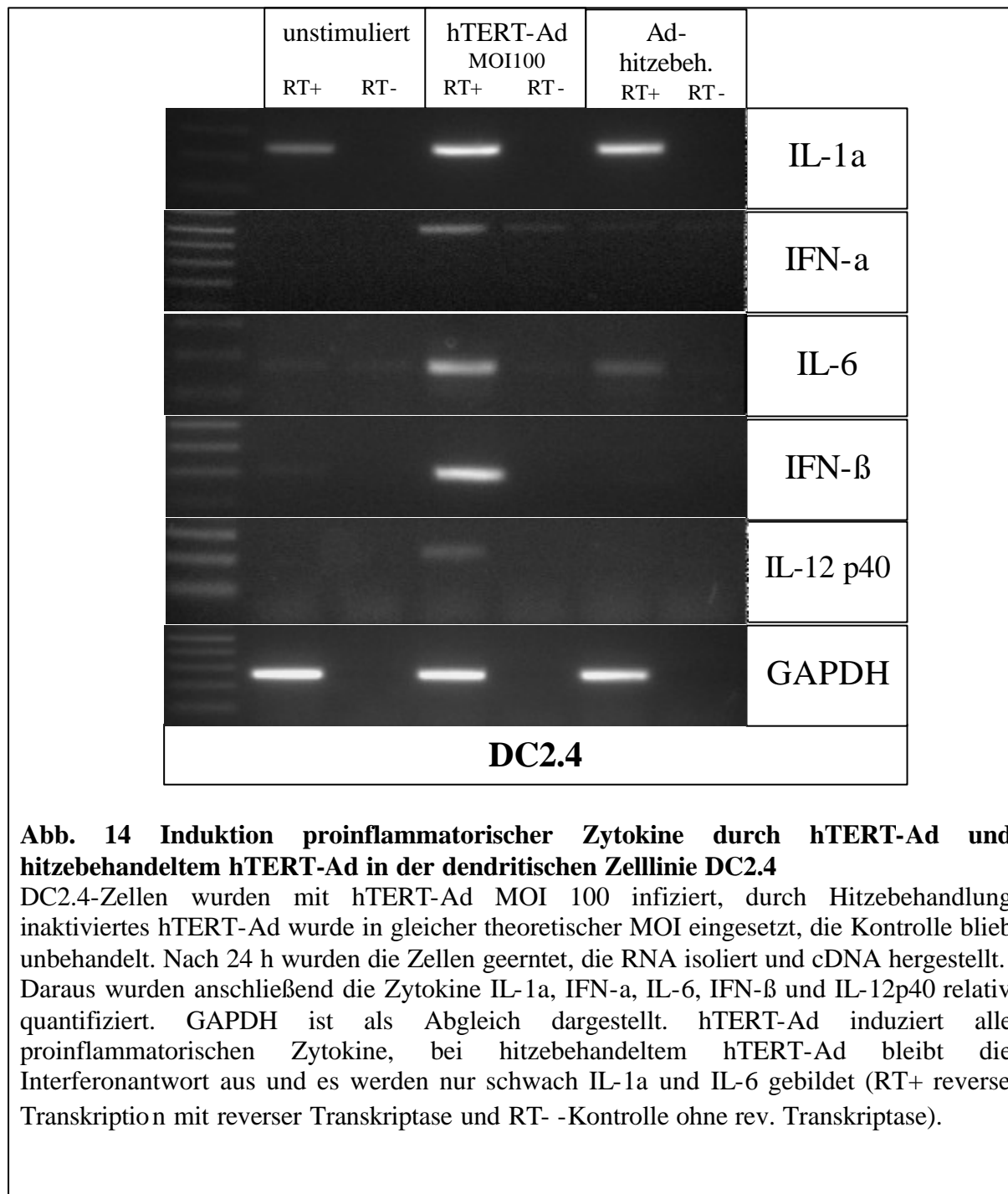
Zusätzlich zur Messung der Infektiosität im *Rapid Titer* wurde der Einfluss auf die biologische Restaktivität hitzeinaktivierter Adenoviren auf dendritische Zellen untersucht. Dazu wurden DC2.4 ausgesät und mit unbehandeltem hTERT-Ad bzw. hitzeinaktiviertem hTERT-Ad infiziert, DC2.4 ohne Infektion dienten als Kontrolle.

24 h nach Infektion wurde aus den Proben cDNA gewonnen und daraus durch semi-quantitative PCR der RNA-Gehalt an inflammatorischen Zytokinen und Interferonen bestimmt.



Wie in Abbildung 14 gezeigt wurden die Faktoren L-1a, IFN- α , IL-6, IFN- β und IL-12p40 mittels PCR semiquantitativ bestimmt (Primersequenzen s. Kap. 5.1.7), eingesetzt wurden 80 ng cDNA pro Probe und die Zahl der PCR-Zyklen betrug 35. Bei viraler Infektion sind alle untersuchten Zytokine stark induziert, GAPDH diente als Abgleich. Durch Hitzebehandlung wurden Interferone und IL-12p40 nicht induziert. Eine leichte Induktion von IL-1a und IL-6 ist jedoch zu erkennen.

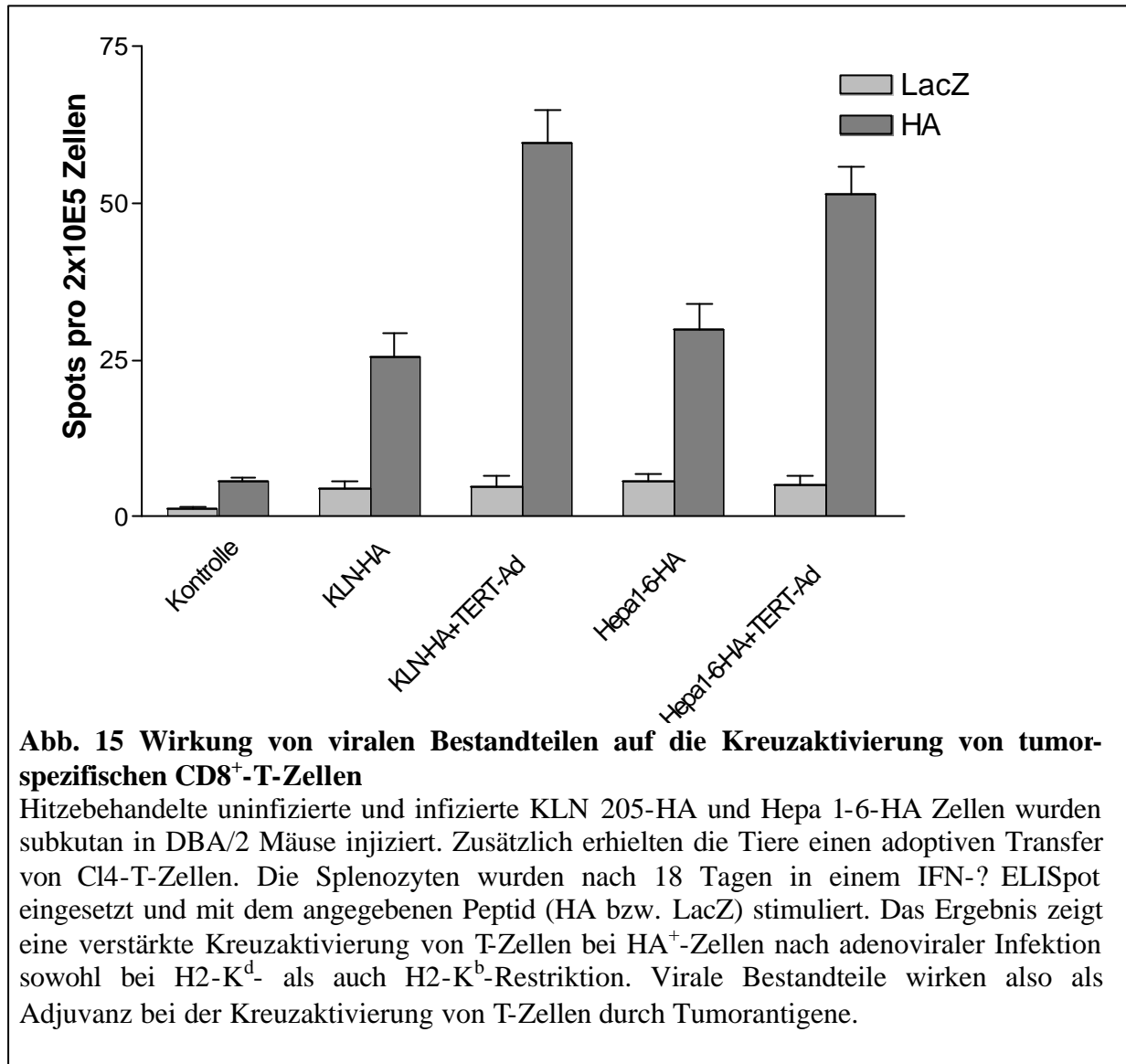
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Hitzebehandlung die Adenoviren zerstört werden und keine Interferonantwort induziert wird. Die hitzebehandelten Viren werden demnach nicht mehr als infektiöses Agens erkannt. Die Aktivierung von IL-1a und IL-6 beruht vermutlich auf der Stimulation über TLR9 durch die verbleibende nicht-methylierte DNA des adenoviralen Genoms.



3.3.3 Einfluss der viralen Infektion auf die anti-tumorale Immunreaktion durch Kreuzpräsentation phagozytierter Antigene

Als nächstes sollte der Einfluss einer viralen Infektion auf die Immunreaktion gegen den Tumor untersucht werden. Prinzipiell liefert die adenovirale Lyse von Zellen ein erhebliches Aufkommen von toten bzw. apoptotischen Tumorzellen, die von antigenpräsentierenden Zellen zusammen mit viralen Antigenen aufgenommen werden können. Durch die Assoziation von PAMPs viraler Konstituenten mit Tumorantigenen könnten diese bei der Kreuzpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen zu einer verstärkten antitumoralen Immunreaktion führen. Die Aktivierung naiver T-Zellen durch kreuzpräsentierte Antigene hängt unter anderem von der Natur des Stimulus zur Reifung der antigenpräsentierenden Zellen ab, die infizierte Zellen phagozytiert haben. Aus diesem Grund sollten Störfaktoren, die zur Reifung der antigenpräsentierenden Zellen führen könnten, vermieden werden. Potentielle Störfaktoren sind proinflammatorische Zytokine in einem adenoviral infizierten Tumor und eine direkte virale Infektion der antigenpräsentierenden Zellen. Um diese Faktoren zu umgehen, wurden KLN 205-HA Zellen *ex vivo* und mit hTERT-Ad transduziert. 36 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und mit Hitze inaktiviert. Das resultierende Zellmaterial wurde DBA/2 Mäusen subkutan injiziert. Es folgte zusätzlich ein adoptiver Transfer von Cl4-T-Zellen. Nach 18 Tagen wurden die Splenozyten der Versuchstiere im IFN- γ -ELISpot untersucht. Stimuliert wurde mit HA-spezifischem Peptid, zur Kontrolle wurde ein H2-K^d-kompatibles β -Gal Peptid in identischer Konzentration eingesetzt (s. Abbildung 15). Um eine direkte Aktivierung naiver T-Zellen durch Kontakt mit nicht-denaturierten MHC-Klasse-I-Molekülen auszuschließen, wurde zur Kontrolle die Zelllinie Hepa1-6 vom MHC-Klasse-I Typ H2-K^b retroviral mit HA transduziert und selektiert (wie in 5.5.6 beschrieben). Die HA-abhängige Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen kann in dieser Kontrolle also nur durch Kreuzpräsentation erfolgen.

Das Verfahren der thermalen Inaktivierung führt neben der Denaturierung der viralen Komponenten auch zur Denaturierung der zellulären Bestandteile und Proteine. Der Versuch zeigt demnach die Wirkung viraler Komponenten als Adjuvanz in Bezug auf Kreuzaktivierung naiver tumorspezifischer T-Zellen.



Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass virale Bestandteile, wie doppelsträngige RNA und nicht-methylierte DNA im Rahmen der Onkolyse in Form von absterbenden Tumorzellen von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert werden. Die Assoziation von kreuzpräsenterten Tumorantigenen mit viral induzierter TLR-Ligation führt zu einer verstärkten Kreuzaktivierung naiver tumorassoziierter T-Zellen.

3.4 Therapeutisches Mausmodell zur onkolytischen Virotherapie in Kombination mit Immuntherapie

Die onkolytische Virotherapie zeigt im KLN 205-Tumormodell nur bedingt Wirkung (s. Kap. 3.1.5). In Kapitel 3.3.3 wurde gezeigt, dass virale Bestandteile verstärkend auf die Kreuzaktivierung von Tumorantigenen wirken. Dieses Ergebnis könnte sich demnach in Kombination der Virotherapie mit Immuntherapie in Form von dendritischer Zellvakzinierung günstig auf die Antitumorantwort auswirken. Die Virotherapie sollte zusätzlich auf weitere mögliche Synergien und immunologische Wechselwirkungen mit DC-Vakzinierung in verschiedenen Ansätzen getestet werden.

3.4.1 Tierversuch zur Untersuchung kombinierter Therapieansätze

Der Versuch war so konzipiert, dass DBA/2-Mäuse mit subkutanem KLN 205-Tumor in einer Flanke jeweils zwei Behandlungen im Abstand von drei Tagen erhielten. Die Behandlung bestand entweder aus DC-Vakzinierung oder aus intratumoraler Injektion von hTERT-Ad.

Dendritische Zellen wurden wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben kultiviert und mit Tumorantigenen aus Zelllysate beladen (s. Kap. 5.5.6), aktiviert und aufgereinigt (s. Kap. 5.5.7). Die Vakzinierung erfolgte durch subkutane Injektion von DCs in den Bereich zwischen Tumor und inguinalen Lymphknoten.

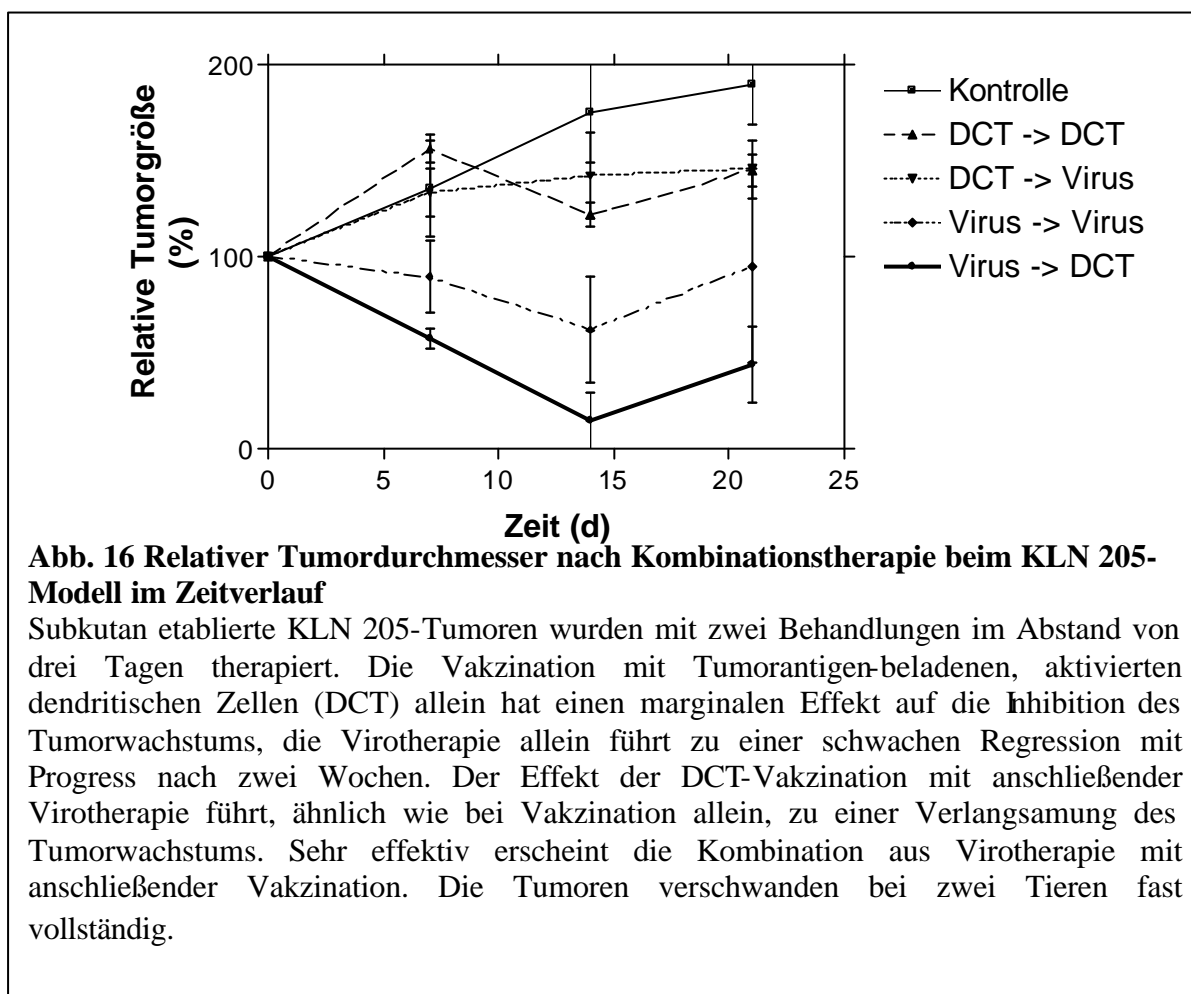
Das Therapieschema sah wie folgt aus:

	1. Therapie		2. Therapie
Gruppe 1	Kontrollgruppe ohne Therapie	3 Tage Therapiepause	
Gruppe 2	dendritische Zellvakzinierung		dendritische Zellvakzinierung
Gruppe 3	dendritische Zellvakzinierung		Virotherapie hTERT-Ad
Gruppe 4	Virotherapie hTERT-Ad		Virotherapie hTERT-Ad
Gruppe 5	Virotherapie hTERT-Ad		dendritische Zellvakzinierung

Tabelle 1 Übersicht über die Gruppen des Kombinationsschema von Virotherapie und dendritischer Zellvakzinierung

Ziel des Versuchs war es, entweder eine Verstärkung der antitumoralen Immunantwort durch eine wiederholte Monotherapie zu zeigen oder durch Kombination von Vakzinierung/Virotherapie Synergismen der entsprechenden Therapieeffekte zu identifizieren. Die Untersuchung der unerwünschten anti-Vektor Immunantwort durch Virotherapie erschien als interessanter Aspekt.

Nach Beendigung der zweiten Therapie wurde der Tumorprogress ermittelt (s. Abb. 16). Drei Wochen nach der letzten Therapie wurde der Versuch beendet und die Splenozyten abschließend für den IFN- γ ELISpot verwendet.



Der Verlauf des Tumorwachstums zeigt erhebliche Abweichungen zwischen den Ansätzen. Die Gruppen mit zwei DCT-Vakzinierungen und der Kombination dendritischer Zell-Vakzinierung mit anschließender Virotherapie ergibt einen ähnlichen Verlauf mit etwas schwächerer Progression des Tumors im Vergleich zur Kontrolle. Die Gruppe mit zweimaliger Virotherapie ergibt eine leichte Regression des Tumors über einen Verlauf von zwei Wochen mit anschließendem Progress. Als mit

Abstand effizienteste Therapie erscheint die Kombination aus Virotherapie mit anschließender DCT-Vakzinierung.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des IFN- γ -ELISpot der Splenozyten zur Bestimmung der antitumoralen Immunantwort. Zur Stimulation der Zellen wurde proteinhaltiger Überstand von KLN 205-Zelllysate eingesetzt. Zur Bestimmung der anti-Adenovirus Immunantwort wurde hTERT-Ad zur Stimulation eingesetzt.

Zur Kontrolle wurde der Hintergrund ohne Stimulation ermittelt bzw. als Tumorkontrolle ein xenogenes Lysat aus einer humanen Lungenepithelkarzinom-Zelllinie eingesetzt.

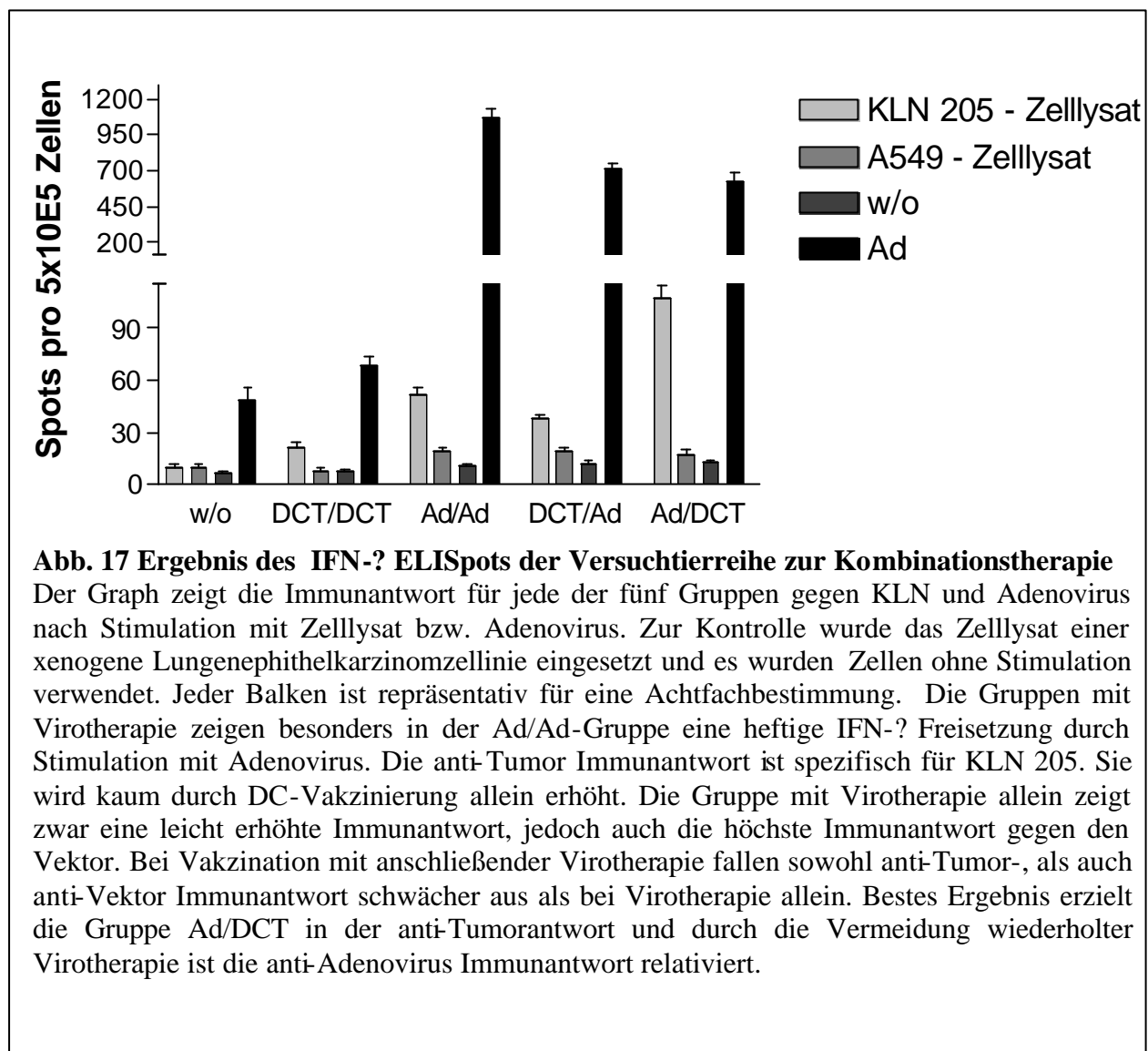
Die Ergebnisse zeigen in Bezug auf die antivirale Immunantwort eine sehr starke Reaktion auf hTERT-Ad mit deutlichem Hintergrund (Kontrollgruppe und DCT/DCT-Gruppe mit 50 ± 9 bzw. 75 ± 7 Signalen/well). Die Gruppen DCT/hTERT-Ad und hTERT-Ad/DCT zeigen eine starke Antwort mit 705 ± 35 bzw. 620 ± 82 Signalen. Stärkstes Signal hat die Gruppe mit zweifacher Virotherapie (1100 ± 93 Signale/well).

Die antitumorale Immunantwort fällt im Vergleich zur antiviralen Immunantwort wesentlich schwächer aus, jedoch mit signifikanten Unterschieden.

Die Ergebnisse des ELISpots bezüglich der antitumoralen Immunreaktion korrelieren eng mit der ermittelten Tumorprogression. Die antitumorale Immunantwort der Gruppen DCT/DCT (26 ± 5 Signale/well) und DCT/hTERT-Ad (72 ± 8 Signale/well) ist leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (12 ± 4 Signale/well) und resultiert unwesentlich in einer Verlangsamung des Tumorprogress. Die Virotherapie allein schneidet etwas besser ab (44 ± 5 Signale/well), ergibt aber gleichzeitig eine heftige anti-Adenovirusantwort.

Die Gruppe hTERT-Ad/DCT zeigt mit Abstand die signifikantesten Ergebnisse, sowohl bezüglich der antitumoralen Immunantwort (93 ± 8 Signale/well), als auch im Verhältnis auf die antivirale Immunantwort. Diese Kombination aus sequenzieller Virotherapie mit anschließender DC-Vakzinierung nach drei Tagen wird nachfolgend als Viroimmunotherapie bezeichnet.

Der optimale Zeitraum der DC-Vakzinierung, die in Verbindung mit Virotherapie zu einer starken antitumoralen Immunantwort führt, sollte zunächst bestimmt werden (Kap. 3.4.2).

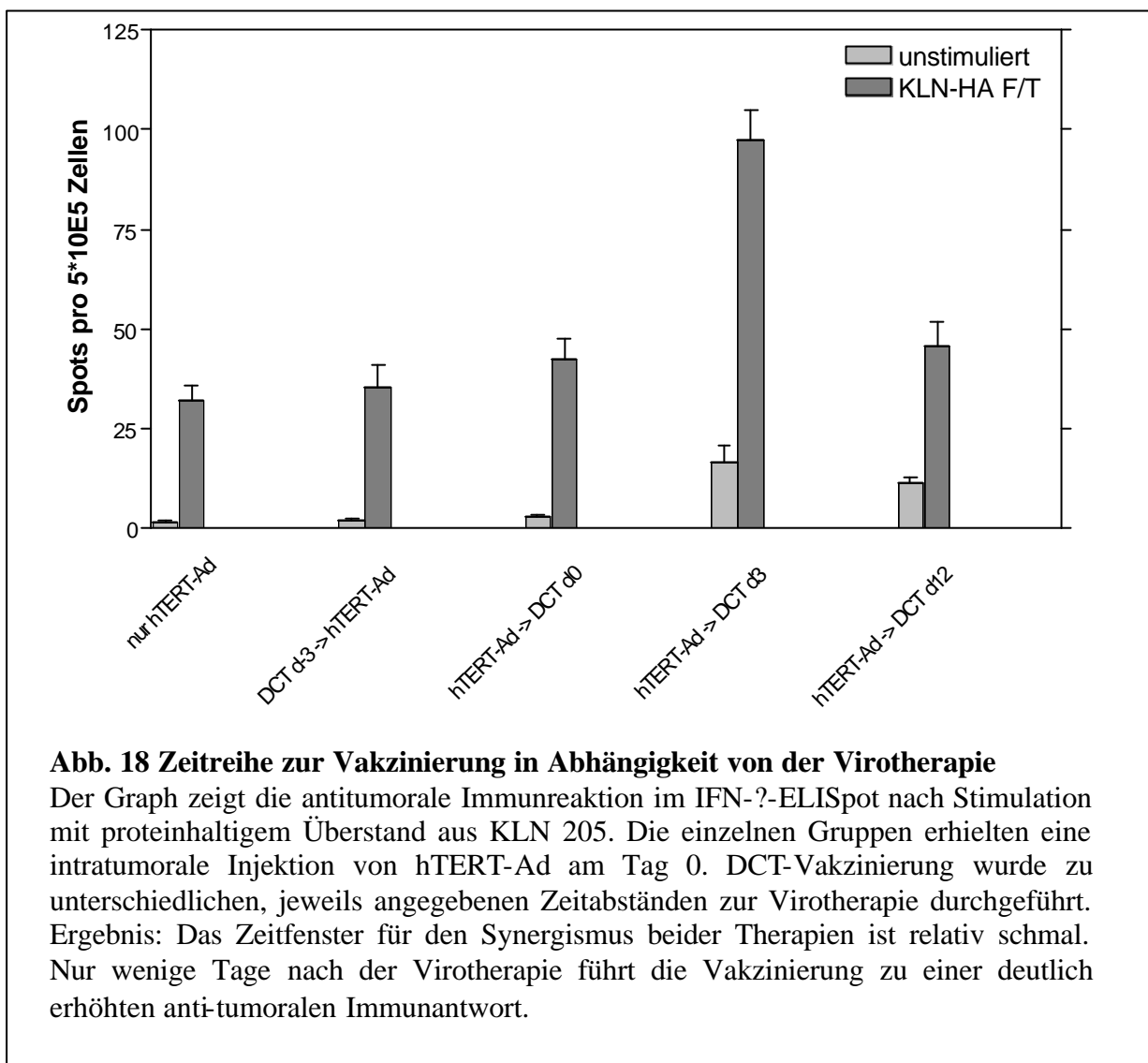


3.4.2 Bestimmung des optimalen Zeitraums der effektiven Vakzinierung während der Virotherapie

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass konsequente Kombination von Vakzinierung und Virotherapie ein Erfolg versprechender Ansatz in der onkolytische Therapie im murinen Modell darstellt. Der folgende Versuch sollte klären, in welchem Zeitfenster nach Virotherapie DC-Vakzinierung die stärkste antitumorale Immunantwort induziert. Nach Inokulation von KLN 205-Tumoren auf DBA/2-Mäusen wurden die Therapien nach Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurde als Antigenquelle für die DCs proteinhaltiger Überstand aus Zellkulturlysate verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt bei Erreichen des Tumordurchmessers von ca. 0,5 cm einmalig Virotherapie intratumoral. Die Gruppe

mit Vakzinierung vor Virotherapie erhielt die Vakzinierung mit drei Tagen Abstand zur Virotherapie (Gruppe d-3), die Gruppe bei Virotherapie erhielt die Vakzinierung entsprechend am gleichen Tag (Gruppe d0), und die beiden Gruppen mit DC-Vakzinierung nach Virotherapie erhielten die Therapie mit drei bzw. mit zwölf Tagen Abstand nach der Virotherapie (Gruppe d3 und d12).

Zur Auswertung des Versuchs am Tag 21 wurde mit Splenozyten der behandelten Tiere ein IFN- γ -ELISpot durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einem proteinhaltigen Überstand von KLN 205 stimuliert, unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle.



Das Ergebnis des IFN- γ ELISpots (s. Abb. 18), zeigt eine recht einheitliche Immunreaktion gegen den Tumor in den Gruppen mit Vakzinierung am Tag -3, 0 und 12, die nur unwesentlich höher ist als mit der Virotherapie ohne Vakzinierung. Eine deutliche Ausnahme stellt die Gruppe mit Vakzinierung an Tag 3 dar, in welcher die antitumorale Immunantwort stark erhöht ist.

Daraus ergibt sich für das Protokoll einer kombinierten Viroimmunotherapie, die DC-Vakzinierung drei Tage nach der Virotherapie durchzuführen, um eine optimale Induktion der antitumoralen Immunantwort herbeizuführen.

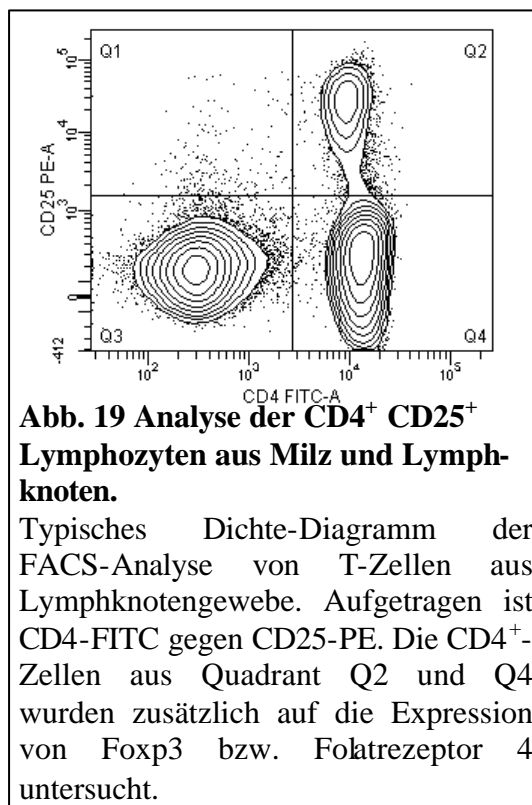
3.4.3 Wirkung der Therapie auf T-regs

Regulatorische T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Inhibition inflammatorischer Reaktionen zum Schutz des Individuums vor übermäßiger Immunaktivität und vermitteln tolerogene Wirkungen in der Homöostase zwischen „selbst“ und „fremd“. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist ein spezifischer Marker für natürliche CD4⁺ CD25⁺ T-regs und ist für den Phänotyp dieser Zellen mitverantwortlich (Fontenot et al., 2003). Zur weiteren Charakterisierung von T-regs konnte Yamaguchi bezüglich der Expression des Folatrezeptor 4 (FR4) zeigen, dass zusammen mit den Markern CD4 und CD25 verschiedene Populationen von T-Zellen unterschieden werden können (Yamaguchi et al., 2007). Demnach zeigen natürliche T-regs neben CD4 und CD25 eine hohe Expression an FR4, bei gleichzeitig hohem Anteil an Foxp3-Expression. Weiterhin können antigenstimulierte T-Zellen in Effektorzellen mit schwacher FR4 und CD25-Expression von Gedächtniszellen mit starker FR4 und fehlender CD25-Expression differenziert werden.

Eine Analyse dieses Zelltyps wurde im Rahmen der im Kap. 3.4.1 beschriebenen Therapieansätze durchgeführt. Interessant erschien die Überprüfung, ob Virotherapie im KLN 205-Modell die Population der T-regs beeinflusst. Dies sollte systemisch und lokal anhand der Marker CD4/CD25/Foxp3 bzw. FR4 untersucht werden.

Dazu wurde DBA/2-Mäusen subkutan ein KLN 205-Tumor in die linke Flanke inokuliert. Die Therapie wurde bei einem Tumordurchmesser von 0,5 cm begonnen. Untersucht wurden unbehandelte Kontrollmäuse, KLN 205-Tumor-tragende Mäuse und Mäuse nach i.t. Injektion von hTERT-Ad bzw. replikations-defizientem AdGFP. Eine weitere Gruppe erhielt die Kombination Virotherapie mit anschließender DC-

Vakzinierung nach drei Tagen. Die Auswertung erfolgte fünf Tage nach der letzten Behandlung.



Hierzu wurden Lymphozyten aus den regionalen (den axillären und den inguinalen) Lymphknoten des Tumors aufgearbeitet und mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD25 und Foxp3 bzw. FR4 gefärbt. Die Lymphknoten auf der Seite des Tumors wurden als abfließende Lymphknoten bezeichnet, die Lymphknoten der kontralateralen Seite entsprechend als nicht-abfließende Lymphknoten. Unklar war, in welchem Lymphknoten tumor-infiltrierende Lymphozyten die Immunregulation beeinflussen. Um diese Fragestellung klären zu können wurden die T-regs aus den axillären- und inguinalen Lymphknoten zur

Analyse der lokalen Effekte und aus den Milzzellen zur Analyse systemischer Effekte quantifiziert.

Die Abbildung 19 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der FACS-Analyse der Auftragung CD4 gegen CD25 im Dichtediagramm. Proben, die auf die Expression von Foxp3 untersucht wurden, sind nach der CD4/CD25-Färbung fixiert und permeabilisiert worden, um intrazelluläre Färbungen durchzuführen. Die Analyse von CD4⁺-Zellen aus dieser Auftragung auf die Antigene Foxp3 und FR4 erfolgte darum in separaten Proben.

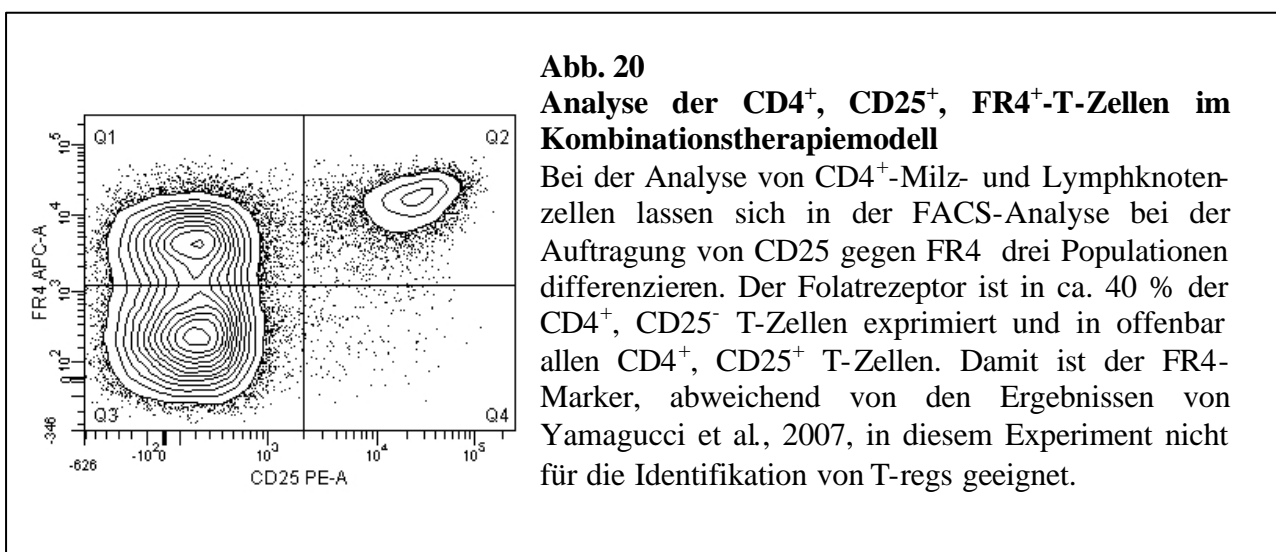
Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse aller untersuchten Proben der CD4⁺-, CD25⁺-, Foxp3/FL4-Analyse in den axillären und inguinalen Lymphknoten sowohl auf der Tumorseite als auch auf der tumorfreien Seite und der Milz.

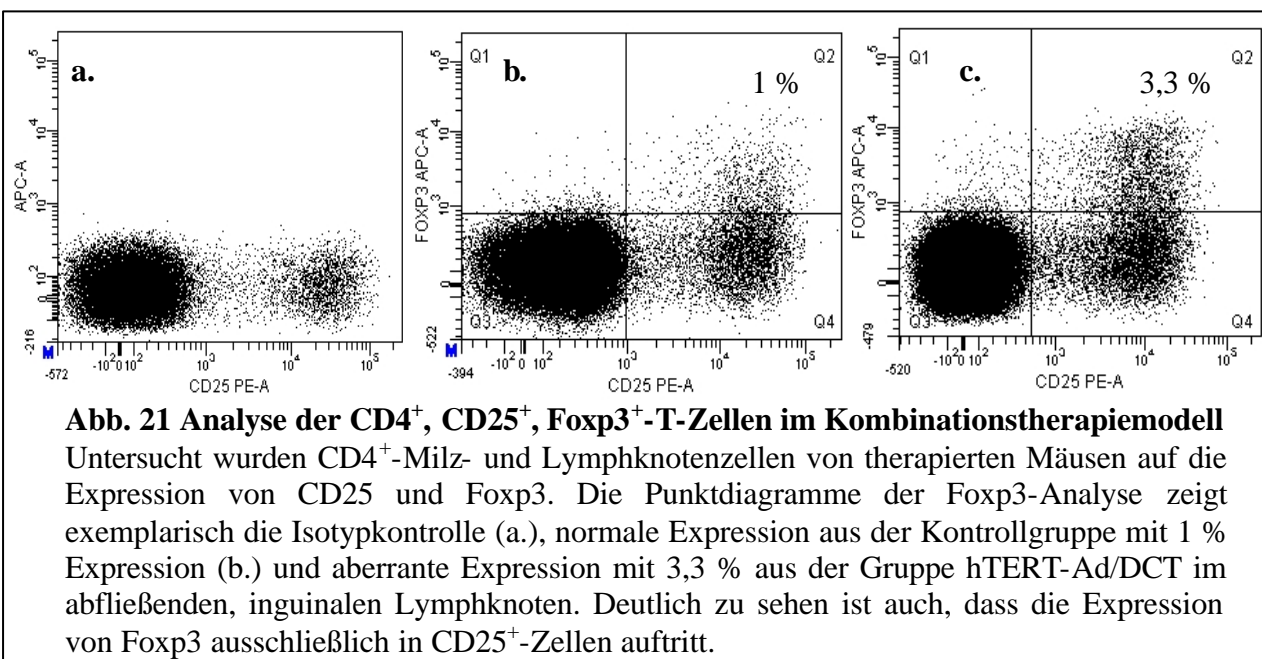
Die Verteilung der Expression von CD25 allein lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf Änderungen in der T-reg-Population zu. Der prozentuale Anteil liegt in allen Gruppen überwiegend zwischen 7-8 % der CD4⁺-Gesamtpopulation in den Lymphknoten und ist in der Milz etwa doppelt so hoch.

Ein repräsentatives Dichtediagramm der FACS-Analyse der FR4/CD25-Expression von CD4⁺-Zellen ist in Abbildung 20 gezeigt. Das FACS-Diagramm der Analyse von

FR4 zeigt in diesem Modell einen sehr einheitlichen Phänotyp. Bei $CD4^+$ -Zellen können bei fehlender CD25-Expression zwei verschiedene Populationen mit $FR4^+$ und $FR4^-$ unterschieden werden. $CD25^+$ -Zellen zeigen jedoch ausschließlich ein starkes Signal für FR4. Schwache und fehlende Expressionen von FR4 ist bei $CD25^+$ -Zellen kaum festzustellen. Der Anteil entsprechender Zellen liegt in den Lymphknoten einige zehntel Prozent unter dem Wert für $CD4^+$, $CD25^+$ -Zellen. Anhand der Expression von FR4 können daher aufgrund des einheitlichen Phänotyps in diesem Ansatz keine eindeutigen Aussagen über Tregs gemacht werden. Die Analyse der Foxp3-Expression ist beispielhaft in Abbildung 21 abgebildet.

Die relevantesten Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt. Die Kontrollgruppe zeigt die geringste Foxp3-Expression in den Lymphknoten. Tumor-tragende Mäuse exprimieren Foxp3 geringfügig höher (durchschnittlich 1,3 % gegenüber 1 % der Kontrolle). Innerhalb der Gruppen variiert Foxp3 nur wenig, mit Ausnahme der Kombinationstherapie hTERT-Ad \rightarrow DCT. In dieser Gruppe ist die Expression um den Faktor 3 höher als in der Kontrollgruppe. Der vermehrte Einfluss der Tregs auf die Immunreaktion und der Synergismus durch die sequenzielle Kombination beider Therapieansätze von Virotherapie und anschließender DC-Vakzinierung wird hier deutlich. In der Milz ist die Expression von Foxp3 innerhalb der Gruppen im Vergleich zu Lymphknoten im Durchschnitt doppelt so hoch.

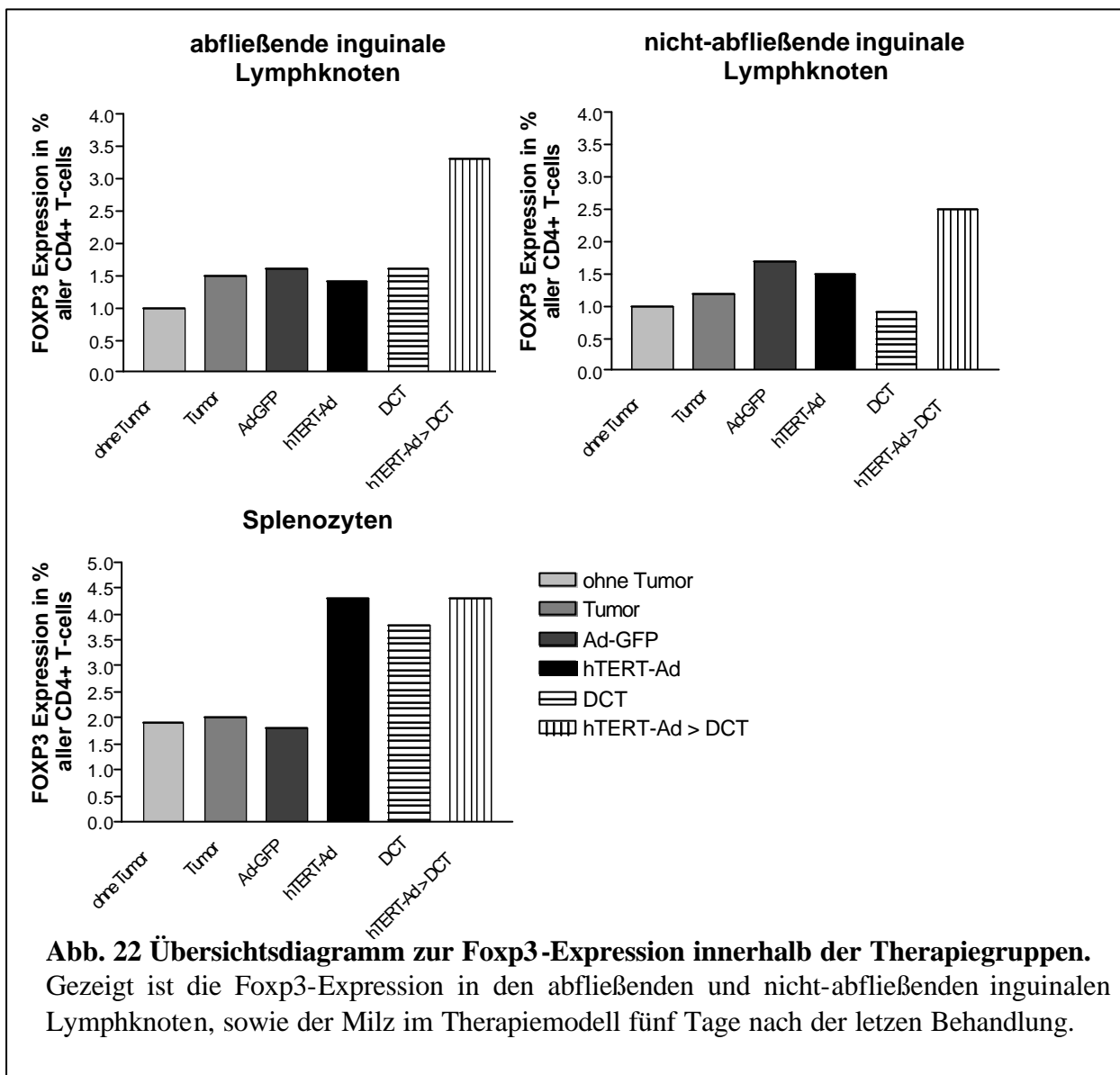




	axilläre Lymphknoten abfließend	axilläre Lymphknoten nicht- abfließend	inguinale Lymphknoten abfließend	inguinale Lymphknoten nicht- abfließend	Milz
	CD25 ⁺ / FoxP3 ⁺ / FR4 ⁺ in Prozent der CD4 ⁺ -Lymphozyten				
Kontrolle	- / - / -	6,5 / 1,1 / 6,2	- / - / -	6,4 / 1 / 6	16,5 / 1,9 / 14,8
nur Tumor	8,8 / 1,4 / 8,4	7,9 / 1,2 / 7,6	8,3 / 1,5 / 8	8,5 / 1,2 / 8,2	15,5 / 2 / 14,1
AdGFP	8,9 / 1,8 / 8,4	7,6 / 1 / 7,2	8,5 / 1,6 / 7,9	10,3 / 1,7 / 9,8	17,4 / 1,8 / 12,7
hTERT-Ad	7,3 / 1,2 / 6,9	6,9 / 1 / 6,5	7,3 / 1,4 / 6,9	7,6 / 1,5 / 7,3	14,4 / 4,3 / 10,9
DC ^T	7,1 / 1,6 / 6,7	6,7 / 1,3 / 6,3	7,6 / 1,6 / 7	8,9 / 0,9 / 8,1	13,4 / 3,8 / 10,5
hTERT-Ad → DC ^T	6,5 / 2,3 / 6,1	7,2 / 1 / 6,8	8 / 3,3 / 7,4	8,4 / 2,5 / 7,8	14,3 / 4,3 / 10,7

Tabelle 2

Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses der Virotherapie und DC-Vakzinierung auf die inguinalen, sowie die axillären Lymphknoten und die Milz in Bezug auf die Expression von CD25/Foxp3/FR4 bei CD4⁺-Zellen zur Identifizierung von T-regs.

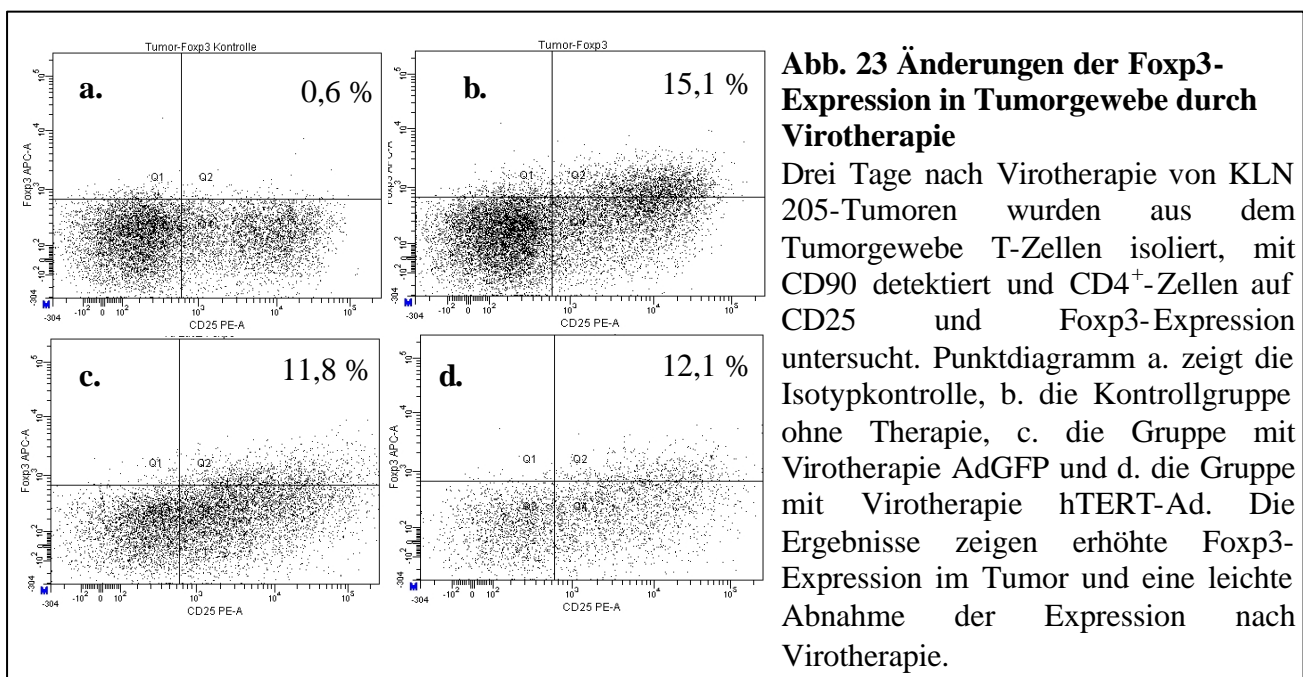


Die Gabe von replikationsdefizientem AdGFP hat, im Gegensatz zu hTERT-Ad, keine Auswirkung auf die Foxp3-Expression, die CD4⁺, CD25⁺ Zellen der Milz. Hier führen bereits die Monotherapie mit hTERT-Ad bzw. die Vakzinierung zu einer Verdopplung der Foxp3-Expression. Virotherapie und Vakzinierung in Kombination führen desweiteren in der Milz zu keiner weiteren Erhöhung der Foxp3-Expression. Der Synergismus der Kombination von Virotherapie und Vakzinierung ist demnach auf die abfließenden Lymphknoten begrenzt.

Zusätzlich sollte der Einfluss der Virotherapie auf die T-regs im Tumorgewebe untersucht werden. Zur weiteren Charakterisierung wurden T-regs aus KLN 205-Tumoren aufgearbeitet. Drei Tage nach der Injektion wurde eine Einzelzellsuspension aus dem Tumorgewebe präpariert und für die FACS-Analyse

gefärbt, um die T-Zell-Population zu untersuchen. Mit einer 4-Farben FACS-Analyse wurden aus der Zellsuspension zunächst mit CD90 die T-Zellen detektiert. Aus der CD90⁺-Population wurden CD4⁺-Zellen in einem Punktdiagramm CD25 gegen Foxp3 dargestellt (s. Abb. 23).

Die Expression von Foxp3 im Tumor zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Abnahme. Dabei macht es keinen Unterschied, ob replikationskompetente oder replikationsdefiziente Adenoviren verwendet werden. Die Foxp3-Expression der Kontrollmäuse ist im Tumor erhöht und liegt bei 15 % und nach der Virotherapie etwa bei 12 %. Dies zeigt, dass im Tumormilieu eine deutlich erhöhte Zahl von Tregs auftritt und diese durch Virotherapie verringert wird. Auffällig ist auch bei den Gruppen mit Virotherapie eine Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität des CD25-Signals um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 4533 MFI, AdGFP-Gruppe 9135 MFI, hTERT-Ad-Gruppe 9229 MFI). Dies liegt vermutlich an einer adenoviral-induzierten Inflammation *in situ*, die zu einer T-Zell-Aktivierung führt.



3.4.4 Einfluss der Virotherapie auf tumorinfiltrierende dendritische Zellen

Die Reifung von DCs ist für die Aktivierung von naiven T-Zellen von besonderer Bedeutung. In welchem Rahmen stark immunogene Adenoviren im KLN 205-Modell einen Einfluss auf die Reifung der DCs ausüben, sollte durch die Zelloberflächenanalyse von Aktivierungsmarkern untersucht werden. Eine Virus-induzierte Reifung der dendritischen Zellen innerhalb eines infizierten Tumors konnte erwartet werden. Ziel der Untersuchung war, inwiefern intratumorale Virusreplikation die DC-Reifung beeinflusst. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde anhand der CD40-Induktion und der Änderung der MHC-Klasse-II-Expression durch adenovirale Vektoren die Reifung von tumorinfiltrierenden DCs nach drei Tagen analysiert. Aus KLN205-Tumoren wurden die DCs isoliert und mittels FACS-Analyse aus der präparierten Tumorzellsuspension anhand von CD11c identifiziert und anschließend auf das Expressionsmuster von MHC-Klasse-II und CD40 untersucht (s. Abb. 24).

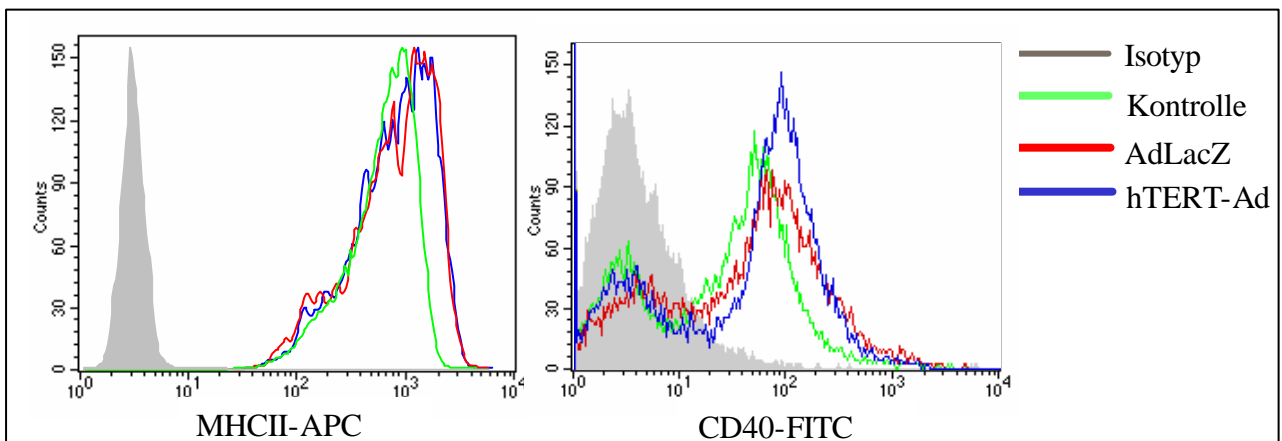


Abb. 24

Adenoviral induzierte Reifung von tumorinfiltrierenden, CD11c⁺ DCs

Tumorinfiltrierende DCs aus KLN 205-Tumoren von DBA/2 Mäusen ohne und mit adenoviraler Infektion von AdLacZ und hTERT-Ad sollten auf Reifung untersucht werden. Die FACS-Analyse drei Tage nach Infektion der Tumoren anhand der Marker MHC-Klasse-II und CD40 zeigt im Vergleich zur Kontrolle zwar Reifung, allerdings ist das Muster und die mittleren Fluoreszenzintensitäten von AdLacZ und hTERT-Ad sehr ähnlich. Die Replikation von hTERT-Ad im Tumor scheint keinen Einfluss auf eine stärkere Reifung der DCs zu haben.

Die Analyse wurde drei Tage nach der Infektion der Tumoren durchgeführt. Eine DC-Reifung in infiziertem Gewebe ist deutlich erkennbar. Die Unterschiede bei der

Reifung durch Verwendung von replikationsdefizientem AdLacZ und replikationskompetenten hTERT-Ad sind jedoch vernachlässigbar gering.

3.4.5 Immunologische Aspekte der Viroimmunotherapie im HA-System

Bisher konnte gezeigt werden, dass adenovirale Bestandteile während der Onkolyse zu einer verstärkten Kreuzaktivierung von tumorspezifischen T-Zellen führt und dass Virotherapie in Kombination mit Immunotherapie durch DC-Vakzinierung eine starke Tumormimmunreaktion induziert, wenn die DC-Vakzinierung nach der Virotherapie in einem definiertem Zeitfenster durchgeführt wird. Diese Therapiekombination soll im Folgenden weiter in einem Ansatz mit definiertem Tumorantigen untersucht und charakterisiert werden. Dazu wurde ein antigenspezifischer Ansatz unter Verwendung des HA-Systems im KLN 205-Modell durchgeführt.

3.4.5.1 Experimenteller Ansatz des HA-Systems im KLN 205-Modell in der Kombinationstherapie

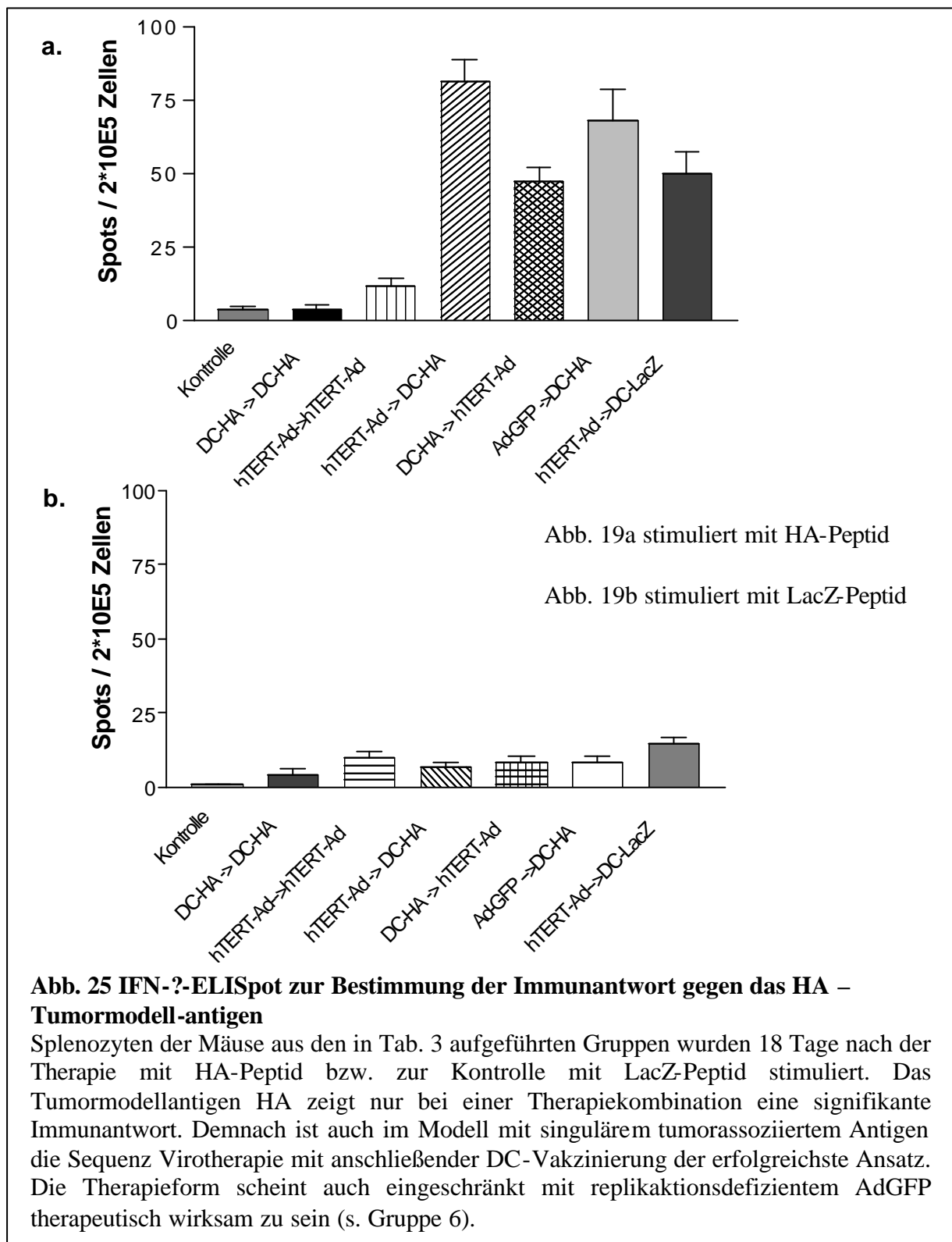
Durch Verwendung des HA-Systems im KLN 205-Modell konnte ein bekanntes und gut charakterisiertes Antigen in den Versuchsaufbau als tumorassoziiertes Modellantigen integriert werden, für das zudem hochspezifische, transgene CD8⁺-T-Zellen zur Verfügung stehen. Mithilfe dieses Antigens war es möglich, die Immunantwort gegen ein einzelnes, Tumor-assoziiertes Epitop in diesem Modell zu untersuchen. Zur Beladung dendritischer Zellen für die DC-Vakzinierung konnte die Verwendung von Tumorzelllysat durch den Einsatz von immunogenem HA-Peptid substituiert werden, um eine selektive Analyse von Clone-4-T-Zellen zu erlauben. Zwei Wochen vor Beginn der Therapie wurden sieben Gruppen mit je drei DBA/2-Mäusen mit KLN 205-HA-Zellen subkutaner Tumor inokuliert. Der Aufbau gleicht dem Experiment aus Kap. 3.4.1, wurde aber um zwei Gruppen erweitert. Eine zusätzliche Gruppe sollte zeigen, ob die Effektivität der induzierten antitumoralen Immunantwort in der Viroimmunotherapie von hTERT-Ad Replikation abhängt. Für diese Fragestellung wurde zum Vergleich der replikationsdefiziente Vektor AdGFP eingesetzt. Die Gruppe mit DC-Vakzinierung gegen nicht-tumorrelevantes Antigen sollte desweiteren zeigen, welchen Effekt der Ansatz nach Virotherapie erzielt. Dazu wurden die dendritischen Zellen für die Vakzinierung mit LacZ-Peptid beladen.

	1. Therapie		2. Therapie
Gruppe 1	Kontrollgruppe ohne Therapie	3 Tage Therapiepause	
Gruppe 2	dendritische Zellvakzinierung HA		dendritische Zellvakzinierung HA
Gruppe 3	Virotherapie hTERT-Ad		Virotherapie hTERT-Ad
Gruppe 4	Virotherapie hTERT-Ad		dendritische Zellvakzinierung HA
Gruppe 5	dendritische Zellvakzinierung HA		Virotherapie hTERT-Ad
Gruppe 6	Virotherapie AdGFP		dendritische Zellvakzinierung HA
Gruppe 7	Virotherapie hTERT-Ad		dendritische Zellvakzinierung LacZ

Tabelle 3 Übersicht über die Gruppen das Kombinationsschema von Virotherapie und dendritischer Zellvakzinierung im HA-Modell

Alle Mäuse erhielten einen Tag vor Beginn der ersten Therapie einen adoptiven Transfer von CD8-aufgereinigter T-Zellen aus der Milz von Clone-4-Mäusen. 18 Tage nach der 2. Therapie wurden Splenozyten im IFN- γ -ELISpot analysiert und das Serum für die Bestimmung der antiviralen Antikörper für den ELISA eingesetzt.

Splenozyten wurden pro *well* jeweils mit dem angegebenen Peptid stimuliert und die Werte in 8-fach Ansätzen bestimmt (s. Abb. 25). Für die spezifische Aktivierung wurden die dendritischen Zellen für die Vakzinierung mit HA-Peptid beladen (DC-HA), die Kontrollvakzinierung gegen ein irrelevantes Antigen erfolgte mit LacZ-Peptid (DC-LacZ). Die Immunantworten zeigen gegen HA in der Kontrollgruppe 7 ± 2 Signale/*well*. Die DC-Vakzinierung allein (Gruppe 2) ergibt keine Wirkung (7 ± 2 Signale/*well*). Virotherapie allein (Gruppe 3) ist mit 15 ± 3 Signalen/*well* leicht stärker als die Kontrolle. Gruppe 5 zeigt mit der Kombination DC-HA \rightarrow hTERT-Ad eine signifikante Immunantwort nach HA-Stimulation mit 48 ± 4 Signale/*well*. Die Viroimmunotherapie mit der Sequenz hTERT-Ad und nachfolgender DC-Vakzinierung der Gruppen 4,6 und 7 fallen noch deutlicher aus, obwohl in Gruppe 6 (51 ± 7 Signale/*well*) das replikationsdefiziente Adenovirus AdGFP verwendet wurde, bzw. in Gruppe 7 (66 ± 10) die DCs nur mit dem Kontrollpeptid LacZ beladen wurden (s. auch Kap. 4.6). Die Gruppe mit der höchsten HA-Immunantwort im IFN- γ -ELISpot ist Gruppe 4 (83 ± 10 Signale/*well*) mit initialer Virotherapie und HA-spezifisch beladenen dendritischen Zellen für die Vakzination und zeigt somit nicht nur im antigenunspezifischen Ansatz mit Tumorlysat, sondern auch im antigenspezifischen Ansatz die effektivste antitumorale Immunreaktion.



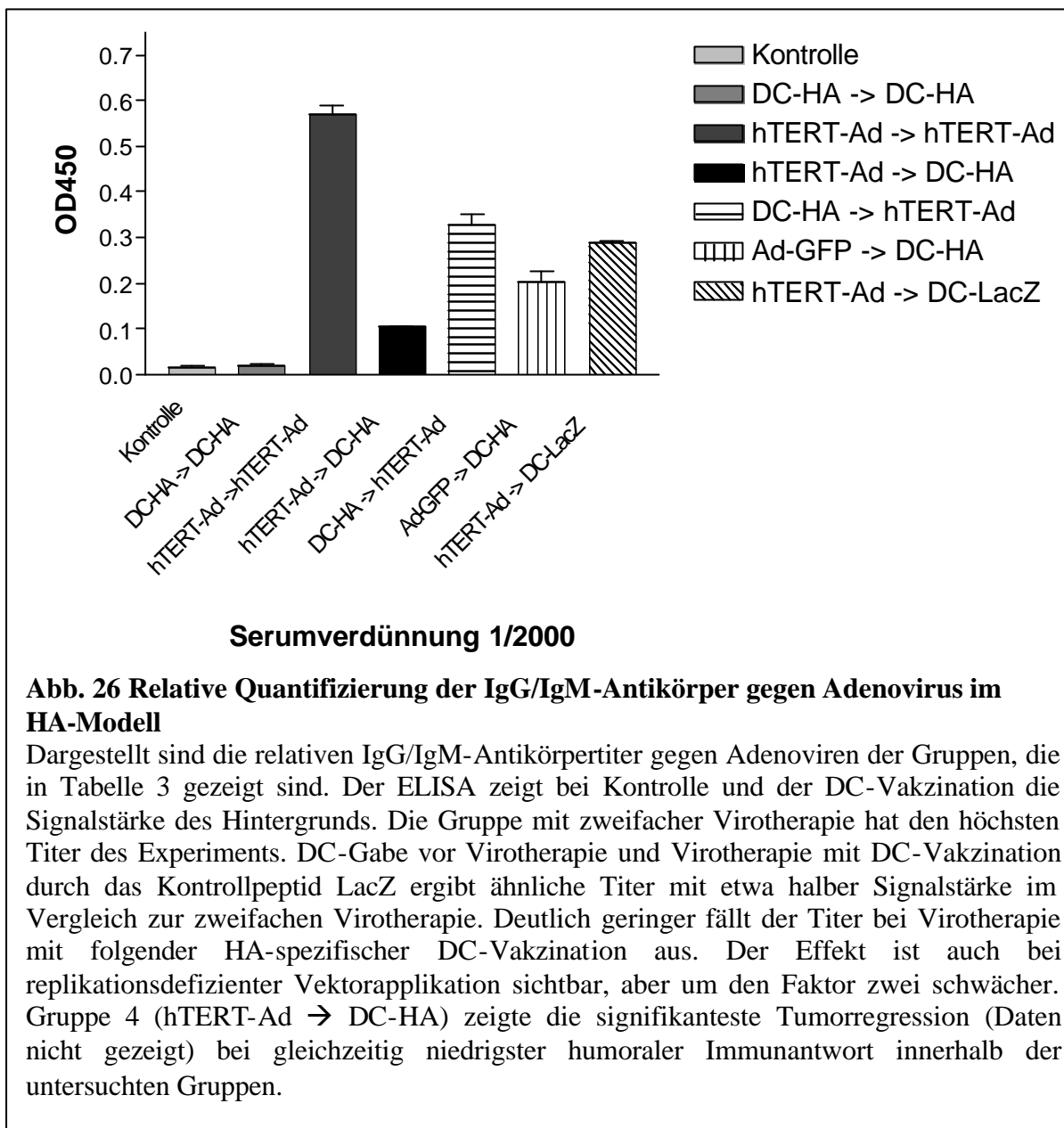
3.4.5.2 Humorale Immunantwort gegen Adenovirus

Als nächstes sollte die humorale Immunantwort gegen das Adenovirus untersucht werden, um mögliche Einflüsse der DC-Vakzinierung auf die humorale anti-Adenovirus Immunantwort aufzudecken. Es wäre denkbar, dass eine Impfung gegen ein Tumorantigen während der Persistenz eines tumorassoziierten Virus zu einer veränderten Vektorimmunität führt.

Zur Quantifizierung der gesamten IgG/IgM-, der Isotypen IgG1- und IgG2a-anti-Adenovirus-Antikörper aus dem Serum der Mäuse wurde ein ELISA durchgeführt (zur Übersicht der Gruppen s. Kap. 4.4.3.1 Tabelle 3).

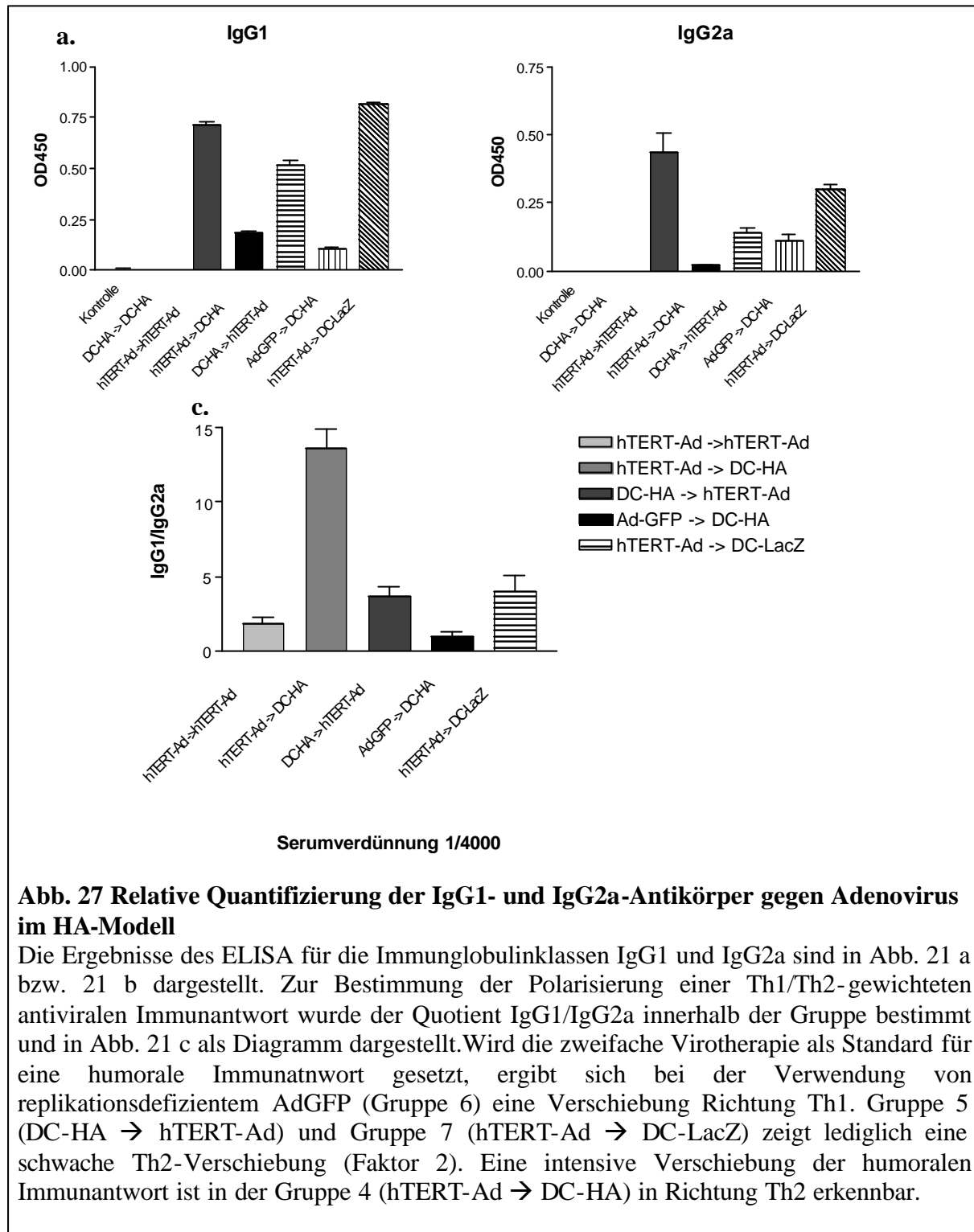
Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse des ELISA zur relativen Quantifizierung der gegen hTERT-Ad gerichteten IgG/IgM-Antikörper. Therapieansätze ohne hTERT-Ad ergaben wie erwartet keine antivirale Immunantwort. Bei Therapie mit zweifacher Gabe von hTERT-Ad ergibt sich die höchste Immunantwort (Gruppe 3) und etwa die Hälfte des anti-adenoviralen Titers zeigt sich bei einmaliger Applikation in den Gruppen 5 (DC-HA → hTERT-Ad) und 7 (hTERT-Ad → DC-LacZ). Im Vergleich dazu ist in der Gruppe 4, der Kombination Viroimmunotherapie mit HA-Peptid beladenen DCs, die Immunantwort um den Faktor 3 geringer. Die Gruppe 6 mit gleichem Therapieschema, aber mit replikationsdefizientem AdGFP ist dieser Effekt in abgeschwächter Form sichtbar.

Die spezifische Vakzinierung gegen ein Tumorantigen in Gegenwart Tumorassoziiertes, naiver CD8-T-Zellen während der Virotherapie scheint hier inhibitorisch auf die humorale anti-Vektor Immunantwort zu wirken. Zudem sollten die Klassen der Immunglobuline untersucht werden, die sich im Rahmen der adenoviralen Immunabwehr bilden. Eine Besonderheit der Klassen IgG1 und IgG2a ist die Abhängigkeit des Klassenwechsels nach B-Zell-Aktivierung vom Zytokinprofil der T-Zell-Hilfe. IgM und IgG3 werden von beiden, Th1- und Th2-Hilfe in B-Zellen induziert. Der Klassenwechsel zu IgG1 ist jedoch abhängig von den Zytokinen IL-4 und IL-5 einer Th2-vermittelten T-Zellaktivierung. IgG2a wird durch IFN- γ , IL-2 und TNF in einer Th1-vermittelten T-Zellaktivierung induziert (Stevens et al., 1988). Der von der Polarisierung durch Th1/Th2-Hilfe abhängige Klassenwechsel der Immunglobulinklassen IgG1 und IgG2a, die gegen Adenovirus gerichtet sind, wurde im ELISA quantifiziert (s. Abb. 27).



Der direkte Vergleich der Immunglobulinklassen IgG1 und IgG2a ist jedoch problematisch, weil die humorale Immunität der Gruppen untereinander unterschiedlich ausfällt und zusätzlich noch die Immunglobulinklasse IgM beinhaltet (s. Abb 26). Um die Gruppen untereinander vergleichen zu können wurde der Quotient IgG1/IgG2a gebildet. Dieser kann die Gewichtung der Th2/Th1-Hilfe bei der Ausbildung der humoralen Immunantwort gegen Adenovirus darstellen.

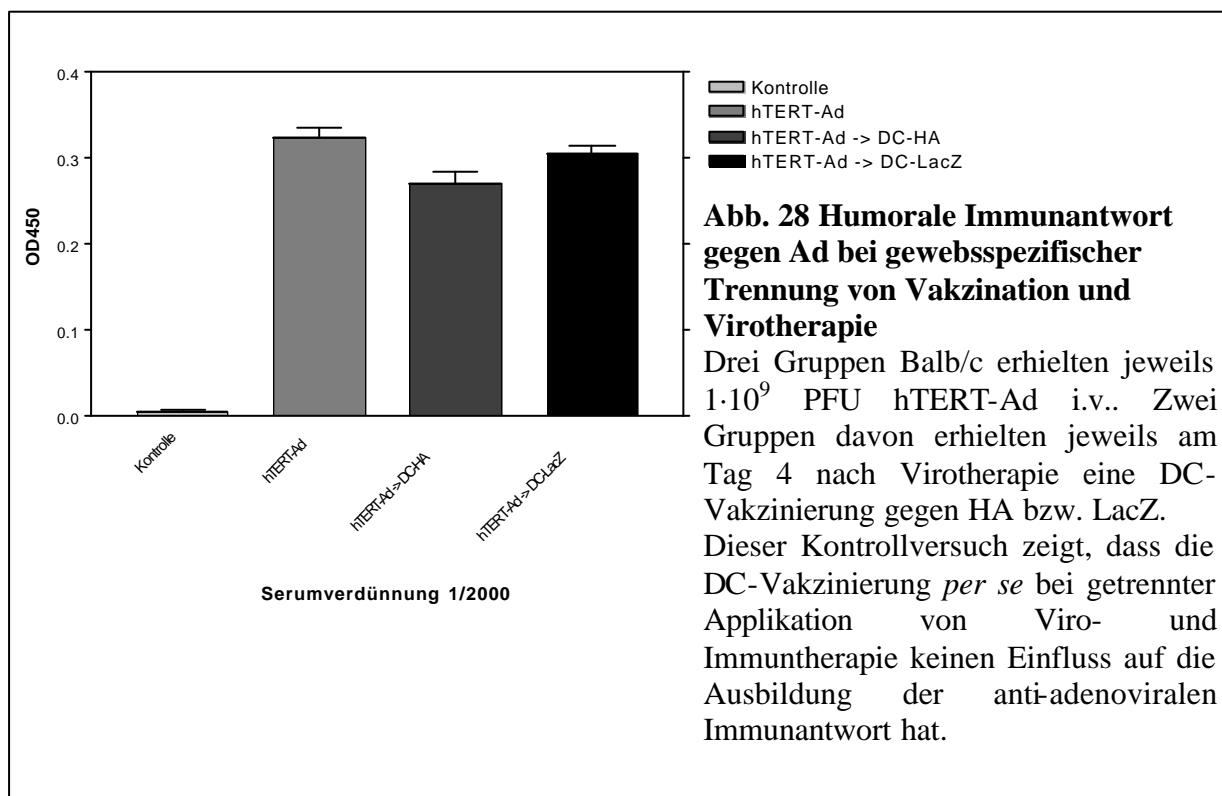
Abb. 27 a zeigt die Quantifizierung des Th2-Hilfe abhängigen Isotyps IgG1, Abb. 27 b die Quantifizierung des Th1-Hilfe abhängigen Isotyps IgG2a und Abb. 27 c den Quotient IgG1/IgG2a.



Wird die zweifache Virotherapie als Standard für eine humorale Immunantwort gesetzt, so ergibt sich bei der Gruppe 5 (DC-HA → hTERT-Ad) und Gruppe 7 (hTERT-Ad → DC-LacZ) eine leichte Verschiebung in Richtung Th1. Einzig bei Gruppe 6 (AdGFP → DC-HA), die Gruppe mit replikationsdefektem Adenovirus

überwiegt die Th1-Antwort durch einen höheren Titer IgG2a. In der Gruppe 4 (hTERT-Ad → DC-HA), mit niedrigstem Gesamtiter gegen Adenoviren, fällt der sehr niedrige Titer an IgG2a auf, was den hohen IgG1/IgG2a-Quotienten erklärt. Die Th2-Gewichtung der humoralen Immunantwort wird hier deutlich.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur humoralen Immunantwort kommt die Frage auf, ob die DC-Vakzination grundsätzlich einen Einfluss auf die Ausbildung der Immunantwort gegen Adenoviren hat. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die Vakzinierung von der Virotherapie getrennt wurde, um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt der verringerten humoralen Immunität auch dann auftritt, wenn das Zielgewebe der Virotherapie unterschiedlich von dem der DC-Vakzinierung ist. Dazu wurden DBA/2-Mäusen i.v. hTERT-Ad appliziert und nach 3 Tagen eine s.c. DC-Vakzinierung gegen das HA-Antigen bzw. gegen das LacZ-Antigen durchgeführt. Verglichen wurde die humorale Immunantwort von IgG/IgM gegen hTERT-Ad-behandelte Mäuse mit und ohne DC-Vakzinierung. Abb. 28 zeigt die Ergebnisse des Tierversuchs 18 Tage nach Virusgabe, bei dem die Antikörperantworten gegen Adenovirus miteinander übereinstimmen und nicht den zuvor festgestellten Effekt der verringerten humoralen Immunität nach der DC-Vakzinierung zeigen.



3.4.5.3 Bestimmung der neutralisierenden Antikörper gegen Adenovirus

Die in den letzten Abschnitten gezeigten Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen Adenovirus werfen die Frage nach der Effektivität der Serumvermittelten Neutralisation von Adenoviren auf. Dazu wurde in einer Verdünnungsreihe die Fähigkeit des Serums untersucht, Adenoviren durch Neutralisation unschädlich zu machen und so eine Infektion zu inhibieren. Als Reporter wurde in diesem Experiment AdLacZ verwendet. Infolge der Serumneutralisierung ergibt sich eine verringerte Expression des adenoviralen Reportergens β -Galaktosidase. Der Titer der neutralisierenden Antikörper (nAk) ist als Verdünnungsfaktor angegeben, der 50 % oder weniger des LacZ-Signals inhibiert, der aus einer Verdünnungsreihe bestimmt wird.

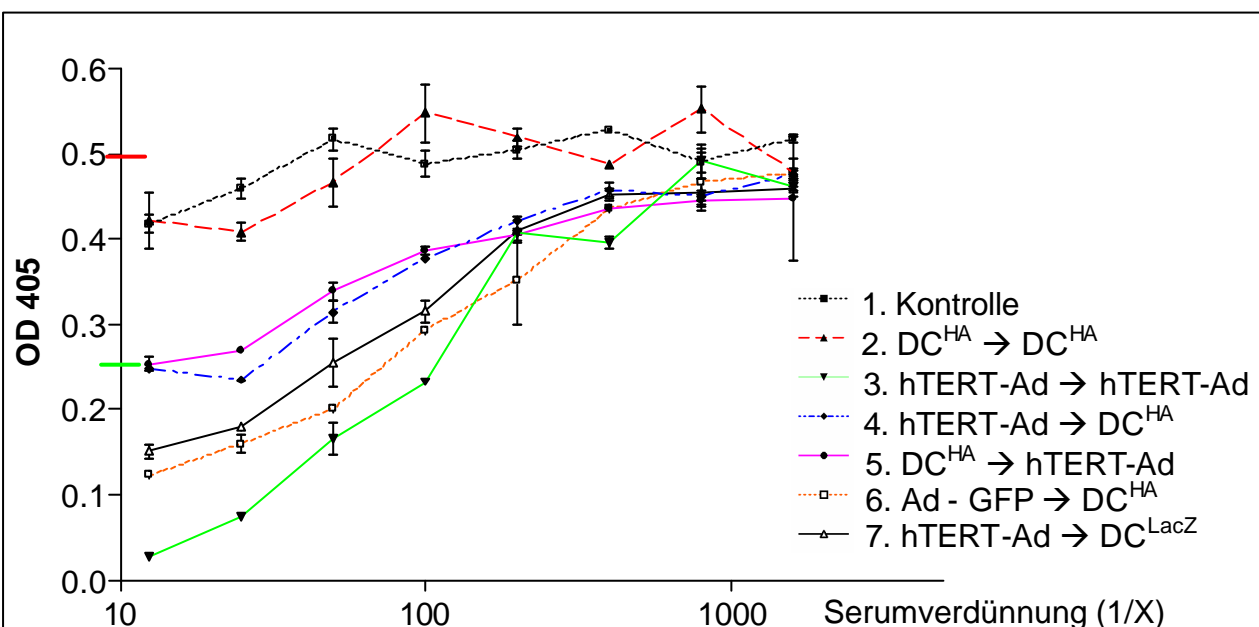


Abb. 29 Titrationskurve der nAk von Adenoviren im HA-Modell

Die grüne Markierung im Graphen zeigt den Wert der halben Maximalintensität des LacZ-Signals, aus dem die nAk-Titer bestimmt wurden. Die Neutralisierungskurve für adenovirale Infektion zeigt keine Inhibition bei der Kontrollgruppe 1 und Gruppe 2. In Gruppe 3 ist der nAk-Titer mit einem Wert von >100 am potentesten. Gruppe 4 und Gruppe 5 zeigen mit einem nAk-Titer von ~ 13 eine schwächere Neutralisierung als Gruppe 6 und Gruppe 7 (nAk-Titer >50). Die in der therapeutischen Anwendung wirksamste Gruppe 4 zeigt neben dem niedrigen Gesamtiter gegen Adenovirus auch einen relativ niedrigen nAk-Titer (~ 13).

Die Titrationskurve ist in Abb. 29 gezeigt. Auch hier sind unterschiedliche Aspekte der Immunantwort belegbar. Die von der Verwendung replikationskompetenter oder -defizienter Vektoren bzw. von antigenspezifischer oder -unspezifischer Vakzinierung abhängig sind. Das untersuchte Serum stammt von den Mäusen aus Versuch

3.4.3.1. Anhand des Graphen lässt sich die Effektivität der Neutralisation in vier Gruppen unterteilen: keine nAk sind in der Kontrollgruppe 1 und der Gruppe 2 mit DC-Vakzinierung allein zu finden, sehr starke Inhibition zeigt Gruppe 3 mit zweifacher Applikation von Virotherapie (nAk-Titer >100), interessanterweise ergibt sich für die Kombinationstherapie eine Aufspaltung in zwei unterschiedliche Neutralisationskurven. Die Gruppen 4 (hTERT-Ad → DC-HA) und 5 (DC-HA → hTERT-Ad) zeigen eine nur etwa halb so potente Neutralisation (nAk-Titer ~13) wie die Gruppen 6 (AdGFP → DC-HA) und 7 (hTERT-Ad → DC-LacZ) (nAk-Titer >50). Die Charakterisierung der humoralen antiviralen Immunantwort hat gezeigt, dass die Gruppe 4 (hTERT-Ad → DC-HA) einen schwachen nAk-Titer und den geringsten antiviralen Gesamttiter bei guter antitumoraler Immunantwort aufweist.

3.4.6 Virale Persistenz von hTERT-Ad *in vivo* im immuntherapeutischen Ansatz

In den vorangehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Vakzinierung mittels Tumorantigen-beladenen und aktivierten DCs während viraler Persistenz ein signifikant verbessertes therapeutisches Ergebnis erzielt. Weiterhin führt die Vakzinierung gegen den Tumor im gleichen Ansatz zu einer Abschwächung der humoralen Immunantwort gegen den adenoviralen Vektor und zu einem verschobenen Klassenwechsel bei Adenovirus-spezifischen Antikörpern, sowie zu Unterschieden in den nAks durch schwächere Neutralisation von CRAds bei Viroimmunotherapie. Diese Ergebnisse, sowie die im Zusammenhang mit zuvor gezeigten therapeutischen Beeinflussung der antitumoralen Immunantwort, deuten auf eine Interferenz von antitumoraler und antiviraler Immunreaktion im Rahmen der Viroimmunotherapie hin.

Um diese Interferenz detaillierter zu untersuchen, sollte in einem Experiment geprüft werden, ob die durch DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene induzierte abgeschwächte Immunantwort gegen hTERT-Ad die Elimination des Virus durch das Immunsystem verzögert und somit die Persistenz der viralen Onkolyse *in vivo* ermöglicht.

Dazu wurde DBA/2-Mäusen ein KLN 205-Tumor s.c. inokuliert. Beim Tumordurchmesser von 1 cm wurde eine Virotherapie durchgeführt. Für die Virotherapie beider Gruppen wurden pro Injektion $1 \cdot 10^9$ PFU hTERT-Ad mit $1 \cdot 10^7$ PFU Ad-Luc als Reportervirus gemischt und appliziert. Die zweite Gruppe erhielt an Tag 3 nach Virotherapie eine weitere Behandlung mit einer DC-Vakzination gegen

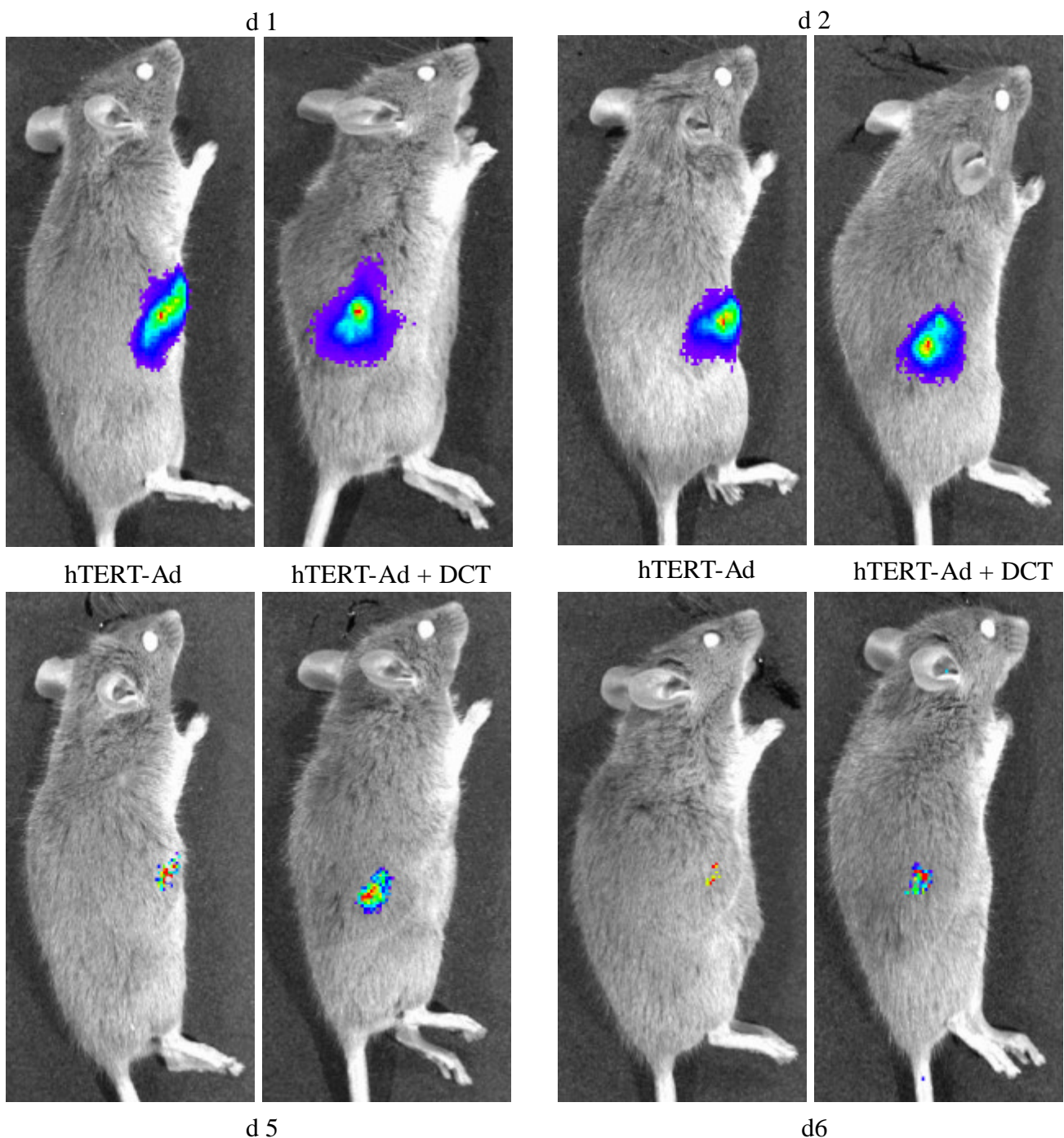


Abb. 30 Bildgebendes Verfahren zur viralen Persistenz *in vivo* bei DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene

Die Farbintensitätsdarstellung der Luziferaseaktivität (geringe Intensität = blau, hohe Intensität = rot, Abstufung über grün und gelb) in einem Koinfektionsmodell mit hTERT-Ad und Ad-Luc. Zwei Gruppen erhielten jeweils eine Injektion der Virusmischung in den KLN 205-Tumor, eine Gruppe erhielt anschließend zusätzlich eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen gegen Tumorantigene. Im Zeitverlauf zeigt sich bei der Gruppe ohne Vakzinierung bei initial leicht höherem Signal eine schnellere Beseitigung der Viren durch das Immunsystem. Nach etwa einer Woche ist in dieser Gruppe das Signal verschwunden. Durch die Impfung wird demnach eine Verlängerung der viralen Persistenz um etwa einen Tag erreicht.

Tumorantigene. Durch die Koinfektion von hTERT-Ad und Ad-Luc werden dem replikationsdefizienten Ad-Luc die transformierenden Proteine der E1-Region *in trans* von hTERT-Ad zur Verfügung gestellt und ermöglicht somit auch eine Replikation und Propagation von Ad-Luc. Die 100-fach höhere Dosis des hTERT-Ad sollte diesen limitierenden Faktor für die Propagation von Ad-Luc durch einen Überschuss kompensieren.

Zur Messung der Luziferaseaktivität wurde den Mäusen i.p. Luziferin zusammen mit einer Anästhesie verabreicht und mindestens 20 min nach der Injektion wurden die Tiere in die Messkammer des IVIS transferiert. Gemessen wurde in den ersten zwei Tagen für 1 min, danach wurde die Messung aufgrund des abklingenden Signals auf 3 min ausgedehnt. Die Abb. 30 zeigt die Aktivität der Luziferase farblich dargestellt in Form von Photonenemission als relative Intensitätsareale.

Gezeigt sind die Messungen im Zeitverlauf ohne (Gruppe 1) und mit DC-Vakzinierung (Gruppe 2) an den Tagen 1, 2, 5 und 6 nach der DC-Vakzinierung. Erkennbar ist bei der Gruppe ohne DC-Vakzinierung ein anfänglich leicht intensiveres Signal, das jedoch im Zeitverlauf schneller abnimmt als in der Gruppe mit DC-Vakzinierung. Nach 2 Tagen wurde dieser Trend bereits sichtbar, an Tag 5 ist das Signal der Gruppe 1 so intensiv wie das Signal der Gruppe 2 an Tag 6. Durch die DC-Vakzinierung wird demnach die Persistenz von hTERT-Ad um mindestens einen Tag verlängert. Mit dieser Methode konnte das Luziferasesignal über einen Zeitraum von etwa 7 bis 8 Tage nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs konnten die Hypothese einer antiviralen und antitumoralen Immuninterferenz weiter bestätigen und zudem belegen, dass diese Interferenz in der Viroimmunotherapie einen nachweisbaren biologischen Effekt *in vivo* hat.

4. Diskussion

4.1 Etablierung eines murinen immunkompetenten Tumormodells zur onkolytischen Virotherapie

4.1.1 Syngenes Virotherapiemodell mit subkutanem KLN 205-Tumor

In vivo Untersuchungen von tumorspezifisch replizierenden adenoviralen Vektoren in einem immunkompetentem Modell sind für die Charakterisierung der Funktionalität eines solchen Therapieansatzes von besonderer Bedeutung. Die bisherigen Untersuchungen zahlreicher konditionell replizierender adenoviraler Vektoren wurden in immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt. Die Wirkung des Immunsystems auf die Vektorpropagation wird in diesem Ansatz jedoch vernachlässigt (Zabner et al., 1993; Yang et al., 1994). Der Grund für die Verwendung eines solchen Modells liegt an der hohen Wirtsspezifität des humanen Adenovirus Serotyp 5. Dieser Serotyp, der hauptsächlich für die Entwicklung von CRAds verwendet wird, vermehrt sich nicht in murinen Zellen (Younghusband et al., 1979). Für die Propagation der Vektoren sind demzufolge Zelllinien humanen Ursprungs notwendig, welche als subkutanes Xenotransplantat auf Nacktmäusen im Rahmen eines Tumormodells Verwendung finden. Aufgrund der hohen Immunogenität adenoviraler Vektoren ist jedoch zu erwarten, dass das Immunsystem auf die Therapieeffizienz einen signifikanten Einfluss hat (Santra et al., 2005), was in Nacktmaus-Modellen nicht berücksichtigt wird. Für die Klärung immunologischer Fragestellungen in einem murinen immunkompetenten Tumormodell wäre daher ein onkolytischer Vektor optimal, der spezifisch in syngenem Tumorzellen repliziert und diese lysiert. Dazu müsste ein muriner CRAd verwendet werden, jedoch wurde ein solcher Vektor bisher nicht generiert.

Der onkolytische Vektor hTERT-Ad vom Serotyp 5, welcher selektiv in Telomerase positiven Tumorzellen repliziert, wurde zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelt und charakterisiert (Wirth et al., 2003). Zur Untersuchung von hTERT-Ad *in vivo* im virotherapeutischen Ansatz eines murinen Tumormodells musste zunächst eine geeignete Zelllinie gefunden werden, in der humanes Adenovirus in ausreichendem Maß für virotherapeutische Anwendungen repliziert. Zahlreiche Mauszelllinien

wurden auf diese Fähigkeit hin untersucht. Es konnte eine murine Zelllinie identifiziert werden, die tatsächlich infektiöse, humane Adenoviren nach einem lytischen Zyklus freisetzt. Die Plattenepithelkarzinomzelllinie KLN 205 ist permissiv für Adenoviren und produziert nach Infektion funktionelle adenoviraler Partikel in erheblicher Zahl. Die Fähigkeit der Propagation liegt etwa eine logarithmische Größenordnung unterhalb der humanen Hepatomzelllinie HuH7-Zellen, was für ein virotherapeutisches Modell eine geeignete Größenordnung darstellt (vgl. Kap. 3.1.2). Ternovoi hat für das Studium von humanen CRAds ein Modell für präklinische Therapien vorgeschlagen, bei dem diverse Zelllinien aus einem Hund in Bezug auf die Propagation der Vektoren um den Faktor 10^2 - 10^5 schlechter abschnitten, als das KLN 205-Modell (Ternovoi et al., 2005).

Zunächst sollte die Tumorigenität von KLN 205 abgeschätzt werden, indem DBA/2 Mäusen die Zellen subkutan appliziert wurden. Eine Injektion von $5 \cdot 10^6$ Zellen ergab einen rasch wachsenden Tumor mit häufiger Ulzeration in fortgeschrittenen Stadien. Zur weiteren Analyse wurde die MHC-Klasse-I Expression von KLN 205 untersucht. Im unstimulierten Zustand *in vitro* ist das Expressionsniveau sehr niedrig. IFN- γ induziert die Expression von MHC-Klasse-I, die Expression wird jedoch generell durch Infektion mit replikationskompetenten Adenoviren verhindert, was für die Kombination mit der Immuntherapie von Vorteil sein kann, da viral infizierte Zellen auf diese Weise prinzipiell einen Schutz vor CTL-vermittelter Lyse erlangen. Für eine erfolgreiche Kreuzaktivierung von tumorspezifischen T-Zellen nach Aufnahme des Tumormaterials von DCs sind dennoch alle notwendigen Bedingungen erfüllt (vgl. Kap. 3.1.3).

In ersten Versuchen wurden die Tumoren durch intratumorale Injektion mit hTERT-Ad behandelt und das Tumorstadium im Zeitverlauf beobachtet. Hier zeigt sich in der Regel lediglich eine transiente Stagnation des Wachstums, nach der wieder ein Tumorprogress festzustellen ist. Parallel hierzu entwickelt sich eine starke Immunreaktion gegen den Vektor, die eine wiederholte Gabe des onkolytischen Adenovirus zunehmend uneffektiver macht (vgl. Kap. 3.1.4).

4.1.2 Immunogenität adenoviraler Vektoren

Diese eher ernüchternden Ergebnisse der virotherapeutisch erreichbaren Tumorregression des KLN 205-Mausmodells illustrieren den erheblichen Einfluss des Immunsystems auf den Vektor. Das Immunsystem initiiert in naiven Mäusen eine

rasche Immunantwort gegen das Virus. Nach systemischer Gabe von hTERT-Ad lassen sich Antikörper gegen Adenovirus bereits nach drei Tagen detektieren. Für den Vektor bedeutet dies ein enorm kurzes Zeitfenster der therapeutischen Wirksamkeit. Die hohe Immunogenität von Adenoviren wird desweiteren durch die unter anderem aus Kapazitätsgründen durchgeführte Deletion der E3-Domäne, besonders durch E3 19k, nochmals verstärkt. In dieser Domäne sind Faktoren für die Blockierung einer effizienten Immunantwort kodiert (Lee et al., 1995).

Auch ein weiterer Zyklus Virotherapie ergibt keine weitere Regression. Hier wird anhand des Immunsystems deutlich, wie erheblich die therapeutische Effizienz durch wiederholten Einsatz der Virotherapie leidet. Eine erneute Applikation hTERT-Ad kommt einer *boost*-Immunisierung gleich und resultiert in einer raschen Elimination des Vektors. Die aus der Injektion von hTERT-Ad in den Tumor resultierende humorale Immunantwort ist vergleichbar mit einer intravenösen Injektion, die bei naiven Mäusen höher ausfällt als bei subkutaner Gabe einer vergleichbaren Dosis.

Die Ergebnisse dieses Modells zeigen die Dominanz des Immunsystems bei Virotherapie mit adenoviralen Vektoren. Eine Therapie allein mit hTERT-Ad wird in der Effektivität durch die immunologischen Einflüsse relativiert und erscheint deshalb als Monotherapie ungeeignet (vgl. Kap. 3.1.5).

4.1.3 Einfluss viraler Komponenten bei Phagozytose von Tumorantigenen auf die Kreuzaktivierung von T-Zellen

Nach der Etablierung des HA-Systems durch Einführung des Hämagglutinin-Proteins in die Zelllinie KLN 205 (KLN-HA), Verwendung von transgenen HA-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer und der entsprechenden Peptide, konnte gezeigt werden, inwiefern die Anwesenheit von viralen Komponenten einen Einfluss auf das Immunsystem bezüglich der antitumoralen Immunantwort hat. Die hohe Immunogenität der Adenoviren erzeugt einerseits zwar eine starke adenovirale Immunantwort, im Kontext der Onkolyse ist jedoch zu bedenken, dass am Ort der Replikation des Vektors, also im Tumor, eine Inflammation erzeugt wird und durch die adenoviral bedingte Zelllyse gleichsam eine große Anzahl sterbender Zellen entsteht. Diese Zellen enthalten infolge der Infektion PAMPs für antigenpräsentierende Zellen. Damit werden nicht nur virale Antigene, sondern auch gleichzeitig Tumorantigene von Immunzellen phagozytiert. Daher ist es denkbar,

dass die Tumortoleranz durch ein onkolytisches Adenovirus durch Ligation von TLRs durchbrochen oder zumindest abgeschwächt wird und somit Tumorantigene durch Assoziation mit Gefahrensignalen des Virus an Immunogenität gewinnen. Hinweise zur Reduktion der Tumortoleranz durch Stimulation von TLRs wurden in Ansätzen zur Tumortherapie bereits in etlichen Studien gemacht (zusammengefasst in Conroy et al., 2008). Im Rahmen dieser Studien wurden diverse TLR-Liganden, jedoch keine Viren verwendet

Um diesen Einfluss experimentell nachweisen zu können, musste zuerst das Adenovirus inaktiviert werden, um eine Infektion-induzierte Reifung von DCs zu verhindern. Adenoviren sind um ein vielfaches stabiler als Zellen. Adenoviren können nach einem Infektionsvorgang nicht inaktiviert werden, ohne auch die Zellen zu zerstören. Eine starke Hitzebehandlung zerstört jedoch das Virus nahezu vollständig. DCs reagieren nach dieser Behandlung nicht mehr mit einer Interferonantwort auf die durch Hitze inaktivierten Partikel. Die Hitzebehandlung zerstört zusätzlich die Zell-Kompartimentierung. Das HA-Antigen kann jedoch noch denaturiert aufgenommen werden, wodurch es für eine Kreuzpräsentation nach der Prozessierung weiterhin zur Verfügung steht. Die Bestandteile der Viren können zusammen mit dem tumorassoziiertem HA-Protein von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und diese aktivieren. Die TLR-Stimulation mittels dsRNA oder nicht-methylierter DNA des Adenovirus könnte somit zu einer effektiveren Kreuzaktivierung der Tumor-spezifischen T-Zellen führen.

DBA/2-Mäuse reagieren nach adoptivem Transfer von Clone4-T-Zellen auf hTERT-infizierte und Hitze-behandelte, s.c. applizierte KLN-HA-Zellen mit einer etwa doppelt so hohen Immunantwort auf das HA-Peptid im IFN- γ -ELISpot, als nicht-infizierte und Hitze-behandelte KLN-HA-Zellen. Um zeigen zu können, dass dieser Effekt tatsächlich über Kreuzaktivierung vermittelt wird, wurde eine weitere Zelllinie, dessen MHC-Klasse-I-Phänotyp nicht das HA₅₁₈₋₅₂₆-Epitop präsentiert, stabil mit HA transduziert. Die murine Zelllinie Hepa1-6 aus C57Bl6 (H-2K^b) zeigt ebenfalls eine etwa gleich hohe Immunantwort im gleichen experimentellen Aufbau im Vergleich zur HA MHC-Klasse-I kompatiblen Zelllinie KLN 205 (H-2K^d).

Diese grundlegenden Erkenntnisse sind für das Verständnis immunologischer Ansätze der Virotherapie von besonderer Bedeutung, für die bisher noch keine Informationen vorlagen. Die Untersuchungen zeigen, dass virale Bestandteile auch

eine antitumorale Immunantwort induzieren, wenn onkolytisches Zellmaterial von Immunzellen phagozytiert und kreuzpräsentiert wird.

4.2 Etablierung von dendritischer Zellvakzinierung gegen Tumorantigene im KLN 205-Modell

Als weiterer Therapieansatz wurde die dendritische Zellvakzinierung ausgewählt. Diese wird bereits klinisch eingesetzt und kann nahezu identisch in Mausmodelle transferiert werden (Abe et al., 1995; Song et al., 2000; Grauer et al., 2008). Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit etabliert. Dazu wurden für das Mausmodell Knochenmarkszellen *ex vivo* mit GM-CSF generiert und charakterisiert. Spezifische Marker der generierten DCs waren in Übereinstimmung mit den Charakteristika von unreifen myeloiden DCs. Die Stimulation mit TLR-Liganden führte zur charakteristischen Reifung der Zellen. Die für Adenoviren spezifischen TLR-Liganden sind dsRNA (TLR3) und nicht-methylierte DNA (TLR9). Um die Reifung möglichst auf diesem Wege einzuleiten, wurde der TLR3 Ligand Poly I:C verwendet, da dieses Agens gleichzeitig eine Interferonantwort stimuliert (Matsumoto and Seya, 2008). Die einzusetzende Konzentration von Poly I:C zur Reifung wurde anhand einer dafür konstruierten dendritischen Zelllinie mit NF κ B-abhängiger Luziferaseexpression ermittelt. Die relativ niedrige Konzentration wurde verwendet, um starke TLR-abhängige Apoptose durch NF κ B-Aktivierung zu vermeiden (Luft et al., 2004; O'Keeffe et al., 2005).

CD11c⁺-Zellen einer Tumorantigen-beladenen und stimulierten dendritischen Zellkultur wurden schließlich für die Vakzinierung verwendet. Als Injektionsort wurde der Bereich zwischen dem subkutanen Tumor und dem tumorassoziierten inguinalen Lymphknoten ausgewählt, um den Migrationsweg der DCs zum betroffenen Lymphknoten möglichst kurz zu halten und somit den maximalen Effekt der Vakzinierung zu gewährleisten.

4.3 Therapeutisches Modell aus Kombination von Virotherapie und Vakzinierung

Zur adenoviralen Virotherapie im immunkompetenten Mausmodell gibt es bisher keine veröffentlichten therapeutischen Ergebnisse. Die Ergebnisse aus

vorangegangenen Versuchen haben gezeigt, dass die Verwendung von hTERT-Ad im Rahmen einer Monotherapie zu keiner signifikanten Tumorreduktion führt. Deshalb sollten potentielle Synergismen bezüglich der adenovirale induzierter antitumor Immunität durch ein Kombinationstherapiemodell untersucht werden. Aus diesem Grund wurde als zweiter Therapieansatz dendritische Zellvakzinierung ausgewählt.

DC-Vakzinierung wird zurzeit in der Onkologie intensiv untersucht. Klinische Studien haben bisher die potentielle Wirksamkeit bestätigen können, jedoch sind die Ansprechraten auf diese Therapieform in der Regel gering (Lopez et al., 1997; Luft et al., 1998; Chen and Wu, 1998).

Zu Untersuchungszwecken werden deshalb im Mausmodell häufig Vakzinierungsmodelle mit stark immunogenen Tumoren verwendet, wie z.B. das B16-Melanommodell (Shibagaki and Udey, 2003; Prasad et al., 2005; Yoshikawa et al., 2006), da bei schwach immunogenen Tumoren die DC-Vakzinierung praktisch wirkungslos ist. Darüber hinaus deuten einige Untersuchungen sogar darauf hin, dass durch den Einsatz von DCs zur Impfung gegen Tumoren T-regs induziert werden, die die Toleranz des Tumors zusätzlich verstärkt (Zhou et al., 2006) oder eine Th2-Polarisation induzieren, durch die eine effektive Immunantwort, die sich gegen den Tumor richtet verhindert wird (Kao et al., 2006). Die DC-Vakzinierung im KLN 205-Modell erscheint als alleinige Therapie aufgrund der geringen Immunogenität dieser Zelllinie ungeeignet, da auch bei wiederholter Anwendung weder Tumorregression noch eine messbare Immunantwort im IFN- γ -ELISpot festzustellen ist. Somit sind beide Therapien, sowohl Virotherapie als auch Vakzinierung, im KLN205-Mausmodell als Einzeltherapie nicht erfolgversprechend. Bei der Kombination von Virotherapie und Vakzinierung stellen sich jedoch interessante Effekte ein, die auf einen Synergismus hindeuten (vgl. Kap. 3.4.1 und 3.4.5). Diese betreffen nicht nur die Tumorimmunität, sondern interferieren auch mit der Vektorimmunität. Das Ablaufschema der therapeutischen Behandlung spielt dabei eine zentrale Rolle für das Therapieergebnis. Die Therapiegruppe, die zunächst eine intratumorale Injektion von hTERT-Ad bekam und nach drei Tagen eine DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene erhielt, erzielte das bei weitem effektivste Therapieergebnis. Wird das Ablaufschema verändert, so sind die Ergebnisse weitaus schlechter. Die Kombination aus onkolytischer Virotherapie gefolgt von dendritischer Zellvakzinierung (Viroimmunotherapie) hat neben der

starken Immunantwort gegen den Tumor eine Reihe weiterer Einflüsse auf das Immunsystem, die im Anschluss noch diskutiert werden. Die Vakzinierung ist, so haben weitere Experimente gezeigt, an ein relativ enges Zeitfenster gebunden, um einen größtmöglichen Therapieeffekt zu erzielen (vgl. Kap. 3.4.2). Eine Impfung drei Tage vor oder zusammen mit Virotherapie und eine Vakzinierung am Tag 12 nach Virusgabe induzieren keine verstärkte antitumorale Immunreaktion mehr. Ein schlüssiger Erklärungsansatz für die starke antitumorale Immunantwort in diesem Ansatz ist, dass eine persistierende virale Inflammation im Tumor eine erfolgreiche Vakzinierung unterstützt. Außerhalb einer akuten adenoviralen Inflammation ist die Wirkung der Vakzinierung um ein Vielfaches schwächer (vgl. Kap. 3.4.2). Die lokale Inflammation induziert eine Schwächung der Tumortoleranz (vgl. Kap. 3.4.3) und erzeugt Tumorantigene mit Assoziation von aktivierenden Liganden für TLRs und bietet damit erst eine effektive Grundlage für eine erfolgreiche DC-Vakzinierung, die deshalb auch nur während der adenoviralen Inflammation synergistische Effekte vermittelt. Eine Studie von Salucci et al. zeigt interessante Parallelen zu diesem Phänomen. Die Autoren fanden heraus, dass ein adenoviral transferiertes Tumorantigen eine starke CTL-Antwort provoziert, die jedoch erst nach Koadministration von TLR-Liganden zur Überwindung der CD4 T-Zell-Toleranz Effektivität zeigte (Salucci et al., 2006).

Auch die therapiebedingte Regression der KLN 205-Tumore belegt, dass die Tumortoleranz auch bei schwach immunogenen Tumoren nicht unbedingt ein Mangel an Tumor-assoziierten Antigenen ist, sondern dass die Toleranz vielmehr der Regulation des Immunsystems unterliegt. Die Überwindung tolerogener Mechanismen des Tumors muss demnach ein zentrales Ziel erfolgreicher Immunotherapie sein. Die Tumortoleranz nimmt durch die Zunahme des Verhältnisses von tumorspezifischen CD8 T-Zellen zu tumorassoziierten Tregs ab (Ahonen et al., 2008). Virale Persistenz im Tumor verringert die Zahl der Tregs (s. Kap. 3.4.3.1) und DC-Vakzinierung aktiviert zusätzlich tumorspezifische CTLs. Durch eine der Virotherapie vorangehende Vakzinierung wird die Wirkung aktivierter tumorspezifischer CTLs wahrscheinlich durch Tregs inhibiert. Aus diesem Grund erscheint es verständlich, dass die Kombination von Virotherapie mit anschließender DC-Vakzinierung nur genau in dieser Reihenfolge wirksam ist.

Der synergistische Effekt der Viroimmunotherapie auf die Tumorregression ist im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht und charakterisiert werden.

4.4 Auswirkungen der Virotherapie auf das Immunsystem

4.4.1 Quantitative Auswirkungen der Viroimmunotherapie auf regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind an der Modulation von Immunantworten durch ihre inhibitorische Wirkung beteiligt. Jede Art von Immunreaktion scheint hierbei jeweils antigenspezifischen Tregs hervorzubringen. Selbst Virus-induzierte Tregs wurden erstmals bei HIV-Infektionen beschrieben (Garba et al., 2002). In Untersuchungen von Tregs der Viroimmunotherapie im KLN 205-Modell wurden diese systemisch und lokal quantifiziert. Bei einem subkutan gewachsenen Tumor in einer Flanke der Maus sind die axillären und inguinalen Lymphknoten dem proximal zum Tumor gelegen. Eine Analyse der CD4⁺-, CD25⁺- und Foxp3⁺-T-Zellen sollte eine verlässliche Aussage über die Mengenverhältnisse in den Lymphknoten und der Milz liefern. Bei der Quantifizierung der Tregs zeigte sich eine erniedrigte Anzahl von CD4⁺, CD25⁺ und Foxp3⁺ T-Zellen, die in der Literatur mit etwa 5 % angegeben ist (Brunkow et al., 2001) und in der Milz der Kontrollgruppe nur etwa 2 % beträgt. Die falsch negativen Ergebnisse scheinen methodisch durch die intrazelluläre Färbung bedingt zu sein. Sie sind jedoch vertretbar, da sie innerhalb der Gruppen gut reproduzierbar sind und anhand der Punktdiagramme gut erkennbar ist, dass tatsächlich nur die CD4⁺- und CD25⁺-T-Zellen auch Foxp3 exprimieren. Analysiert wurden die T-Zellen am fünften Tag nach der letzten Therapie. Grund für die Wahl des Zeitpunktes war das beobachtete Einsetzen der Tumorreduktion, welche vermutlich auf dem Einfluss der Tregs zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse der T-reg Population in der Milz zeigen, dass diese sowohl in der hTERT-Ad Gruppe (4,3 % Tregs) und in der Gruppe mit Vakzinierung (3,8 % Tregs) der Tumor-tragenden Mäusen erhöht sind (Kontrolle 1,9 %). Die Viroimmunotherapie führt nicht zu einer weiteren Erhöhung in der Milz (4,3 %). Interessanterweise führt die Applikation von replikationsdefizientem Adenovirus bei gleicher Dosis zu keiner Erhöhung der T-reg-Population (1,8 %).

Der Vergleich der Tregs in den axillären und inguinalen Lymphknoten verdeutlicht, dass die Quantität der Tregs im axillären Lymphknoten weder vom Tumor noch durch die Therapien signifikant beeinflusst wird. Jedoch ist lokal die Anzahl der

T-regs in den inguinalen Lymphknoten deutlich erhöht, was darauf hinweist, dass der inguinale Lymphknoten der vom Tumorgewebe beeinflusste Lymphknoten ist.

Die quantitative Analyse der T-regs in behandelten Mäusen liefert unterschiede sowohl in der Milz, als auch in den Lymphknoten. Applikationen von hTERT-Ad und Vakzinierung allein haben, wie alle anderen Gruppen auch, im abfließenden Lymphknoten keinen Effekt auf die T-reg-Population. Die Viroimmunotherapie jedoch zeigt einen Anstieg um das dreifache (3,3 % T-regs im Vergleich zu 1,1 % bei der Kontrolle). Selbst auf der kontralateralen Seite ist die Population um den Faktor 2,5-fach höher (2,5 % T-regs im Vergleich zu 1 % bei der Kontrolle). Nur in dieser Gruppe ist eine starke Induktion einer antitumoralen Immunantwort zu beobachten, deshalb ist es wahrscheinlich, dass T-regs in der Peripherie des Tumors in der Ausbildung einer effektiven Immunantwort durch therapeutische Behandlung durch die Viroimmunotherapie involviert sind (vgl. Kap. 3.4.3).

Zur Klärung der Fragestellung, inwiefern onkolytische Virotherapie Wirkung auf die intratumorale T-reg Population hat, wurden T-Zellen aus Tumorgewebe mit und ohne Virotherapie isoliert und auf die bereits im vorangegangenen Experiment verwendeten T-reg-assoziierten Marker analysiert. Dazu wurden tumorinfiltrierende T-Zellen anhand der Marker CD90⁺, CD4⁺, CD25⁺ und Foxp3⁺ in der FACS-Analyse untersucht und miteinander verglichen. Aufgrund der geringen Anzahl T-Zellen, die sich mit dieser Methode identifizieren lassen, beschreiben diese Werte allerdings nur eine deutliche Tendenz. Die Punktdiagramme in Abb. 23 zeigen sowohl bei der Verwendung von replikationsdefizientem AdLacZ für die Tumorthherapie, sowie bei hTERT-Ad eine leichte Verringerung der T-reg Population im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auffällig ist der sehr hohe Anteil der T-reg Population im unbehandelten Tumor (AdLacZ 11,8 % T-regs, hTERT-Ad 12,1 % T-regs, Kontrolle 15,1 % T-regs). Darüber hinaus lässt sich bei adenoviraler Gabe eine Verdoppelung der CD25-Expression feststellen, was für eine Virus-induzierte Aktivierung der T-Zellen vor Ort spricht. Das systemische Auftreten der T-regs durch die Analyse von Splenozyten in behandelten Mäusen lässt keine Rückschlüsse auf Änderungen der Population von Tumor-assoziierten T-regs zu. Eine solche Analyse muss lokal aus Zellen der Lymphknoten erfolgen. Die intratumorale Injektion von Adenoviren führt zu einer leichten Abnahme der T-reg-Population im Tumor und führt so eventuell zu einer Schwächung der Tumortoleranz. Allein die Viroimmunotherapie erhöht signifikant die Population der T-regs in den Tumor-assoziierten Lymphknoten. An der

Initiation einer starken antitumoralen Immunantwort sind vermutlich T-regs mit involviert.

4.4.2 Auswirkungen der Virotherapie auf dendritische Zellen

Als nächstes wurden die Auswirkungen der Virotherapie auf intratumorale dendritische Zellen untersucht. Bekannt ist, dass virale Infektionen bei DCs zu Reifung und zur Sekretion von Interferonen und Zytokinen führen.

Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob und in welchem Maße sich die Reifung von DCs bei Applikation von replikationskompetenten Adenoviren im Vergleich mit replikationsdefizienten Adenoviren durch die erhöhte Viruslast im Tumor differenzieren lässt. Dieses sollte *in vivo* gezeigt werden. Dazu wurden DCs aus KLN 205-Tumorgewebe drei Tage nach intratumoraler Gabe von AdLacZ bzw. hTERT-Ad isoliert und mit DCs aus unbehandeltem Tumorgewebe verglichen. Intratumorale CD11c⁺-Zellen zeigen in der Analyse der Expression von MHC-Klasse-II und CD40 eine Virus-induzierte Reifung sowohl in der AdLacZ-Gruppe, als auch in der hTERT-Ad-Gruppe. Die Expressionsmuster sind in beiden Gruppen jedoch sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Infektion mit replikationskompetenten Adenoviren für die Reifung der DCs kein ausschlaggebender Faktor für die immunologischen Effekte der Viroimmunotherapie sind.

4.5 Immunologische Aspekte der Viroimmunotherapie im HA-System

Zur weiteren Charakterisierung der Viroimmunotherapie wurden subkutane Tumoren mit HA-transgenen KLN 205 etabliert, um ein definiertes tumorassoziertes Antigen untersuchen zu können. T-Zell-Rezeptor transgene und HA-spezifische T-Zellen (Clone4) wurden mittels adoptiven Transfers appliziert, um antigenspezifische Aktivierung der Zellen im Rahmen therapeutischer Behandlung untersuchen zu können.

Im durchgeführten Versuch wurde noch einmal bestätigt, dass auch im definierten Antigen-System die Viroimmunotherapie im Vergleich zur Monotherapie mit hTERT-Ad bzw. DC-Vakzinierung mittels HA-Peptid-beladener DCs in der therapeutischen

Wirksamkeit überlegen ist. Anhand von zusätzlichen Gruppen wurde zudem veranschaulicht, inwiefern Virotherapie mit replikationsdefizienten Adenoviren im viroimmunotherapeutischen Ansatz antitumorale Effekte erzielt und welchen Effekt die Wirksamkeit von Kontroll-Vakzinierung gegen ein H2-K^d-kompatibles, aber irrelevantes Peptid (LacZ) im Rahmen der Viroimmunotherapie hat. Die Ergebnisse zeigen im IFN- γ -ELISpot die signifikantesten HA-spezifischen Signale bei Therapiekombinationen. Im Vergleich zur in Kap. 4.3 diskutierten Zeitreihe der Vakzinierung ist die Vakzinierung im HA-System auch drei Tage vor Virotherapie wirksam. Diese Immunreaktion zeigt, dass DCs tatsächlich in diesem Zeitraum *in vivo* ihre Wirksamkeit entfalten können. Allerdings beruht dieser Effekt auf der erhöhten Sensitivität der Methode des adoptiven Transfers, denn naive, tumorspezifische T-Zellen sind hierbei bereits in großer Zahl vorhanden und sind entsprechend leicht zu aktivieren. Weiterhin überrascht die Gruppe hTERT-Ad \rightarrow DC-LacZ, welche bezüglich der HA-Immunreaktion mit der Gruppe DC-HA \rightarrow hTERT-Ad vergleichbar ist, mit einem unerwartet starken Signal trotz LacZ-spezifischer DC-Kontrollvakzinierung. Dies erklärt sich durch eine Aufnahme von HA-Antigenen *in vivo*, denn die Applikation der DCs erfolgt in allen durchgeführten Versuchen zwischen Tumor und inguinalen Lymphknoten, einem Bereich, in dem prinzipiell viele absterbende Zellen durch Virotherapie vorhanden sind. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die applizierten DCs das HA-Antigen aus absterbenden Tumorzellen nach Virotherapie aufnehmen, präsentieren und so die beobachtete Wirkung vermitteln. Denn DCs behalten nach Aktivierung zum Großteil ihre Fähigkeit zur Phagozytose (Kamath et al., 2000) und verlieren diese erst nach antigenspezifischen Interaktionen mit T-Zellen (Kitajima et al., 1996). Desweiteren ist in dieser Gruppe auffällig, dass die induzierte Immunreaktion gegen LacZ verschwindend gering ist (s. Kontrollstimulation mit LacZ-Peptid Kap. 3.4.3.1), obwohl die Vakzinierung während der Persistenz des onkolytischen Vektors durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die DC-Vakzinierung nur dann synergistisch mit Virotherapie ist, wenn das Antigen, welches in der Vakzinierung eingesetzt wird, auch tatsächlich Tumor-assoziiert ist.

In der Viroimmunotherapie mit replikationsdefizientem AdGFP sind die beobachteten Effekte bezüglich HA-spezifischer Stimulation im ELISpot höher als in den Gruppen DC-HA \rightarrow hTERT-Ad und hTERT-Ad \rightarrow DC-LacZ. Hier zeigt sich, dass die antitumoralen Effekte nur bedingt replikationsabhängig sind und dass die HA-

spezifische Vakzinierung zum richtigen Zeitpunkt einen bedeutenden Faktor darstellt. Die HA-spezifische Vakzinierung nach Applikation des onkolytischen Vektors im Vergleich zu AdGFP ergibt jedoch eine weitere eine Steigerung der Immunantwort. Die bei Verwendung von AdGFP zu beobachtende schwächere HA-Immunantwort kann demnach mit dem Ausbleiben der Propagation des Vektors erklärt werden. Die Replikation erscheint also auf den ersten Blick nicht entscheidend zu sein, hat aber dennoch eine wichtige Funktion. Die Verwendung des replikationskompetenten Vektors führt neben diesem Aspekt noch zu einer Reihe weiterer Veränderungen, insbesondere beim Verhältnis von antiviraler und antitumorale Immunität, die im nächsten Kapitel diskutiert werden.

Die Ergebnisse der Therapiegruppen stützen weiterhin die Hypothese, dass die Gegenwart viraler Gefahrensignale im Tumor essenziell für eine erfolgreiche Vakzinierung während der akuten Inflammation ist.

Weiterhin ist die Viroimmunotherapie mit hTERT-Ad auch im HA-System am erfolgreich in Bezug auf die HA-spezifische Immunantwort der Versuchsreihe, d.h. die Therapie lässt sich in ihrer Anwendbarkeit bis auf ein einziges Tumor-assoziiertes Antigen reduzieren.

4.6 Drift antiviraler Immunantwort in Richtung anti-tumorale Immunität in der Viroimmunotherapie durch Immuninterferenz

Die strikte Assoziation des onkolytischen Vektors mit Tumorgewebe in der Virotherapie führt bei der Phagozytose von lysierten Tumorzellen durch antigenpräsentierende Zellen zu einer gemeinsamen Prozessierung sowohl von viralen Antigenen als auch von Tumorantigenen. Zur Induktion einer Immunantwort gegen den Tumor werden Virusantigene und Tumorantigene durch diesen Prozess demnach gemeinsam prozessiert. Ein progredienter Tumor vermittelt jedoch einen gewissen Grad an Toleranz gegenüber seinen Antigenen, die bereits in der Entwicklung notwendigerweise induziert sein muss. Die Transduktion des Tumors mit dem onkolytischen Vektor führt zur Generierung von Gefahrensignalen für antigenpräsentierende Zellen durch große Menge an toten Tumorzellen durch adenovirale Lyse und dadurch zu einer Verringerung der Tumortoleranz. Das Vorhandensein von viralen Komponenten führt, wie bereits gezeigt, zu einer

verstärkten Kreuzaktivierung von tumorspezifischen T-Zellen. Die darauf folgende DC-Vakzinierung, die ausschließlich gegen Tumorantigene gerichtet ist und keine viralen Antigene enthält, lenkt somit die Präferenz des Immunsystems auf die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort. Durch die Injektion von DCs außerhalb des Tumors wird die Infektion der DCs mit dem onkolytischen Vektor vermieden und so werden ausschließlich Tumorantigene präsentiert. Durch diese Form der Therapie wird durch die Interferenz der viralen und tumoralen Antigene die Immunreaktion durch die Impfung in Richtung Tumorimmunreaktion verlagert. Die Quantifizierung der humoralen Immunität gegen Adenovirus in Form des Gesamt-titers an Immunglobulin Typ IgG und IgM aus Mausserum zeigt unterschiedliche Intensitäten trotz gleicher Virusdosis in allen Therapiegruppen. Der Ansatz der Virotherapie im HA-System mit adoptivem Transfer zeigt die stärkste humorale Immunität gegen den Vektor bei zweifacher Applikation von hTERT-Ad. Die anderen Gruppen zeigen einen schwächeren IgG/IgM-Titer gegen Adenovirus auf einheitlichem Niveau bei den Gruppen DC-HA → hTERT-Ad und hTERT-Ad → DC-LacZ. Eine Ausnahme ist Gruppe hTERT-Ad → DC-HA (Viroimmunotherapie), in der die adenoviralen Immunglobulintiter signifikant erniedrigt sind. Im Ansatz ist dieser Effekt auch bei der Gruppe AdGFP → DC-HA zu erkennen. Anfangs konnte gezeigt werden, dass durch die Replikation von hTERT-Ad in KLN 205 im Vergleich zu AdGFP eine weitaus stärkere humorale Immunantwort entsteht (s. Kap. 3.1.2). Bemerkenswerterweise verursacht der replikationskompetente Vektor hTERT-Ad dennoch einen geringeren Antikörpertiter gegen Adenoviren. Diese Widersprüchlichkeit und die starke antitumorale Immunantwort in der Gruppe mit Viroimmunotherapie ist ein erster Hinweis darauf, dass die Balance der induzierten Immunität vom adenoviralen Vektor in Richtung Tumor verschoben wird.

Neben der Quantifizierung der humoralen Immunantwort gegen Adenoviren wurde weiterhin eine Klassifizierung der Immunglobulin-Isotypen der gegen Adenoviren gerichteten Antikörper durchgeführt. Besonders von Interesse waren dabei solche Isotypen, deren Klassenwechsel von einer Polarisierung der T-Helferzellen abhängt, um so eine Gewichtung der Immunantwort in Th1 und Th2 differenzieren zu können. Der Klassenwechsel nach IgG1 ist ausschließlich abhängig von Th2-polarisierten T-Zellen anhand der Zytokine IL-4 und IL-5, der Klassenwechsel nach IgG2a von Th1-polarisierten T-Helferzellen durch IFN- γ , IL-2 und TNF, während andere Isotypen (IgM/IgG3) hiervon unabhängig sind (Stevens et al., 1988). Bei den Ergebnissen des

ELISA der Gruppen mit Virotherapie liegen die Werte des Verhältnisses von IgG1 und IgG2a (entsprechend Th2/Th1) in einem Bereich zwischen 2 und 4. Davon weichen interessanterweise die Gruppen der Viroimmunotherapie mit AdGFP und hTERT-Ad genau gegensätzlich ab. Die Therapiekombination AdGFP→DC-HA führt zu einem niedrigeren Quotienten als der Durchschnitt, während der Quotient bei der Gruppe mit hTERT-Ad→DC-HA aufgrund des nahezu fehlenden IgG2a-Titers bei über 13 liegt. Die letzte Gruppe zeigt also eine humorale Immunreaktion gegen Adenoviren mit starker Th2-Gewichtung. Auch dieses Ergebnis stützt die These einer Verschiebung von antiviraler in Richtung antitumorale Immunantwort. Durch Aktivierung Tumor-assoziiertes CD8⁺-T-Zellen wird eine starke tumorgerichtete Th1-T-Zellantwort induziert und die dadurch verursachte CTL-vermittelte Lyse der Tumorzellen eliminiert gleichzeitig auch den Tumor-assoziierten Vektor. Eine erfolgreiche Th1-Aktivierung der CTLs führt sehr wahrscheinlich zu einer Inhibition von Th1-Aktivierungen anderer tumor-/virusassoziiertes Epitope, so dass durch diese Hemmung auch ein sehr niedriger IgG2a-Titer resultiert. Das Ergebnis kann auch dahingehend interpretiert werden, dass es in der Viroimmunotherapie bedingt durch die enge Assoziation viraler und tumorale Antigenen zu einer Immuninterferenz kommt, die durch eine Verschiebung des Antigenenspektrums durch DC-Vakzinierung entsteht. Dieses Phänomen erstreckt sich sowohl auf zelluläre als auch auf humorale Immunität.

Bei den gegensätzlichen Ergebnissen in Bezug auf den Th2/Th1-Quotienten in der Therapiekombination mit AdGFP gilt es zu bedenken, dass die Induktion der HA-Immunantwort schwächer ausfällt als bei der Gruppe mit replikationskompetentem Vektor und dadurch die Immuninterferenz weniger ausgeprägt ist. Weiterhin ist es möglich, dass die Replikationsdefizienz von AdGFP nach Infektion einer Zelle zur Polarisation einer Th1-Immunantwort neigt, da eine Th2-Immunantwort aufgrund der fehlenden Propagation viraler Partikel ineffizient wäre.

Ein weiterer wichtiger qualitativer Aspekt des Serums ist die Fähigkeit zur Neutralisierung von adenoviralen Partikeln. Die Neutralisation führt durch Bindung spezifischer Antikörper an Adenoviren zum Verlust der Infektiosität. Die Ergebnisse des Versuchs zeigen, dass die Gruppe mit zweifacher Applikation von Virotherapie die kompetenteste Fähigkeit zur Neutralisierung der Adenoviren hat. Weiterhin spalten sich die neutralisierenden Antikörpertiter (nAk-Titer) innerhalb der verbleibenden Gruppen mit einfacher Virusapplikation in zwei Gruppen auf (vgl. Kap.

3.4.5.3): Virotherapie mit hTERT-Ad in Kombination mit HA-spezifischer Vakzinierung resultiert unabhängig von der Sequenz der Therapie in einem schwächeren nAk-Titer als die Verwendung von AdGFP→DC-HA bzw. hTERT-Ad→DC-LacZ. Auch hier veranschaulichen die Ergebnisse, dass die tumorspezifische Impfung einen Einfluss auf die adenovirale Immunreaktion hat. Beachtlich ist auch, dass der replikationsdefiziente AdGFP neben einem höheren Gesamttiter auch einen höheren nAk-Titer induziert als hTERT-Ad, der durch Replikation neue Viren erzeugt und somit die Antigenlast hier eigentlich größer ist. Auch diese Ergebnisse deuten sehr auf eine Immuninterferenz hin. Stellt sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Interferenz, denn die schwächere antivirale Immunantwort trotz höherer Viruslast und längerer Persistenz lässt vermuten, dass dies nur erreicht werden kann, wenn aktiv Toleranz durch regulatorische T-Zellen gegen das Adenovirus ausgelöst wird. Diese Erklärung wäre auch in Übereinstimmung mit der beobachteten erhöhten T-reg Population in den tumorassoziierten Lymphknoten nach Viroimmunotherapie, die ausschließlich hier auftritt.

Um die These einer Interferenz weiter zu stützen, sollte im viroimmunotherapeutischen Ansatz eine verlängerte Persistenz des CRAd im Tumor *in vivo* nachgewiesen werden. Der Nachweis durch Injektion einer Mischung von hTERT-Ad und Ad-Luc zeigt im bildgebenden Verfahren eine verzögerte Elimination des Virus bei tumorspezifischer Impfung im Vergleich zur Kontrolle ohne DC-Vakzinierung. Die zuvor diskutierte abgeschwächte Vektorimmunität in der Viroimmunotherapie resultiert *in vivo* in einer verlängerten Persistenz von hTERT-Ad um etwa einen Tag, während eines Untersuchungszeitraums von insgesamt sechs Tagen. Diese Verlängerung der viralen Persistenz belegt weiterhin die These einer viralen und tumoralen Immuninterferenz. Der Effekt der längeren Persistenz spielt für die Tumorreduktion vermutlich eine eher untergeordnete Rolle. Wichtiger ist vielmehr die dadurch induzierte Verlagerung einer antitumoralen Immunität, die deutlich länger anhält, als die aus den Luziferaseergebnissen ermittelte Persistenz von hTERT-Ad.

Das Fazit dieser Arbeit ist also ein bisher unbeschriebenes Phänomen einer Immuninterferenz von viralen und tumoralen Epitopen in einem immunkompetenten Mausmodell. Die sonst nachteilige Immunogenität des onkolytischen Vektors wird zur Induktion einer starken Tumorimmunreaktion ausgenutzt. Durch den damit verbundenen Effekt kommt es zu einer signifikanten Tumorreduktion auf

immunologischer Basis in einem schwer therapierbaren Lungenkarzinom-Modell. Dieses Ergebnis wurde mit herkömmlichen Therapien bisher nicht erreicht.

4.7 Theoriemodell zur Viroimmunotherapie

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit soll an dieser Stelle ein Erklärungsmodell zu den Ergebnissen gegeben werden. Das nachfolgende Modell soll keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben, weil hierzu weitere Untersuchungen notwendig wären. Das gezeigte Modell ist jedoch in Übereinstimmung mit allen in dieser Arbeit generierten Ergebnissen.

Zum Theoriemodell sollen drei Fälle diskutiert werden:

1. Der erste Fall zeigt einen progressiven Tumor ohne Therapie.
2. Der zweite Fall stellt einen Tumor mit Virotherapie dar und
3. im dritten Fall sei ein Tumor mit Viroimmunotherapie gegeben.

Schematisch gezeigt sind in Abb. 31 die durch dendritische Zellen prozessierten Antigene und die dadurch im jeweiligen Fall entstehenden Immunantworten.

Die Abbildung zeigt im ersten Fall in Bezug auf die Tumorreaktion immunologische Toleranz. Hier hat der Tumor bereits im Laufe der Entstehung eine Selbst-Toleranz induziert. Die von der dendritischen Zelle aufgenommenen Tumorantigene in Form abgestorbener Tumorzellen werden zwar prozessiert und präsentiert, führen aber aufgrund fehlender Gefahrensignale und der bereits etablierten Toleranz nicht zu einer Aktivierung Tumor-spezifischer T-Zellen.

Im Fall der Virotherapie werden, durch die onkolytischen Eigenschaften des adenoviralen Vektors, tumorspezifisch virale Antigene propagiert. Neben den Tumorantigenen entstehen im Tumor zusätzlich virale Antigene, sowie Gefahrensignale für Immunzellen z.B. in Form viraler Nukleinsäurefragmente. Im Rahmen der gleichzeitigen Onkolyse entsteht während der Virotherapie eine große Anzahl toter Tumorzellen, die von DCs aufgenommen und prozessiert werden. Durch PAMPs der viralen Komponenten innerhalb der zerstörten Tumorzellen werden die DCs durch die Phagozytose des Materials aktiviert. Nach der Antigen-Prozessierung präsentieren die DCs sowohl virale Antigene als auch Tumorantigene.

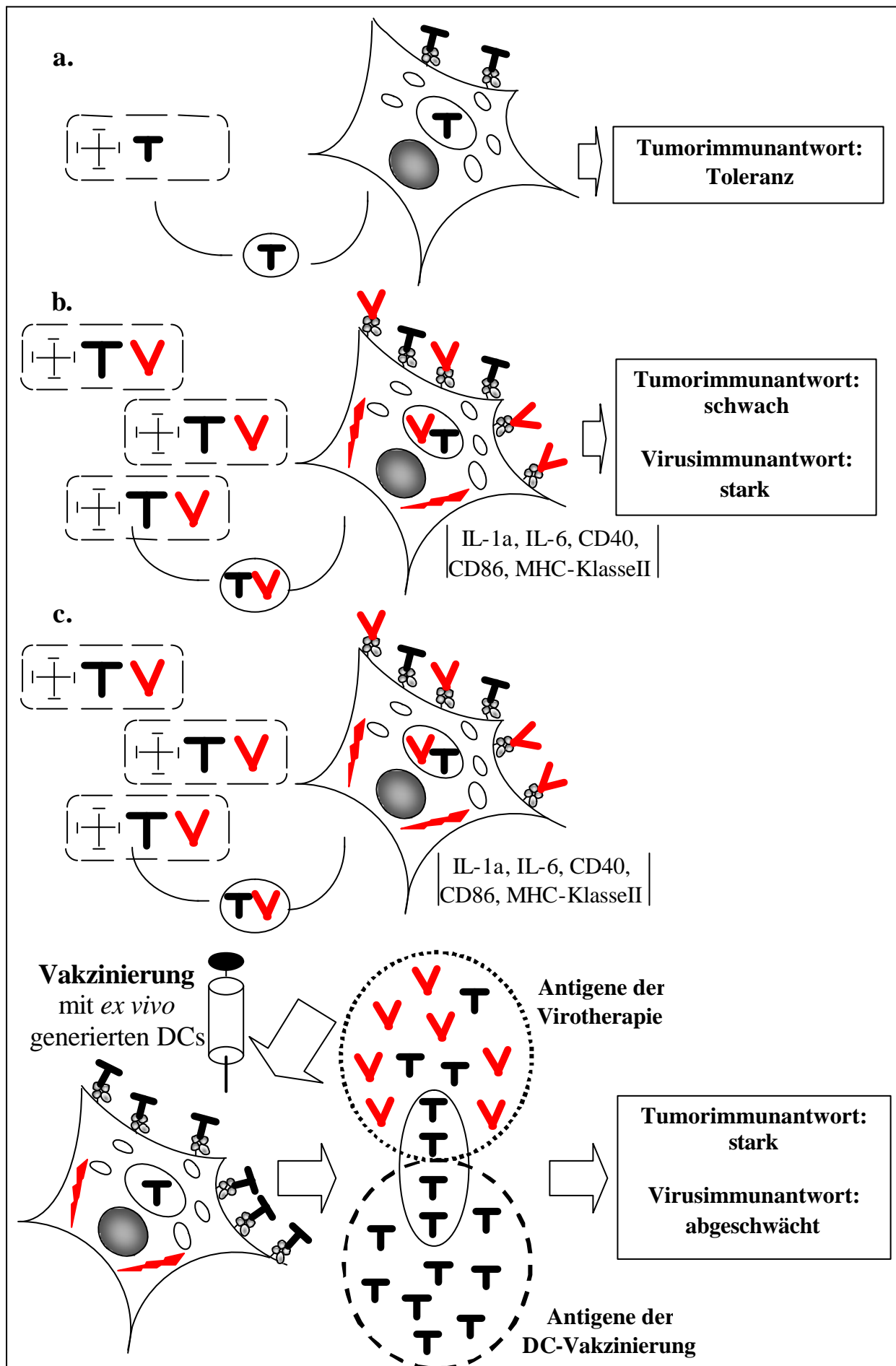


Abb. 31 Theoriemodell zur Erläuterung der Immuninterferenz bei Viroimmunotherapie

Das Schema a. zeigt die Verhältnisse der Tumorummunantwort unter Bedingungen ohne Therapie. Links dargestellt ist absterbendes Tumormaterial, das von DCs aufgenommen und prozessiert wird. Die Tumorantigene (T) werden präsentiert, vermitteln aber aufgrund der Toleranzmechanismen und der fehlenden Gefahrensignale keine Immunreaktion.

Bei Bedingungen unter Virotherapie b. führt die Onkolyse zu vielen absterbenden Tumorzellen, die tumorspezifisch virale Antigene (V) und Gefahrensignale beinhalten. Die onkolytischen Viren stimulieren das Immunsystem sehr stark und induzieren eine starke antivirale Immunität. Gleichzeitig wird durch die Assoziation der Viren mit dem Tumorgewebe durch DCs eine schwache antitumorale Immunreaktion vermittelt.

Eine DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene während der Virotherapie induziert eine Interferenz viraler und tumorassoziierter Antigene, weil die Quelle beider Arten von Antigenen identisch ist, d.h. aus dem Tumor stammen. Durch die DC-Vakzinierung überlappt sich nur das Spektrum der *ex vivo*-DCs und der natürlichen DCs im Bereich der Tumorantigene. Die Inflammation der Virotherapie und die damit verbundene Schwächung der Tumortoleranz begünstigt eine durch die Impfung vermittelte starke Immunreaktion gegen Tumorantigene. Eine starke zytotoxische Tumorummunreaktion beseitigt gleichzeitig den tumorassozierten Vektor. Die antivirale Immunantwort wird aufgrund der Effektiven Eliminierung beider Arten von Antigenen dementsprechend relativiert. Diese Interferenz lässt sich im KLN 205-Modell in vielen Aspekten belegen.

Durch die Inflammation im Tumor und durch Aktivierung der DCs wird die Tumortoleranz abgeschwächt und eine schwache Tumorummunantwort induziert. Diese Tumorummunantwort ist jedoch wahrscheinlich reversibel und verschwindet nach der Eradizierung des adenoviralen Vektors durch die tolerogenen Mechanismen des Tumors. Die sehr immunogenen viralen Antigene verursachen parallel zur Tumorummunreaktion die starke adenovirale Immunantwort bereits nach einfacher Applikation des Vektors.

Der dritte Fall zeigt die Viroimmunotherapie. Dargestellt ist der Einfluss der DC-Vakzinierung gegen Tumorantigene nach Virotherapie. Der Effekt der Virotherapie wurde bereits im zweiten Fall erläutert. Die schwache Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch Virotherapie wird durch die DC-Vakzinierung synergistisch verstärkt. Den *ex vivo* generierten, Tumorantigen-beladenen und aktivierten DCs fehlen im Gegensatz zu natürlichen DCs die viralen Antigene. Durch die Überlappung des Spektrums der Tumorantigene bei sowohl natürlichen DCs, als auch *ex vivo* generierten DCs und das gleichzeitige Fehlen viraler Antigene bei den *ex vivo* generierten DCs, kommt es während der Onkolyse zu einer verstärkten Fokussierung der Immunreaktion gegen Tumorantigene. Die Ergebnisse der T-reg-Analyse in den tumorassozierten Lymphknoten legt nahe, dass dieses Phänomen nicht einfach nur

auf einer Kompetition der von beiden DCs präsentierten Antigene basiert, sondern dass T-regs aktiv die Entstehung einer starken Tumorummunantwort beeinflussen. Weiterhin kann angenommen werden, dass die Virus-induzierte Inflammation ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Effektivität der Vakzinierung hat. Die starke Tumorummunantwort führt, wahrscheinlich ebenfalls durch den Einfluss von T-regs, zu einer Interferenz antitumoraler und antiviraler Immunität. Die beobachtete schwächere Vektorimmunität ist demnach von der engen Assoziation von Virus- und Tumorantigenen abhängig, die umso größer ist, je spezifischer der onkolytische Vektor wirkt. DCs können durch diese enge Assoziation der Antigene nicht zwischen Tumor- und Virusantigenen unterscheiden, da diese im optimalen Fall ausschließlich gemeinsam auftreten.

Die Fokussierung des Immunsystems auf Tumorantigene durch die DC-Vakzinierung schwächt somit indirekt die Dominanz der viralen Immunogenität. Diese Schwächung ist jedoch für eine zytotoxische Immunreaktion unerheblich, da die verstärkte antitumorale Immunantwort in gleichem Maße durch die enge Assoziation auch den Vektor eliminiert. In beiden Fällen richtet sich die Immunreaktion auf das gleiche Zielgewebe. Durch die gleichzeitige Eliminierung des Tumors und des onkolytischen Vektors, wird somit die hohe Präferenz viraler Antigene in diesem Ansatz relativiert. Unterstützt wird diese These durch die Intensität der Interferenz bei Experimenten, in denen ein adoptiver Transfer gegen das Tumorantigen durchgeführt wird. Hier ist dieser Effekt ausgeprägter als ohne einen solchen Transfer. Auch die verlängerte Persistenz der Viren im viroimmunotherapeutischen Ansatz *in vivo* deutet die biologische Relevanz dieser Interferenz an.

Eine vollständige Aufklärung der hier beobachteten Phänomene könnte für die Planung von Therapieschemata bei virotherapeutischen Ansätzen besonders in der viel versprechenden Kombination mit der Immunotherapie von entscheidender Bedeutung für den therapeutischen Erfolg sein.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Eukariontische Zelllinien

293	Humane, embryonale Nierenzelllinie (ATCC CRL 1573). 293-Zellen haben die E1-Region stabil im Genom integriert, daher eignen sie sich zur Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren (Graham et al., 1977; Graham and Prevec, 1995).
293T	Die Zelllinie 293T (293tsA1609neo) ist ein Subtyp der Zelllinie HEK293. Sie entstammt aus dem Labor von Michelle Calos von der Stanford Universität und ist transformiert mit dem großen T-Antigen von SV40 und besitzen eine Resistenz gegen G418. Plasmide mit Replikationsursprung von SV40 werden auf eine Zahl von 400-1000 amplifiziert und ergeben somit Transgene in hoher Kopienzahl. Diese Zelllinie wurde für die Produktion von Lentiviren verwendet.
H1299	Humane Lungenkarzinomzelllinie (ATCC CRL-5803) mit p53-Deletion. Wird als Standardzelllinie für die Bestimmung von lentiviralen Vektoren verwendet.
Hepa1-6	Murine Hepatomzelllinie des Stamms C57/Bl6.
HuH7	Humane Hepatomzelllinie mit einer mittleren Chromosomenzahl zwischen 50 und 59 (Nakabayashi et al., 1982).
DC2.4	Mittels GM-CSF generierte, immortalisierte dendritische Zelllinie aus dem Mausstamm C57/Bl6 (Shen et al., 1997). PCR-positiv für die Expression von TLR3, TLR9, MyD88, TRIF auf RNA-Ebene, sezerniert proinflammatorische Cytokine nach TLR-Aktivierung.
EL4 - GM-CSF	Murine Lymphomzelllinie (Thy1.2, H2-K ^b , ATCC TIB-39) stabil transduziert mit konstitutiver GM-CSF- und GFP-Expression. GM-CSF wird in den Überstand sezerniert.
Phönix-Ampho	Phönix ist eine Verpackungszelllinie für amphotrophe Viren, diese Spezies stammt von der Zelllinie 293T und ist stabil mit den viralen Genen <i>gag</i> , <i>pol</i> und <i>env</i> transformiert. Der Oberflächenmarker mCD8 erlaubt die Kontrolle der Stabilität der Gene. Nähere Informationen unter http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html
KLN205	Eine im Mausstamm DBA/2 (H2-d) spontan entstandene Plattenepithelkarzinomzelllinie der Lunge. Bildet Lungenmetastasen und ist tumorigen in DBA/2 und BDF1 Mäusen. Gering immunogen (ATCC CRL-1453).

5.1.2 Bakterienstämme

DH5a	Ein modifizierter <i>E. Coli</i> Stamm, der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde. Genotyp: F ⁻ f 80dlacZ ⁻ ?(lacZY-A-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (K ⁻ , mK ⁺) supE44, ? thi-1 gyrA relA1 (Gibco)
DM1	Ein modifizierter <i>E. Coli</i> Stamm, der zur stabilen Replikation von Plasmiden ohne dcm/dam-Methylierung entwickelt wurde. Genotyp: F ⁻ dam ⁻ ::Tn9(Cm ^r)dcm-mcrB hsdR ⁻ M ⁺ gal1 gal2 ara ⁻ lac ⁻ thr ⁻ leu ⁻ tonR tsxR su0 ? (Gibco)
JM109	Ein modifizierter <i>E. Coli</i> Stamm, der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde. Genotyp: F ⁻ traD36 lacI ^f ?(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /e14 ⁻ (McrA ⁻) ?(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal ^r) endA1 hsdR17(K ⁻ , mK ⁺) relA1 supE44 recA1 (Gibco)

5.1.3 Mausstämme

DBA/2	Häufig verwendeter Inzuchtstamm, etabliert von C. C. Little (1909). Syngen für die in dieser Arbeit als subkutanes Tumormodell verwendete Zelllinie KLN 205.
Balb/c Clone4	Der T-Zell Rezeptor der Balb/c Mäuse vom Genotyp B10.Cg-H2 ^d Tg(TcraCl4, TcrbCl4) 1Shrm/ShrmJ ist spezifisch gegen Influenza Virus A/PR/8 Hämagglutinin (HA) gerichtet. Der T-Zell Rezeptor besteht aus den Ketten Tcra (V-J, Valpha10) und Tcrb (VDJ, Vbeta8.2), das Epitop ist ein Nonamer der Sequenz IYSTVASSL der Position 518-526 der fortlaufenden Aminosäuresequenz des Hämagglutinin im Kontext der MHC-Klasse-I H2-K ^d abhängigen Antigenpräsentation. Ein Zuchtpaar der transgenen Mäuse wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Jürgen Wehland überlassen.

5.1.4 Plasmide

pBluescript-KS I	
(pBS):	Klonierungsvektor mit T3- und T7-Promotor (Fa. Stratagene). Das Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit als Klonierungs- und Zwischenvektor und als Grundvektor für den Aufbau vieler Expressionsvektoren verwendet.
pMAX4.1	Vektor für die konstitutive Expression der extrazellulären und membranständigen Domäne von humanem CD4 (Fa. Miltenyi).
psiCHECK	Bicistronischer Vektor für die Bestimmung der Effizienz von shRNA (Promega). Exprimiert Firefly- und Renillaluziferase. Ursprung der

	Sequenz für die Renillaluziferase, die in einen Lentivirusvektor für die NF κ B-abhängige Reporter-Expression kloniert wurde.
pLVTHM:	Lentiviraler Vektor mit GFP-Kassette mit konstitutivem EF1a-Promotor (Tronolab/Addgene). Alle klonierten und in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren sind Derivate dieses Konstrukts.
p3x κ B-Luc:	Expressionsvektor bestehend aus einem NF κ B-sensitiven Promotor mit der TATA-Box aus dem β -Globin-Gen zur Expression der Firefly-Luziferase. Sehr sensitiv für Messungen der NF κ B-Aktivierung (freundliche Überlassung von Dr. T. Wirth).
pCMMP-HA-I-GFP:	Retroviraler Vektor zur Expression des Glykoproteins Hämagglutinin aus dem Influenzavirus. Durch die zusätzliche Insertion von IRES-GFP lassen sich transduzierte Zellen schnell und einfach über Fluoreszenzmikroskopie oder FACS-Analyse nachweisen (freundlicherweise von Dr. E. Jäckel zur Verfügung gestellt).
pMDL g/p RRE, pMD.G, pRSV-Rev	Vektoren für die Kotransfektion von 293T Zellen zusammen mit den Derivaten des lentiviralen Vektors pLVTHM zur Generierung von lentiviralen Partikeln der dritten Generation. Alle Plasmide stammen von Tronolab/Addgene.
pShuttle-CMV	Zwischenvektor für die Aufnahme des Inserts für den lentiviralen Vektor zur NF κ B-abhängigen Expression der Renillaluziferase (Fa. Stratagene).

5.1.5 Im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide

1333	Expressionsvektor für CD90, welches aus Milz-cDNA von DBA/2-Mäusen mit PCR amplifiziert, mit <i>EcoR</i> I und <i>Hind</i> III verdaut wurde und in den <i>EcoR</i> I und <i>Hind</i> III-Verdauten pMAX4.1 durch Substitution von CD4 einkloniert wurde.
2950	NF κ B-induzierbarer Promotor (3x κ B-Promotor) aus p3x κ B-Luc mit <i>Bgl</i> II-Verdau mit darauf folgendem Klenow- <i>fill-in</i> und <i>Hind</i> III Verdau gewonnen. Das Insert wurde in pBlueScript durch Ligation in den <i>Eco</i> RI mit Klenow- <i>fill-in</i> und <i>Hind</i> III-verdauten Vektor einkloniert.
4035	Lentiviraler Vektor pLVTHM mit Deletion des TetO und des H1-Promotors. Die Deletion erfolgte durch einen Verdau mit <i>Bam</i> H I und <i>Cla</i> I mit anschließendem Klenow- <i>fill-in</i> und Religation des Vektors. Diese Klonierung erzeugt wieder eine <i>Bam</i> H I-Schnittstelle am Religationspunkt.
4716	Vektor pLVTHM basierend auf 4035. Bei diesem Konstrukt wurde die Schnittstelle <i>Xba</i> I durch Verdau mit diesem Restriktionsenzym und anschließendem Klenow- <i>fill-in</i> deletiert.

-
- 4691 Enthält die Sequenz CD90 aus 1333, welche über *EcoR* I und *Hind* III mit anschließendem Klenow-*fill-in* mit einer *blunt-end*-Ligation in den Vektor pBS (*Bam*H I Verdau und Klenow-*fill-in*) kloniert wurde.
- 5661 pShuttle-CMV verdaut mit *Hind* III, anschließend erfolgte ein Klenow-*fill-in*. Eine Religation des Vektors erzeugt aus der deletierten *Hind* III-Schnittstelle eine *Nhe* I-Schnittstelle.
- 5781 pBlueScript mit 3x?B-Promotor. Der Promotor wurde mit *Hind* III und *Spe* I gewonnen und erneut in pBluescript einkloniert, um die *Xba* I-Schnittstelle im *Hind* III- und *Xba* I-verdauten Vektor zu entfernen.
- 5829 Hier wurde die *Xba* I-Schnittstelle im 3x?B-Promotor durch *Xba* I-Verdau mit anschließendem Klenow-*fill-in* und Religation deletiert.
- 5856 Zwischenvektor mit CD90 Sequenz in 5661. Die CD90 Sequenz wurde aus 4691 durch Verdau mit *Sal* I und *Not* I gewonnen und in den *Sal* I- und *Not* I-verdauten Vektor 5661 ligiert.
- 5864 Klonierung des Renillaluziferase-Inserts aus psiCHECK (verdaut mit *Nhe* I, anschließend Klenow-*fill-in* und *Xho* I-Verdau) in den *Not* I-verdauten Vektor mit Klenow-*fill-in* und anschließend *Xho* I-verdauten Vektor 5661.
- 6037 Zwischenvektor für die Kassette der Renillaluziferase mit 3x?B-Promotor. Kloniert aus den Vektoren 5781 (*Hind* III-Verdau mit Klenow-*fill-in* und anschließend *Kpn* I-Verdau) zur Gewinnung des Inserts und 5864 mit *Sal* I-Verdau mit Klenow-*fill-in* und anschließend *Kpn* I-Verdau als Zielvektor.
- 6082 Zwischenvektor basierend auf pShuttle-CMV mit EF1a-Promotor, cPPT-Element und CD90-Sequenz. Kloniert aus den Vektoren 4035 (Insert gewonnen durch *Sal* I- und *Pme* I-Verdau) und 5856 als Zielvektor (Verdaut mit *Hind* III, Klenow-*fill-in* und anschließend *Sal* I-Verdau).
- 6202 Zwischenvektor für das finale Insert bestehend aus dem 3x?B-Promotor mit Renillaluziferase und anschließend EF1a-Promotor mit CD90-Sequenz. Generiert wurde das Insert durch *Sal* I, Klenow-*fill-in* und anschließend *Kpn* I-Verdau von 6082. Dieses Insert wurde in den Zielvektor 6037 ligiert, der zuvor mit *Xba* I, Klenow-*fill-in* und anschließend *Kpn* I verdaut wurde.
- 6289 Lentivirusvektor mit NF?B-abhängiger Renillaluziferase-expression mit CD90 Reporter gen, welches konstitutiv durch den Promotor EF1a exprimiert wird. Der Vektor wurde konstruiert aus dem Zwischenvektor 6202 für das Insert mit *Kpn* I, Klenow-*fill-in* und anschließende *Nhe* I-Verdau. Das Insert wurde anschließend in den lentiviralen Vektor 4716 ligiert, welcher zuvor *Sal* I und *Spe* I verdaut wurde.

5.1.6 Rekombinante Adenoviren

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Adenoviren handelt es sich um Adenoviren des humanen Serotyps-5. Diese enthalten alle eine Deletion der E3-Region. Mit Ausnahme von hTERT-Ad sind alle Adenoviren zusätzlich E1-deletiert, was entscheidend für die Replikationsdefizienz ist, so dass diese Viren für die Propagation auf die Zelllinie 293 angewiesen sind.

Alle E1-deletierten Adenoviren wurden durch homologe Rekombination mit einem pShuttle-Vektor das Transgen in das virale Genom eingeführt.

AdLacZ(β gal):	Enthält das Gen der β -Galactosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Virus wurde freundlicher Weise von Dr. D. Brenner und Dr. K. Streetz zur Verfügung gestellt.
AdGFP	Enthält das Reportergen des <i>green fluorescent proteins</i> (GFP) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.
hTERT-Ad	Onkolytisches Adenovirus mit funktioneller E1-Region unter der Kontrolle des humanen TERT (<i>telomerase reverse transcriptase</i>)-Promotors. Dieses Virus repliziert selektiv in TERT ⁺ -Zellen (Wirth et al., 2003).

5.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG, Ebersberg bezogen. Alle Sequenzangaben sind in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Sequenzen zu den Primern wurden aus der Nukleotiddatenbank von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> bezogen.

Primerpaar zur/zum

Genotypisierung der Clone-4 transgenen Mäuse

CL4-V GCA GGG CTG AAA GAA CAG CAA

CL4-R GCT TCC TCC AGA ATT TGA GGC

Nachweis des MyD88-Fragments

MyD88-FW600 TTA GCT TG CAG GAG ATG ATC CG

MyD88-Rev1065 TTG CGG CCG CGG GGA GCT AAA GAT GTA GAC

Nachweis des TRIF-Fragments

TRIF-FW1266 TTA AGC TTC CAG AGC GGC TTG ATT CAA CTG

TRIF-Rev1671 TTG CGG CCG CCG GTT CTT TAT TCT CCC CAC

Nachweis des TLR3-Fragments

TLR3-FW2522 TTA AGC TTG GTA CTG TCA TTC ACA TCG

TLR3-Rev2859 TTG CGG CCG CCG CCC TTG AAT CTT CTG CAC AGA GG

Nachweis des TLR9-Fragments

TLR9-FW1804 AAA AGC TTC CAC AAT TTC AGT TTT GTG ACC

TLR9-Rev2241 AAG CGG CCG CGT TGC TAC TGA CAT CGA GTT TC

Nachweis von IL1-a

mIL1a-FW	CAA GAT GGC CAA AGT TCC TG
mIL1a-Rev	GCT TGA CGT TGC TGA TAC TG
mIFN- β -FW453	GTG CAA AGG TAC CTT AAA CTC
mIFN- β -Rev646	CAA ATG CAG TAG ATT CAC TAC C
mIL-6-FW	CAA GAA AGA CAA AGC CAG AG
mIL-6-Rev	TTG GAT GGT CTT GGT CCT TA
mIFN-a-family-FW	ATG GCT AGG CTC TGT GCT TTC CT
mIFN-a-family-Rev	AGG GCT CTC CAG ACT TCT GCT CTG (Hughes, Jr. et al., 1994)

Nachweis von IL12-p40

mIL12-FW948	CCA TTC CTA CTT CTC CCT CAA G
mIL12-Rev1163	CCA ACG TTG CAT CCT AGG ATC
mGAPDH-FW561	TTG TGG AAG GGC TCA TGA CC
mGAPDH-Rev911	TGA AGT CGC AGG AGA CAA CCT

Isolierung von CD90 aus cDNA

CD90-FW	AAG AAT TCG AAT CCA AGT CGG AAC TCT TGG CAC
CD90-Rev	AAA AGC TTC TCG AGG GCT CCT GTT TCT CCT TGG

5.1.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Alle Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe wurden von der Firma eBioscience bezogen, wenn nicht anders angegeben.

anti-Maus/Mensch/Ratte monoklonal Bak		Y164	abcam
anti-Maus/Mensch/Ratte monoklonal Bax		E63	abcam
anti-Maus CD3e	PE	145-2C11	
anti-Maus CD4	FITC	L3T4	
anti-Maus CD8a	FITC	53-6.7	
anti-Maus CD11b	FITC	M1/70	
anti-Maus CD11c (Integrin α_x)	APC	N418	
anti-Maus CD11c (Integrin α_x)	Biotin	N418	
anti-Maus CD14	Biotin	Sa2-8	
anti-Maus monoklonal CD16/CD32 (Fc γ III/II R) (Fc Block TM)		BD	
anti-Maus CD19	Biotin	MB19-1	
anti-Maus CD24	Biotin	M1/69	
anti-Maus CD25 (IL-2 Rezeptor α)	PE	PC61.5	
anti-Maus CD40	FITC	HM40-3	
anti-Maus CD40	unkonjugiert	1C10	
anti-Maus CD80 (B7-1)	PE	16-10A1	
anti-Maus CD83	PE	Michel-17	
anti-Maus CD86 (B7-2)	FITC	GL1	
anti-Maus CD90.2 (Thy1.2)	PE	53-2.1	
anti-Maus CD90.2 (Thy1.2)	FITC	53-2.1	

anti-Maus CD90.2 (Thy1.2)	Biotin	53-2.1	
Maus Folatrezeptor 4	Alexa Fluor 647	eBio12A5	
anti-Maus/Ratte Foxp3	APC	FJK-16s	
Goldener syrischer Hamster Isotypkontr.	PE	-/-	
Ratte IgG2a Isotypkontrolle	FITC		
Ratte IgG2a Isotypkontrolle	PE		
Ratte IgG1 Isotypkontrolle	FITC	eBR2a	
anti-Maus polyvalent IgG, IgM	Peroxidase		Zymed
anti-Maus monoklonal IgG1	Peroxidase		Zymed
anti-Maus monoklonal IgG2a	Peroxidase		Zymed
anti-Maus Interferon-gamma	unkonjugiert	AN-18	
anti-Maus Interferon-gamma	Biotin	R4-6A2	
anti-Maus MHC Klasse II (I-A/I-E)	APC	M5/114.15.2	
anti-Maus MHC Klasse I, H-2K ^d /H-2D ^d	FITC	SF1-1.1	BD PharMingen
anti-Maus MHC Klasse I, H-2K ^b	FITC	AF6-88.5	BD PharMingen

Magnetische Beads zur Zellseparation:

CD11c (N418) MicroBeads Miltenyi Biotec

Für Sekundärfärbungen für die Biotin-konjugierten Antikörper wurden folgende Streptavidin-Konjugate/Tandemkonjugate verwendet:

Streptavidin-HRP	
Streptavidin-FITC	
Streptavidin-PE	
Streptavidin-PE-Cy7	
Streptavidin-PerCP	BD PharMingen
Streptavidin-APC	
Streptavidin-APC-Cy7	

5.1.9 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Gibco
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Agar noble	Gibco
Ampicillin	Sigma
ATP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma

Bacto-Tryptone	Gibco
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin, Fraktion V)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Cäsiumchlorid	Serva
Chloroquin	Sigma
DEPC-Wasser	Peqlab
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Appllichem
DMEM mit Glutamax-I	Gibco
EDTA (N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat)	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Gibco
Ficoll400	Serva
Glukose	Sigma
Glycerol	Serva
Hefeextrakt	Gibco
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T.Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
Natriumcarbonat	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol	J.T.Baker
Natriumacetat	AppliChem
Natriumazid	Sigma
Natriumbicarbonat	Sigma
Natriumcarbonat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumphosphat	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
α -Phosphorsäure	Sigma
Polybren	Sigma
Poly I:C	Sigma
Propidium Iodid zur Nukleinsäure Färbung	Molekular Probes

Rotiphenol/Chloroform	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure	Sigma
Sucrose	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin)	Sigma
TMB/Peroxid-Lösung	BD Pharmingen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton X 100	Sigma
Trypsin	Seromed
<i>Viagen Direct-PCR Tail</i>	Promega
Xylencyanol	Merck
Zelldissoziationspuffer (Trypsin-frei)	Sigma

5.1.10 Molekulargewichtsstandards

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

5.1.11 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma NEB bezogen:

Bam H I, *Bgl* II, *Cla* I, *Eco*R I, *Eco* R V, *Hind* III, *Kpn* I, *Mlu* I, *Nco* I, *Nhe* I, *Not* I, *Pac* I, *Pme* I, *Pvu* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sma* I, *Spe* I, *Xba* I, *Xho* I

<i>Calf intestinal phosphatase</i>	NEB
DNase, RNase frei	Promega
Klenow Polymerase	NEB
Kollagenase Typ 2	PAN-Biotech
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
RNase A, DNase frei	Boehringer
T4 DNA Ligase	NEB
<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>	Pharmacia

5.1.12 Peptide

Die Peptide wurden von Invitrogen (EvoQuest™ Custom Peptide) im kleinen (10 mg) Maßstab mit einer Reinheit von 95 % bezogen. Die Peptide waren am C- und N-Terminus unmodifiziert (freie Carbonsäure- bzw. Amingruppe). Die Darstellung ist vom N- zum C-Terminus wiedergegeben:

β -Gal H-2L ^d	TPHPARIGL (Peptidfragment 876-884 der β -Galaktosidase)
HA H-2K ^d	IYSTVASSL (Peptidfragment 518-526)

5.1.13 Kits

Adeno-X Rapid Titer Kit	Clontech
CellTrace™ CFSE Zellproliferationskit	Molecular Probes
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen
Herculase PCR-Kit	Stratagene
HotStar- <i>Taq</i> 2xMastermix	Qiagen
Kit zur Reversen Transkription	Applied Biosystems
Maus CD4 T-Zell Isolationskit (Negativselektion)	Miltenyi Biotec
Maus CD8 T-Zell Isolationskit (Negativselektion)	Miltenyi Biotec
peqGOLD RNAPure	Peqlab
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
Qiaquick-spin PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaquick-spin Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiaex II Kit	Qiagen
RNAse freies DNase Kit	Promega

5.1.14 Sonstiges Material und Geräte

96- well Platte Maxisorp	Nunc
96- well Rundbodenplatte für die Zellkultur	Nunc
Bakterienschüttler	Bühler
Bio Rad Protein Assay	Biorad
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Centrifuge-Tubes, Ultra-Clear™	Beckmann
Cryostat Microm HM 500 OM	Omega
Dialysekassetten	Pierce
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Greiner
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	BD
Durchflusszytometer „FACSCanto II“	BD
Durchflusszytometer „FACS-Aria“	BD
Fluorocan II	Titertek
Gel Doc 1000	Biorad

Genepulser II	Biorad
Heizblock	Eppendorf
HTS Multiscreen IP 96- well Platten	Millipore
IVIS Imaging System 200 Series	Wilovort
Kultur- und Zellkulturschalen	Greiner
Lumat	Berthold
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer	MWG
Neubauer-Zählkammer	Neolab
MACS-MS-Säulen und Zubehör	Miltenyi
Mikroskope	Wilovort
PCR-Thermozykler	Biometra
Rotoren (SW28i, SW32, JA-10, JA-20)	Beckmann
Spannungsquellen	Pharmacia, Gibco, Serva
Vortexer	Omnilab
Zellkulturflaschen (T25 und T75)	Greiner
Tischzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge 2 K 15	Sigma
Kühlzentrifuge GS-6G	Beckmann
Ultrazentrifuge LE-80K	Beckmann
Zellsiebe 40 µm Ø	Greiner

5.1.15 Standardpuffer und Medien

Nährmedien für die Zellkultur:

Alle Zelllinien nicht-lymphatischen Ursprungs (s. 5.1.1) wurden in DMEM + Glutamax (Fa. Gibco) versetzt mit 10 % (v/v) FCS sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Seromed) zur anti-bakteriellen Prophylaxe kultiviert. Für Infektionsversuche mit Adenoviren wurde DMEM mit 2 %-igem FCS-Anteil verwendet. Bei Zelllinien lymphatischen Ursprungs wurde in das Medium zusätzlich Natriumpyruvat (1mM, Fa. Gibco), nicht-essentielle Aminosäuren (Fa. Gibco) und β -Mercaptoethanol (50µM, Fa. Sigma) gegeben. Für die Primärzellkultur wurden identische Zusätze verwendet, aber auf Basis von RPMI 1640 (DC-RPMI).

Nährmedium für Bakterien:

LB-Medium:

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden auf 1000 ml mit ddH₂O aufgefüllt und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zur plasmidspezifischen Selektion erfolgte unmittelbar vor der Inkulturnahme.

SOC-Medium:

2 g Bacto-Tryptone, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g NaCl, 1 ml 1 M MgCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄ und 0,4 g Glukose wurden mit bidest H₂O auf ein Volumen von 100 ml gebracht und autoklaviert. Dieses Medium wurde zur Regeneration von Bakterien nach der Transformation verwendet.

LB-Agarplatten:

1 l LB-Medium wurde mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmid-positiver Klone wurde das erforderliche Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 50 °C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Standardpuffer:

PBS	10 mM Natriumphosphat pH 7,4 150 mM NaCl
FACS-Puffer	PBS mit 0,1 % BSA und 0,09 % NaN ₃
TAE (50x)	2 M TRIS, 0,1 M EDTA, 1,25 M Essigsäure
ELISA-Puffer	200 mM NaHCO ₃ 80 mM Na ₂ CO ₃
TE pH 8,0	10 mM Tris-HCL pH 8,0 1 mM EDTA
MACS-Puffer	PBS mit 0,5 % BSA, 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin 1 mM EDTA pH 8,0, 1 mM NaPyruvat (sterilfiltrieren)
Dialysepuffer	10 mM Tris pH 8,0, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl in bidest H ₂ O
Erythrozyten-Lysepuffer	0,1 M Ammoniumchlorid, 10 mM KHCO ₃ 1 mM EDTA (sterilfiltrieren)
HBS-Transfektionspuffer (2x)	50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,85-7,15 (per Transfektion optimieren) Lagerung bei 4°C (nicht einfrieren!)

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zellkultivierung

Die Zelllinien 293, 293T, Huh7, KLN205, Hepa1-6, Phönix-Amphos, EL4 – GM-CSF, DC2.4 und H1299 wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 12,5 ml DMEM versetzt mit 10% FCS (v/v), Penicillin und Streptomycin (0,1 mg/ml) (EL4–GMCSF und DC2.4 in 25 ml DC-DMEM) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Adhärente Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz des Zellrasens nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Dazu wurden 293, 293T, Hepa1-6, H1299 mit 1 ml 1xTrypsin für 2-5 min im Brutschrank inkubiert und anschließend durch Klopfen von der Flaschenwand abgelöst und in DMEM resuspendiert. Bei KLN205-Zellen wurde für die Trypsinierung 3xTrypsin verwendet. Bei 293T-Zellen wurde die Zellsuspension zur Zellvereinzelnung zusätzlich durch eine 27 G Kanüle gezogen. Die nicht-adhären Zellen EL4–GMCSF wurden gründlich resuspendiert und zur Passage 1/12 Volumen der Suspension in frisches Medium überführt. Das Medium der semi-adhären Zelllinie DC2.4 wurde bei einer Passage gesammelt, die verbleibenden adhären Zellen mit PBS gewaschen und mit 1xTrypsin trypsinisiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde der Zellrasen in Medium gesammelt und die Suspension bei 250g (10 min, RT) sedimentiert. Das Medium wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen.

Alle Zelllinien wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:8 mit frischem Medium verdünnt und in 250 ml Zellkulturflaschen ausgesät.

5.2.2 Herstellung von GM-CSF-haltigem Überstand

Zur Generierung von GM-CSF-haltigem Überstand werden $2 \cdot 10^7$ EL4 – GM-CSF Zellen in eine 250 ml Zellkulturflasche in 40 ml DMEM mit 10 % FCS ausgesät. Die Zellpopulation muss zu mindestens 80 % ein starkes GFP-Signal zeigen. Dies wurde vor der Kultivierung per FACS-Analyse überprüft. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h wird die Zellsuspension bei 300 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand gesammelt und bei 4 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 40 ml frischem Medium resuspendiert und erneut für weitere 24 h kultiviert. Der Überstand wird auf die gleiche Weise wie an Tag 1 gewonnen und mit diesem vereint. Es folgt eine Sterilfiltration des Überstands mit einem 0,22 µm Filter. Abschließend wurde der Überstand zu je 10 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Auftauter Überstand wurde maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert.

5.2.3 Zellkultivierung primärer dendritischer Zellen

Getöteten Mäusen wurden Femur und Tibia entnommen und anschließend Muskulatur und Gewebe vom Knochen entfernt. Die Gelenke wurden mit einer kleinen Schere abgetrennt und die Schäfte mit PBS mittels einer 27 G Kanüle durchspült. Die Knochenmarkszellen

wurden gesammelt und durch ein Zellsieb (40 µm Porengröße) gefiltert. Die Zellsuspension wird bei 300 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 15 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Es folgte nach 2 min Inkubation bei RT eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen.

Der Überstand wurde danach verworfen und das Pellet in DC-RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und $2\text{-}3\cdot 10^6$ Zellen in 3 ml DC-RPMI mit 50 µl GM-CSF-haltigem Überstand pro *well* in eine 6-*well* Platte ausgesät.

Nach zwei Tagen wurden 2 ml DC-RPMI-Medium mit 50 µl GM-CSF-haltigem Überstand pro *well* zur Kultur gegeben. An Tag 4 wurde das Medium abgesaugt und 3 ml DC-RPMI mit 50 µl GM-CSF-haltigem Überstand pro *well* zugegeben. An Tag sechs wurde erneut das Medium gewechselt und die Zellen mit Antigen beladen und aktiviert. An Tag sieben wurden die Zellen dann aufgereinigt und für Tierexperimente verwendet.

Applikation, verwendete Zellzahlen und Besonderheiten sind im Abschnitt „Immunologische Methoden“ zu den entsprechenden Versuchen aufgeführt.

5.2.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen zur Kryokonservierung wurden wie unter 5.2.1 beschrieben gelöst, in Medium aufgenommen und bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Einfriermedium (DMEM mit 50% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in 1 ml Fraktionen in Nunc-Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in einen Kryobehälter (Fa. Nalgene) mit Isopropanol bei -80°C eingefroren und nach 24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2.5. Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung kyrokonservierter Zellen wurden diese dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden dann langsam in 12 ml zellspezifischem Medium pipettiert, sedimentiert (250 x g, 10 min, RT) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde dann in 12,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt und kultiviert (siehe auch 5.2.1).

5.2.6 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitation

Die transiente Transfektion dient zur Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen durch Endozytose eines DNA-Calciumphosphat-Präzipitats.

Das Aussäen der Zellen erfolgt jeweils am Tag vor der Transfektion. Für die Herstellung von lentiviralen Vektoren wurden 293T in einer Dichte von $3\cdot 10^6$ in 10 cm Schalen in einem Volumen von 10 ml gegeben. Bei der Transfektion von Phönix-Ampho-Zellen für die

Generierung von Retroviren wurden $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einem Volumen von 3 ml in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Für die Transfektion wurde zunächst die DNA (5 µg DNA pro 6 cm Schale bzw. 16,4 µg DNA pro 10 cm Schale) in 150 µl sterilfiltrierte 0,25 M CaCl_2 -Lösung für 6 cm Schalen und 500 µl 0,25 M CaCl_2 -Lösung für 10 cm Schalen pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens von 2xHBS. Beide Lösungen wurden dafür raumtemperiert.

Nach der Mischung beider Lösungen wurde eine 2 ml Pipette in die Lösung getaucht, die Ausblase-Taste des Pipetus für etwa 20 s durchgedrückt und das Reaktionsgefäß dabei gedreht (blubbern). Nach dieser Zeit erschien die Lösung leicht milchig. 6 cm Schalen wurden mit einem Volumen von 300 µl Volumen transfiziert, 10 cm Schalen entsprechend mit 1 ml Volumen. Der gesamte Ansatz wurde leicht geschwenkt und dann im Brutschrank für 8 h oder über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und der Zugabe von frischem zellspezifischem Medium wurden die Zellen weiterhin im Brutschrank bis zur Ernte des jeweiligen angegebenen Zeitpunkt gehalten.

5.2.7 Luziferaseassay

Die Methode beruht auf der Oxidation von Luziferin katalysiert durch das Enzym Luziferase. Das durch die Reaktion emittierte Licht kann in einem Luminometer quantifiziert werden.

Die Aktivität von NF κ B in der stabil transduzierten Zelllinie DC2.4 wurde über die Aktivität der exprimierten Renilla-Luciferase quantifiziert, die unter der Kontrolle eines NF κ B-abhängigen Promotors stand. Dazu wurde das Renilla-Luciferase-Kit (Promega) verwendet. Am Vortag des Luziferaseassays wurden $1 \cdot 10^6$ transgene Zellen DC2.4 in 6 cm-Schalen ausgesät und morgens mit den entsprechenden Agenzien stimuliert. Zum Ernten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das PBS anschließend gründlich entfernt. Die Lyse erfolgte mit 200 µl Renilla Luciferase Assay Lyse Puffer, das Zelllysate wurde nach 10 min Inkubation aus der Schale abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein Zyklus Einfrieren und Auftauen der Proben in flüssigem Stickstoff erhöht die Sensitivität des Assays beträchtlich. Das Zelllysate wurde nach der Behandlung mit flüssigem Stickstoff und ausgiebigen Vortexen in der Tisch-Kühlzentrifuge bei 25000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert; 20 µl des Überstands wurden in 100 µl frisch angesetztem Luziferase Assay Puffer für die Luziferasemessung eingesetzt. Die Herstellung der Puffer erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

5.2.8 Herstellung von Milz- und Lymphknoteneinzellsuspensionen

Für die Durchführung von FACS-Analysen und immunologischen Assays sind Einzelzellsuspensionen notwendig. Die Gewinnung muriner Lymphozyten erfolgte aus der Aufarbeitung der axillären und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz.

Milz und Lymphknoten getöteter Mäuse wurden weitestgehend von Fettgewebe befreit und durch ein Zellsieb mit 40 µm Durchmesser (Greiner) gedrückt. Unter Zugabe von PBS wurde

dieser Vorgang bei der Milz bis zur vollständigen Passage fortgeführt. Bei Lymphknoten wurden 10 ml PBS verwendet. Um die Bildung von Aggregaten zu vermeiden, wurden die Proben vor der Zentrifugation noch einmal kräftig geschüttelt, anschließend zentrifugiert (8 min, 250 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Erythrozyten wurden mit Erythrozyten-Lyse-Puffer unter Auf- und Abpipettieren zerstört (für Lymphknoten bzw. pro Milz 10 ml) und dann sofort zentrifugiert (8 min, 250 x g, 4 °C). Der Überstand wurde rasch entfernt, das Pellet wurde in 10 ml FACS-Puffer oder RPMI-Medium aufgenommen und nochmals mit einem 40 µm-Zellsieb gefiltert. Die so hergestellte Einzelzellsuspension konnte dann für die FACS-Analyse oder Kultivierungsassays verwendet werden. Zur Zählung der Milzzellen wurde die Suspension gegebenenfalls noch mit entsprechender Lösung verdünnt.

5.2.9 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation ist eine Methode, um definierte Populationen aus einer Zellsuspension anzureichern. Dazu wird die Zellsuspension mit paramagnetischen Kügelchen behandelt, die mit Antikörperfragmenten einer bestimmten Spezifität, meist gegen einen Oberflächenrezeptor, beschichtet sind. Überschüssige kolloidale Kügelchen können durch Waschen entfernt werden. Anschließend wird die Zellsuspension in eine Matrix gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Markierte Zellen werden so zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ungehindert passieren können. Die gewünschten Zellen können durch Entfernen des magnetischen Feldes gewonnen werden, indem sie dann von der Matrix eluiert werden.

Zur Negativselektion werden alternativ Streptavidin-beschichtete Kügelchen als Sekundärreagenz verwendet, nachdem die ungewünschten Zellen mit einer Kombination von diversen Biotin-markierten Antikörpern behandelt wurden. Die Zielzellen werden anschließend dem primären Eluat der Säule entnommen.

Mit dieser Methode wurden im Rahmen der Arbeit aus Einzelzellsuspension der Milz von transgenen Mäusen des Stammes C14 auf Balb/c Hintergrund CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das H2-K^d beschränkte Peptidepitop IYSVASSL per Negativselektion separiert. Dazu wurde das Maus-CD8a⁺ T-Zell Isolationskit von Miltenyi Biotech zusammen mit dem Mini-MACS-System (MS-Säulen). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden nach der Aufreinigung gewaschen, gezählt und für den adoptiven Transfer verwendet.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Extinktion der DNA-Lösung wird zur photometrischen Konzentrationsbestimmung bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 37 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Durch die Messung der Extinktion der Lösung bei 280 nm konnte durch das Verhältnis E_{260}/E_{280} zusätzlich die Reinheit abgeschätzt werden. Der Quotient liegt bei geringer Verunreinigung der DNA bei 1,8-1,9, bei RNA zwischen 2-2,1.

5.3.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Methode der Agaroseelektrophorese wird zur Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten verwendet. Die Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Daher lassen sie sich in einer im elektrischen Feld befindlichen Agarose-Gelmatrix ihrer Größe nach auftrennen. Durch Ethidiumbromidfärbung werden die Nukleinsäurefragmente unter UV-Licht visualisiert, dabei fluoresziert interkaliertes Ethidiumbromid intensiv orange. Sowohl für analytische als auch für präparative Agarosegelelektrophoresen wurden 0,8-2%-ige Gele in TAE-Puffer mit einer 1/50000 Vol-Verdünnung Ethidiumbromid (10 mg/ml) verwendet. Die DNA-Proben wurden zuvor mit 0,1 Vol 10xLadepuffer versetzt, bevor diese auf das Agarosegel aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm in TAE als Laufpuffer.

10xDNA-Ladepuffer

20 % (w/v) Ficoll400

0,1 M EDTA, pH 8,0

1 % SDS

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

0,25 % Xylencyanol FF (w/v)

5.3.3 Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA

5.3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine frische Bakterienkultur wurde in 25 ml LB-Medium bei 37 °C und 240 rpm über Nacht kultiviert. 500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml der Übernachtskultur angeimpft und auf zwei sterile 1 l Erlenmeyerkolben zu je 250 ml portioniert und bis zu einer OD_{600} von 0,45-0,55 bei 37 °C und 240 rpm angereichert. Die Bakteriensuspension wurde zwei Stunden in Eiswasser inkubiert und anschließend 20 min bei 4 °C und 3800 rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor

JA-10) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem Titrationspuffer resuspendiert. Das Volumen wurde mit Titrationspuffer auf 500 ml aufgefüllt und 45 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 4 °C und 3200 rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA-10) abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem Titrationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde unter Rühren tropfenweise mit 80 %igem Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt. Die Bakterien wurden aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Titrationspuffer

100 mM CaCl₂

70 mM MgCl₂

40 mM Natriumacetat, pH 5,5

5.3.3.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine frische Bakterienkultur wurde in 10 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Zellsuspension wurde am folgendem Morgen 500 ml LB-Medium, verteilt auf zwei 1 l Erlenmeyerkolben, beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,8 kultiviert. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugationsröhrchen überführt und 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 10 min bei 2600 x g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet durch Resuspendieren in 500 ml eiskaltem WB-Puffer (10 % Glycerol in ddH₂O) gewaschen und erneut zentrifugiert (30 min, 2600 x g, 4 °C). Der Waschvorgang wurde wiederholt und nach der Zentrifugation der Überstand bis auf 2,5 ml abgegossen. Die Zellen wurden abschließend darin resuspendiert, zu je 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.3.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Es wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 15 µl Ligationsansatz bzw. 10 ng zirkulärer Plasmid-DNA gut vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C für 90 s durchgeführt und danach 2 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde mit 900 µl SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm im Heizblock geschüttelt. 100 µl des Transformationsansatzes wurde auf einer LB-Agarplatte, welche die den Resistenzgenen der jeweiligen Plasmide entsprechenden Antibiotika enthielt, ausgestrichen. Die restliche Bakteriensuspension wurde für 12 s bei 16200 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand bis auf 150 µl verworfen, das Pellet resuspendiert und auf einer weiteren Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden umgedreht über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

5.3.3.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

(Dower et al., 1988)

Insbesondere große Plasmide wie z.B. Adenovirusplasmide zeigen bei chemisch kompetenten Bakterien eine äußerst geringe bis keine Transformationseffizienz. Das Verfahren der Elektroporation ermöglicht eine deutliche Effizienzsteigerung. Hierzu wurden 1 bis 2 μl der DNA (5-100 ng in H_2O) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, die elektrokompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut und 40 μl der Zellsuspension zur DNA gegeben. Durch einmaliges Auf- und Abpipettieren wurde gemischt und nach 1 min wurden die Bakterien in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Die physikalischen Parameter für die Elektroporation betragen 1800 V, 25 μF und 200 Ω Parallelwiderstand. Nach dem Puls wurde sofort 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aliquots der Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit der notwendigen Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.3.3.5 Vermehrung transformierter Bakterien

Bakterien von einem Klon auf der Agarplatte oder 50 μl einer Bakteriensuspension wurden als Vorkultur (3 ml LB-Medium + Antibiotikum) bei 37 °C über Nacht im Bakterienschüttler bei 240 rpm inkubiert. Als 1,5 ml der entstandenen Bakteriensuspension konnte eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt werden. Für eine Maxi-Plasmidpräparation wurden 500 μl der Vorkultur in ein Volumen von 400 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 240 rpm in Bakterienschüttler inkubiert. Midi-Plasmidpräparationen wurden analog der Maxi-Plasmidpräparation mit einem Volumen von 200 ml LB-Medium durchgeführt.

Antibiotika

Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ final

Kanamycin 10 $\mu\text{g/ml}$ final

5.3.3.6 Analytische Plasmidpräparation

Diese Methode wurde verwendet, um einzelne, transformierte Bakterienklone durch nachfolgenden Restriktionsverdau der präparierten Plasmid-DNA schnell überprüfen zu können. Die mit Hilfe dieser Methode isolierte DNA ist relativ stark verunreinigt. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in einem Gefäß überführt und 1 min bei 25000 x g zentrifugiert. Bis auf einen geringen Rest von ca. 50 μl wurde der Überstand dekantiert und das Pellet resuspendiert. Dann wurden 300 μl STET-Puffer zugegeben, mit 10 μl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 90 s bei 95 °C erhitzt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 25000 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge wurde das Pellet mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt, der Überstand mit 400 μl Isopropanol versetzt und geschwenkt, um die DNA zu fällen. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min, 25000 x g, 4 °C pelletiert und

anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde die Waschflüssigkeit abgenommen, die DNA 20 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

STET-Puffer

50 mM Tris, 50 mM EDTA

8 % Sucrose

0,5 % Triton X 100

5.3.3.7 Aufreinigung geringer DNA-Mengen

Die schnelle Aufreinigung geringer Mengen an DNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification- bzw. dem QIAquick Nucleotide Removal Kit der Fa. Qiagen. DNA-Fragmente von 17-100 bp wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit, DNA-Fragmente von 100 bp bis 10 kb wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Hierdurch konnten schnell bis zu 10 µg DNA in hoher Reinheit gewonnen werden. Zu 1 Vol DNA-Lösung wurden 5 Vol Puffer PB (PCR-Purification) bzw. 10 Vol Puffer PN (Nucleotide Removal) hinzugefügt. Die Lösung wurde auf eine QIAquick-Säule gegeben und für 30 s bei der vom Hersteller angegebenen Drehzahl in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und nachfolgende Zentrifugation (s.o.) gewaschen. Danach konnte die DNA mit dem gewünschten Volumen EB (Tris pH 8,5) eluiert werden.

5.3.3.8 Präparative Plasmidpräparation (Maxi/Midi-Präp.)

Präparative Plasmidpräparation wurden mit den Plasmid Maxi bzw. Midi Kit sowie dem EndoFree Buffer Set der Firma Qiagen nach einer modifizierten Version des Hersteller-Protokolls zur endotoxinfreien DNA-Präparation durchgeführt. Die Verwendung endotoxinfreier DNA erhöht bei Transfektionsexperimenten die Effizienz des Transfers erheblich.

Die Übernachtskultur wurde bei 3800 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 10 bzw. 6 ml P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 bzw. 6 ml wurde durch mehrmaliges Schwenken des Zentrifugationsröhrchens gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 bzw. 6 ml P3, der Ansatz wurde wie oben beschrieben gemischt, 20 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Gaze in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert, mit 2,5 bzw. 1 ml ER-Puffer versetzt und geschüttelt. Danach wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Plasmidlösung wurde auf eine mit 10 bzw. 6 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen tip-500 bzw. tip-100 Säule aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 30 bzw. 10 ml QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 bzw. 5 ml QF eluiert. Das Eluat (15 bzw. 5 ml) wurde mit 10,5 bzw. 3,5 ml

Isopropanol versetzt, gemischt und sofort 30 min bei 13000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 5 bzw. 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde an der Luft maximal 30 min lang getrocknet und anschließend in 500 bzw. 100 µl TE aufgenommen.

Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte wie in 5.4.1 beschrieben. Die DNA-Lösung wurde bei jeder Präparation auf 1 µg/ml eingestellt. Die Ausbeute an Plasmid-DNA lag bei dieser Aufarbeitungsmethode bei 400-1500 µg bzw. 100-300 µg.

5.3.3.9 Isolierung von RNA und Herstellung von cDNA

Durch die Isolierung von RNA und anschließende reverse Transkription der RNA in cDNA lassen sich mittels PCR Gene klonieren und die Expressionsstärke von mRNA quantitativ bestimmen.

Die RNA wurde aus etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen mit peqGOLD RNAPure (Peqlab), einer Säulen-freien und optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, nach dem Standardprotokoll des Herstellers isoliert. Die aufgereinigte und gewaschene RNA wurde in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (s. 5.4.1).

Die reverse Transkription der RNA wurde mit dem *Taqman-Reverse-Transcription-Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurde ein 100 µl-Ansatz mit 2 µg RNA gewählt. Der Ansatz wurde mit folgenden Endkonzentrationen angesetzt:

1x TaqMan RT Buffer
5.5 mM MgCl₂
2000 µM dNTPs-Mix (500 µM pro dNTP)
2.5 µM Oligo dT
0,4 U/µl RNase Inhibitor
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (1.25 U/µl)
2 µg RNA
in 100 µl Gesamtvolumen

Nach der reversen Transkription wurde die cDNA (20 ng/µl) direkt für die präparative bzw. analytische PCR eingesetzt.

5.3.3.10 Konservierung der Bakterienklone

Zur Konservierung der Bakterienklone wurden 800 µl einer Übernachtskultur entnommen, mit 200 µl Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren. Dadurch war jederzeit schnell eine Amplifikation des gewünschten Plasmids möglich.

5.3.4 Rekombinante DNA-Techniken

5.3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen. Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmente wurden bei 37 °C (Ausnahme *Sma* I bei 25 °C) in dem mitgelieferten Restriktionspuffer (NEB 1 bis 4 bzw. enzymespezifischer Spezialpuffer) nach Herstellerangaben inkubiert. Bei präparativen Restriktionen wurde die jeweils einzusetzende Menge an Enzymeinheiten (Units) nach folgender Regel abgeschätzt: 1 U eines Enzyms schneidet 1 µg DNA in einer Stunde. Das Enzym sollte in 3 bis 4-fachem Überschuß vorliegen und das Volumen der Enzymlösung maximal ein Zehntel des Gesamtvolumens betragen. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Restriktionsenzym bei Bedarf durch eine 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

5.3.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die betreffende Bande ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung des Qiaex II Kits der Firma Qiagen, wobei das Herstellerprotokoll ohne Abweichung befolgt wurde.

Die zu isolierende DNA-Bande wurde aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, das Gelstück wurde gewogen und mit 300 µl QG/100 mg Gel versetzt. Anschließend wurde bei 50 °C bis zur vollständigen Auflösung der Gelstücks im Heizblock geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand auf eine QIAquick Säule aufgetragen und wie unter 5.4.3.7 beschrieben aufgereinigt.

5.3.4.3 Auffüllen von 5'-Überhängen und Verdau von 3'-Überhängen durch das große Klenow-Fragment

Das Auffüllen überstehender 5'-Enden von DNA-Fragmenten erfolgte durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit, 5'-Überhänge aufzufüllen und 3'-Überhänge abzdauen, es besitzt jedoch keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität. Nach einem Restriktionsverdau erhaltene 5'-DNA-Überhänge wurden durch Inkubation von 1 µg linearisierter Plasmid-DNA bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml mit 2 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Gegenwart von dNTPs (je 33 nM) für 15 min bei 28 °C in NEB-Puffer 2 aufgefüllt. Während der Inkubation erfolgt auch ein Abbau von 3'-Überhängen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA abgestoppt und die Polymerase durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

5.3.4.4 Dephosphorylierung von 5'-Enden der linearisierten Vektoren

Um bei Ligationsreaktionen zu verhindern, dass linearisierte, bzw. restringierte Vektoren inter- oder intramolekulare Reaktionen mit sich selbst eingehen, wurde die Vektor-DNA im Anschluss an den Restriktionsverdau vor der Ligation mit *shrimp alkaline phosphatase* (SAP)) behandelt.

1 µg linearisierter Vektor wurde mit 1 Unit SAP für 60 min bei 37 °C dephosphoryliert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase für 20 min bei 75 °C und die Aufreinigung der DNA über eine Säule.

5.4.4.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Gleiche Mengen komplementärer DNA-Einzelstränge (jeweils 5 µg) wurden mit H₂O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und für 5 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt. Danach erfolgte eine langsame Abkühlung zum Zusammenlagern der beiden Einzelstränge bis auf RT über etwa 3 h. Der Ansatz wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

5.3.4.6 Ligation von DNA-Enden

Die Ligationstechnik dient der Verknüpfung homolog-kohäsiver (*sticky ends*) bzw. stumpfer Enden (*blunt ends*) von DNA-Fragmenten. Die hierzu notwendige DNA-Ligase ist ein wichtiges Reparaturenzym für aufgebrochene Phosphodiesterbindungen in der DNA. Bei Klonierungsexperimenten kann diese Eigenschaft des Enzyms dazu genutzt werden, DNA-Moleküle *in vitro* miteinander zu verknüpfen. Die hierbei am häufigsten eingesetzte Ligase ist die T4-DNA-Ligase. Sie lässt sich aus *E. coli*-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurde, isolieren. Obwohl das Enzym am effektivsten homolog-kohäsive Enden verbindet, ist es unter bestimmten Bedingungen in der Lage, stumpfe Enden miteinander zu verknüpfen. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 37 °C, dennoch wird es für Ligationen bei niedrigen Temperaturen eingesetzt, um die gegenseitige Anlagerung der DNA-Fragmente aneinander zu erleichtern. Ligationen wurden in T4-DNA-Ligase-Puffer durchgeführt.

5.3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente wurden 10 bis 50 ng cDNA 10 bis 100 pmol Primer, 2xHotstar *Taq*-Polymerase Mastermix (Qiagen) oder 5 U Herculase (Stratagene) und 200 mM dNTPs in einem Volumen von 20 bis 100 µl in 1x PCR-Puffer (bei Verwendung von Herculase) gemischt. Bei PCR-generierten DNA-Fragmenten für die Klonierung wurde Herculase verwendet, bei analytischer PCR die Hotstar *Taq*-Polymerase. In einem

Thermocycler wurden 25 bis 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Zur Aktivierung der Polymerase wurde einleitend ein Schritt bei 95 °C für 5 min vorangestellt. Die Denaturierungs- und *Annealing*-Dauer betrug je 30 s. Die *Annealing*-Temperatur wurde so gewählt, dass sie 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer lag. Pro kb Amplifikationslänge wurde eine Minute Polymerisation bei 72 °C veranschlagt.

Bei Verwendung degenerierter Primer zum Anhängen von Restriktionsschnittstellen an ein DNA-Fragment) wurden 5 Zyklen mit einer dem homologen Teil entsprechenden *Annealing*-Temperatur vorgeschaltet. Anschließend erfolgten 25-30 Zyklen bei einer dem gesamten Primerbereich entsprechenden *Annealing*temperatur. Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern =20 bp erfolgte nach folgender Formel

$$T_M = 2 \text{ °C} \times (\text{AT}) + 4 \text{ °C} \times (\text{GC})$$

Für Primer =20 bp galt

$$T_M = 59,8 \text{ °C} + 0,41(\%GC) - 675/N \quad (\text{mit } N = \text{Primerlänge (bp)})$$

5.4. Immunologische Methoden

5.4.1 ELISpot

Zur Detektion und Quantifizierung einzelner IFN- γ -sezernierender Zellen wurde ein ELISpot durchgeführt. Dazu wurde eine 96-*well* Platte HTS Multiscreen IP für 10 min mit 35 % Ethanol aktiviert und anschließend 3x mit 300 μ l PBS gewaschen. Danach wurde die Platte mit dem Antikörper (anti-Maus-IFN- γ , Klon AN-18) in einer Konzentration von 7,5 μ g/ml in 100 μ l ELISA-Puffer pro *well* über Nacht bei 4 °C beladen. Nach der Inkubation wurde einmal mit 300 μ l PBS gewaschen und die *wells* mit 300 μ l RPMI Medium mit 10% FCS für mindestens 90 Minuten geblockt.

Eine Einzelzellsuspension mit einer Zellzahl zwischen $2 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^5$ Zellen wurde in 100 μ l RPMI Medium mit 10% FCS pro *well* auf die Platte gegeben. Für jeden Wert wurde eine Achtfachbestimmung durchgeführt. Für die Kontrolle wurden die Zellen nicht stimuliert, die Peptidstimulation erfolgte durch Zusatz von 1 μ g/ml des angegebenen Peptids. Für die Stimulation mit Adenovirus wurde eine MOI von 100 verwendet. Bei Verwendung von Gesamtzelllysate für die Stimulation wurde dieses aus etwa $4 \cdot 10^7$ Zellen in 3 ml PBS nach drei Zyklen einfrieren/auftauen in flüssigem Stickstoff präpariert, Debris durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 500 g) und der Überstand sterilfiltriert. Davon wurden 10 μ l zur Stimulation eingesetzt, was etwa einem Äquivalent von $1 \cdot 10^5$ lysierten Zellen entspricht.

Die Auswertung erfolgte nach 48 h. Dazu wurde das Medium entfernt und die *wells* mit Leitungswasser mehrmals gewaschen, um alle Zellen zu entfernen. Der Biotin-konjugierte Antikörper anti-Maus-IFN- γ (Klon R4-6A2) wurde in FACS-Puffer in einer Konzentration von 1 μ g/ml verdünnt und in jedes *well* 100 μ l der Verdünnung gegeben. Nach 1,5 h bei RT auf dem Schüttler wurde zweimal für 5 min mit 300 μ l PBS pro *well* gewaschen.

Das HRP-Avidin-Konjugat wird in FACS-Puffer mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml angesetzt und 100 µl davon in jedes *well* pipettiert. Es wird erneut 1 h auf dem Schüttler inkubiert und anschließend viermal für 5 min mit 300 µl PBS gewaschen. Die Entwicklung erfolgt mit 100 µl DAB-Substrat bis zur deutlich sichtbaren Entstehung der „Spots“. Die Reaktion wird gestoppt, indem mit Leitungswasser gut gespült wird und die Platte danach für 10 min gewässert wird. Nach dem Trocknen werden die Punkte quantifiziert.

5.4.2 Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer

Alle Antikörper und sekundären Färbereagenzien wurden von eBioscience bezogen, falls nicht anders angegeben.

Für die Zellfärbung wurden $1-2 \cdot 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben, die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer für die Färbung resuspendiert. Bei Lymphozyten oder bei primären dendritischen Zellen, wurden die Proben vor der Färbung mit FC-Block für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde direkt der primäre Antikörper in der Konzentration nach Empfehlung des Herstellers zugegeben und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Bei Sekundärfärbungen mit biotinylierten Antikörpern wurde nach dem Waschen der Primärfärbung mit 1 ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (250 x g, 5 min, 4 °C; Überstand verwerfen) die Sekundärfärbung in 100 µl FACS-Puffer mit Streptavidin-Fluoreszenzkonjugat für 20 min bei folgenden Verdünnungen gefärbt: SA-FITC, SA-PerCP-Cy5.5 und SA-PerCP 1:100, SA-PE 1:200, SA-APC 1:500.

Bei Bedarf einer intrazellulären Färbung wurden die Zellen nach der Färbung der äußeren Membran fixiert und permeabilisiert und dann intrazellulär gefärbt. Dazu wurde das Kit Cytofix/Cytoperm nach Angaben des Herstellers verwendet.

Vor der FACS-Analyse wurden die Proben zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen, in 350 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse im Dunkeln auf Eis aufbewahrt.

Die Proben wurden mit dem Gerät FACS-Calibur aquiriert und mit der Cell-Quest Software ausgewertet. Alternativ wurden die Proben mit dem Gerät FACS-Cantoll und der Software FACS-Diva analysiert.

5.4.3. Durchflusszytometrische Zellsortierung

Lentiviral transduzierte DC2.4 mit CD90 als Reporter gen bzw. schwach retroviral transduzierte Zellen mit GFP-Reporter wurden mit Hilfe der präparativen durchflusszytometrischen Zellsortierung angereichert. Die Anreicherung erfolgte mit dem Gerät FACS-Aria in der zentralen Einrichtung der MHH. Etwa $36 \cdot 10^7$ Zellen mit CD90-Reporter wurden mit 6 µg PE-markierten Antikörper für 20 min bei 4 °C gefärbt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch ein Zellsieb (40 µm Siebgröße) in 5 ml FCS-freiem Medium gefiltert und bis zur Sortierung auf Eis gelagert. Nach einmaliger Sortierung lag der Anteil positiver Zellen zwischen 30 bis 90 %. Nach einem weiteren Sortiervorgang waren die Zellen mindestens zu 98 % positiv für das entsprechende Reporter gen.

5.4.4 ELISA

Zur relativen Quantifizierung der humoralen anti-Adenovirus Immunantwort aus Mausserum wurde ein ELISA durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-well Platte (Maxisorp, Nunc) $1 \cdot 10^9$ adenovirale Partikel/well in ELISA-Puffer über Nacht inkubiert. Die Partikel wurden durch UV Bestrahlung mit dem Gel Doc für 30 min inaktiviert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen und die wells mit 300 μ l 4%iger Magermilchlösung in PBS für zwei Stunden geblockt.

Ausgewertet wurden Dreifachwerte des Serums einer Verdünnungsreihe über acht Stufen in PBS mit 2% Magermilchpulver von 1:250 bis 1:32000. 100 μ l/well wurde für zwei Stunden auf einem Schüttler bei RT inkubiert und zweimal mit PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. 120 μ l des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (2% Magermilchpulver in PBS) wird in jedes well gegeben und für mindestens 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert (Verdünnungen: Ziege anti-Maus IgG/IgM (Zymed, Invitrogen) 1/3000), Ratte anti-Maus IgG1 (Zymed, Invitrogen) 1/500, Ratte anti-Maus IgG2a (Zymed, Invitrogen) 1/500).

Abschließend wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und ein weiteres mal für zehn Minuten.

Die Entwicklung erfolgte mit 150 μ l TMB/Peroxid-Lösung/well bis sich eine leichte Blaufärbung einstellte. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 50 μ l 1M Phosphorsäure, dabei wurden alle wells mit identischer Zeitdauer entwickelt.

Vier wells wurden ohne Sekundärantikörper als Nullkontrolle verwendet und als Serumkontrolle wurde das Serum einer naiven Maus für Adenovirus Typ 5 eingesetzt.

Gemessen wurde die Extinktion der wells bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät, die gegen den Nullwert korrigierten Werte wurden dann mit der Software GraphPad-Prism (GraphPad) ausgewertet.

5.4.5 Titration neutralisierender Antikörper gegen Adenoviren

Die Titration der neutralisierenden Antikörper (nAk) dient zur Bestimmung der Fähigkeit Adenoviren mittels Antikörper unschädlich zu machen. Die Quantifizierung erfolgt aus Serum-Verdünnungsreihen der Versuchstiere.

Am Vortag des Assays wurden $2 \cdot 10^4$ 293 Zellen pro well in einem Volumen von 200 μ l in einer 96-well Rundbodenplatte ausgesät.

Die Faktoren des Komplementsystem aller Seren wurde durch Erhitzen auf 56 °C für 15 min zerstört und darauf hin eine serielle Verdünnungsreihe (finaler Verdünnungsfaktor 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600) in 1,5 ml Reagiergefäßen erstellt. Die Verdünnungen wurden in einem Volumen von 500 μ l 2 %-iges D-MEM Medium mit AdLacZ (MOI 25 pro well) für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde das Medium der 293 Zellen aus der 96-well Platte entfernt und die Serum/AdLacZ Proben in Doppelwerten in die wells pipettiert. Nach einer Inkubation von 24 h wurde der Überstand verworfen, vorsichtig mit 250 μ l PBS gewaschen und abschließend eine β -Gal Färbung der Proben durchgeführt.

Dazu wurden in die *wells* je 100 µl Extraktions-Puffer gegeben und 20 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert, um Zelldebris abzutrennen. Der Überstand wurde für die β-Gal-Färbung eingesetzt. Je 10 µl des Zelllysats wurden dann in eine neue 96-*well* Rundbodenplatte gegeben und mit 150 µl β-Gal-Reaktionslösung versetzt. Nach leichter Gelbfärbung wurde die Reaktion mit Zugabe von 50 µl 1 M Natriumcarbonatlösung abgestoppt und im Anschluss die Färbung bei 405 nm im Photometer gegen den Referenznullwert (Hintergrundfärbung durch uninfizierte Zellen) gemessen. Der Maximalwert entsprach AdLacZ infizierten Zellen, ohne Serumbehandlung. Der nAk-Titer wurde als der inverse Wert definiert, der eine mindestens 50 %-ige Inhibition erzielt.

β-Gal-Reaktionslösung:

60 mM Na₂HPO₄

10 mM KCl

1 mM MgSO₄

2 mM DTT (frisch)

1 mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, frisch)

5.4.6 Präparation von Tumorantigenen für dendritische Zellen

Für die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen Tumorantigene im Rahmen einer Vakzinierung durch dendritische Zellen ist es notwendig, dass diese Antigene zuvor von Zellen aufgenommen werden.

Zur Bereitstellung von Tumorantigenen für dendritische Zellen gibt es zwei Alternativen. Einerseits kann antigenspezifisch mit lediglich einem einzigen Antigen in Form eines Peptids beimpft werden oder es wird mittels Tumorlysats das ganze Antigen-Spektrum eines Tumors zur Verfügung gestellt.

Zur antigenspezifischen Vakzinierung wurde das in DMSO gelöste Peptid (2 µg/µl, Reinheit $\geq 95\%$) auf einer Konzentration im Kulturmedium von 0,5 µg/ml verdünnt.

Das Tumorzelllysats wurde aus etwa $4 \cdot 10^7$ Zellen in 3 ml PBS nach drei Zyklen Einfrieren/Auftauen in flüssigem Stickstoff präpariert, Debris durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 4 °C, 500 x g) und der Überstand sterilfiltriert. Bei der Verwendung von Tumorlysats wurden 100 µl des Lysats pro *well* eingesetzt, was etwa $1 \cdot 10^6$ lysierten Zellen entspricht.

5.4.7 Beladung von dendritischen Zellen mit Tumorantigen

Am Ende des sechsten Kultivierungstages einer Knochenmarkskultur zur Generierung von dendritischen Zellen (s. Kap. 5.3.2) wurde das Medium aus den 6 *well* Platten vorsichtig abgenommen, verworfen und durch 3 ml DC-RPMI 1640 ersetzt, welches mit 50 µl GM-CSF haltigem Überstand, antigenspezifischem Peptid (0,5 µg/ml) bzw. 100 µl Tumorlysats pro *well* versetzt wurde. Zur Aktivierung der dendritischen Zellen wurde, zusammen mit dem Antigen, noch 1 Poly I:C µg/ml zugegeben.

Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen des Überstands gesammelt und die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-freiem Zelldissoziationspuffer von der Platte gelöst und mit den Zellen des Überstands vereint.

Die Aufreinigung der dendritischen Zellen erfolgte über magnetische Zellseparation mit CD11c-Microbeads über eine MACS-Säule nach Angaben des Herstellers. Nach der Aufreinigung der Zellen wurden diese gezählt und für die Vakzinierung im Rahmen der Tierexperimente eingesetzt (s. Kap. 5.6).

5.4.8 Isolierung von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Zur Charakterisierung von Lymphozyten in der FACS-Analyse werden diese aus s.c. Tumoren der Maus isoliert.

Das Tumorgewebe zuvor getöteter Mäuse wurden in 6 cm-Schalen zusammen mit 4 ml Kollagenaselösung vom Typ 2 (2 mg/ml) auf Basis von PBS gegeben und mit Hilfe von Skalpell und Pinzette zerkleinert. Die Schale wurde daraufhin bei 37 °C im Schüttler bei 90 rpm für eine Stunde inkubiert und anschließend die Lösung mit einer 5 ml Pipette wiederholt auf- und abpipettiert, um verdaute Zellklumpen noch weiter zu lösen. Die Zelllösung wurde dann durch ein Zellsieb (40 µm) gegeben und mit etwa 20 ml PBS gewaschen. Die Erythrozyten wurden nach einer Zentrifugation (350 rpm, 5 min, RT, Überstand verworfen) mit 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer zerstört und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS aufgenommen und auf einen Ficollgradienten aufgetragen und zentrifugiert (30 min, 300 x g, RT). Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen, in FACS-Puffer verdünnt, erneut mit einem Zellsieb gefiltert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach weiterem Waschen wurden anschließend die Antikörperfärbungen durchgeführt.

5.5. Virale Arbeitstechniken

5.5.1 Herstellung und Titrierung lentiviraler Partikel

5.5.1.1 Transfektion der Verpackungszelllinie 293T

Am Vortag der Transfektion wurden $3-4 \cdot 10^6$ 293T-Zellen in einem Volumen von 10 ml in je fünf 10-cm Schalen pro lentiviralen Vektor gegeben. 10 min vor der Transfektion wurde 1 µl Chloroquin-Lsg (50 µM/ml) pro ml Medium zur Zellkultur gegeben. In ein 15 ml-Reaktionsgefäß wurde 2,55 ml CaCl₂-Lösung (0,25 M in ddH₂O, sterilfiltriert) vorgelegt und folgende Plasmide zugegeben:

- 40 µg Lentivirus-Vektor
- 20 µg pMDL g/p RRE
- 12 µg pMD2.G
- 10 µg pRSV-Rev

Die Methode der Transfektion wurde wie in Kap. 5.2.4 beschrieben durchgeführt. Nach sechsständiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit einem Volumen PBS gewaschen und dann mit 10 ml Kulturmedium mit 2% FCS versetzt.

Der Überstand wurde nach 24 h gesammelt, evtl. auftretende nicht-adhärenente Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (300 x g, 8 min) und wieder in die Schalen mit 10 ml frischem Kulturmedium mit 2 % FCS zurückgegeben. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert. Nach weiteren 24 h wurde der Vorgang wiederholt, die Zellen jedoch verworfen und der Überstand vereinigt.

5.5.1.2 Aufkonzentrieren der lentiviralen Partikel durch Ultrazentrifugation

Das lentivirushaltige Medium wurde sterilfiltriert (0,44 µm Porengröße) und durch Ultrazentrifugation im SW32-Rotor bei 15.000 rpm für 90 min bei 10 °C aufkonzentriert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium bis auf ein Restvolumen von 2,5 ml in allen Rörhchen abgenommen und verworfen. Darin wurden die lentiviralen Partikel resuspendiert, indem wiederholt die Flüssigkeit mit einer Pipette über den Boden des Zentrifugenrörhchens gespült wurde. Nach einigen Minuten wurde das Medium in das nächste Zentrifugenrörhchen überführt und der Vorgang wiederholt.

Nach vollständiger Resuspension aus allen Zentrifugenrörhchen wurde der infektiöse Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei -80°C gelagert.

5.5.1.3 Bestimmung des Titers lentiviraler Partikel

Zur Bestimmung des Titers lentiviraler Partikel wurde in eine 24-*well* Platte die Zelllinie H1299 in einer Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ in 1 ml Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde in einer 24-*well* Platte ein Aliquot des Lentivirusvektors titriert, dazu wurde der infektiöse Überstand aufgetaut und auf die Zellen gegeben.

Ein *well* blieb zur Kontrolle uninfiziert, in weitere *wells* je 2 µl, 10 µl und 50 µl infektiöser Überstand gegeben. Drei Tage nach Infektion wurde die Reporterexpression mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt. Bei GFP-Expression wurden die Zellen direkt für die FACS-Analyse vorbereitet. Bei CD90-Expression wurden die Proben nach dem Waschen mit Trypsin behandelt (CD90 ist Trypsinverdau-resistent) und nach erneutem Waschen mit 0,8 µl Fluorescein-markierten anti-Maus CD90 Antikörper in 100 µl Gesamtvolumen gefärbt und nach einem weiteren Waschzyklus im FACS analysiert.

Zur Bestimmung des Anteils der transduzierten Zellen wird für die Analyse im Histogramm ein Marker gesetzt, so dass die linke Grenze des Markers <1 % der Kontrolle umfasst. Je nach Titer wurde eine der Proben mit möglichst moderater Infektion ausgewählt und der Anteil der transduzierten Zellen in Prozent bestimmt. Aus der Prozentzahl wurde der Koeffizient für die MOI aus folgender Tabelle ermittelt:

(Tabelle und Formel entnommen aus Produktbeschreibung zur Titerung lentiviraler Vektoren (Promega, www.promega.com).)

Prozentsatz transduzierter Zellen	10	20	30	40	50	60	70	80	90	>90*
MOI	0,1	0,23	0,36	0,51	0,7	0,93	1,22	1,64	2,3	>2,5*

* Die MOI kann nicht mehr korrekt berechnet werden, wenn die Transduktion größer als 90 % ist.

Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{MOI (ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Koeffizient (MOI)} * 1000}{\text{Volumen infektiöser Überstand (}\mu\text{l)}}$$

Die angegebene MOI bezieht sich immer auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ Zellen. Standardgemäß wurden Zellen zur Infektion immer in dieser Zellzahl ausgesät, um eine einheitliche Infektion zu gewährleisten.

5.5.2 Präparation adenoviraler Plasmide und infektiöser Viren

Adenovirale Plasmide wurden durch Elektroporation transformiert. Der Bakterienstamm JM109 produziert hohe Ausbeuten dieser Art von Plasmiden. Von den unter Ampicillinresistenz über Nacht gewachsenen Klonen wurden kleine Kolonien ausgewählt und damit 2 ml LB mit 125 µg Ampicillin inokuliert. Nach 6 h Schüttelinkubation bei 37 °C und 225 rpm wurden damit Mini-Plasmidpräparationen durchgeführt und durch analytischen Restriktionsverdau die adenoviralen Plasmide nachgewiesen. Aus einem positiven Klon wurde am gleichen Tag in 400 ml LB-Amp-Medium eine Maxi-Präparation angeimpft (s. 5.3.3.8) und nach maximal 16 h aufgearbeitet. Darauf erfolgte die Transfektion der endotoxinfreien adenoviralen DNA in permissive Zellen.

Sowohl das replikationskompetente Adenovirus hTERT-Ad mit E3-Deletion, als auch die E1- und E3-deletierten replikationsdefizienten Adenoviren, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in 293-Zellen vermehrt.

Zur Herstellung infektiöser Viren aus den Adenovirusplasmiden müssen die Plasmide zunächst zur Freilegung der flankierenden ITR (*inverted terminal repeat*) linearisiert werden. Dies erfolgt durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuclease *Pac I*, durch den gleichzeitig die DNA-Abschnitte, die für die stabile Replikation in *E. Coli* notwendig sind,

entfernt werden. Die Transfektion der Zelllinie 293 mit *Pac I* linearisiertem Vektor führt zur Bildung infektiöser Adenoviruspartikel.

Eine 6 cm-Schale mit 293-Zellen wurde mit 5 µg des linearisierten Vektors mittels Calciumphosphattransfektion (s. Kap. 5.2.4) transfiziert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen geerntet und zur Lyse drei Zyklen Einfrieren/Auftauen in flüssigen Stickstoff unterworfen. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 7000 x g und 4 °C wurden mit dem Überstand neue 293-Zellen (in T25-Gewebekulturflaschen, mit DMEM/2 % FCS) infiziert. Diese Flaschen wurden bereits nach 60 h geerntet, lysiert und zentrifugiert (wie zuvor beschrieben). Dieser Infektionszyklus wurde so oft wiederholt bis ein zytopathischer Effekt (CPE, entspricht dem Abrunden der Zellen durch Verlust der Adhäsionsfähigkeit) sichtbar wurde. Darauf folgte die Präparation der Viren im Großmaßstab für *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente.

5.5.3 Vermehrung und Großpräparation von Adenoviren

Die Zelllinie 293 wurde in T75 Zellkulturflaschen bis zu einer 80 - 90 %igen Konfluenz kultiviert. Vor der Infektion wurde die Serumkonzentration durch einen Mediumwechsel auf 2 % gesenkt, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Die Zellen wurden mit einer MOI von mindestens 10 infiziert. Die MOI gibt die im statistischen Mittel vorhandene Anzahl der infektiösen Partikel pro Zielzelle an. Eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle ermöglichte hierbei die Bestimmung des geeigneten Erntezeitpunktes aufgrund des einsetzenden zytopathischen Effekts (meist nach 48-60 h).

Um eine möglichst hohe Ausbeute an infektiösen Partikeln zu erhalten, wurden 20 Kulturflaschen für eine Viruspräparation infiziert. Nach Vollendung des CPE wurde der Zellrasen durch Auf- und Abpipettieren des Mediums vorsichtig resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 6 ml PBS aufgenommen. Die Zellpellets wurden vereinigt und drei Zyklen Einfrieren/Auftauen in flüssigem Stickstoff unterzogen. Die Suspension wurde 5 min bei 7000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, erfolgte daraufhin ein erneutes Resuspendieren des Pellets mit 2 ml frischem PBS. Die Zentrifugation wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt und der Überstand des ersten Zentrifugationsschritts vereint.

Als nächstes erfolgte die Anreicherung und Reinigung der Viruspräparation auf einem Cäsiumchlorid-Stufengradienten. In einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen für den Rotor SW32 wurde der Gradient, bestehend aus jeweils 3,5 ml CsCl mit den Dichten 1,4 g/ml und 1,2 g/ml, aufgebaut. Auf diesen wurden 8 ml der Virussuspension überschichtet. Für 4 h wurde bei 27000 rpm (Rotor SW32, Fa. Beckmann) bei 8 °C ultrazentrifugiert. Mit einer feinen Kanüle (24 G) wurde die Virusbande durch seitliches Einstechen in das Röhrchen aus dem CsCl-Gradienten abgenommen. Um eine größere Reinheit des Virusmaterials zu erhalten, wurde die Suspension mit PBS nochmal auf ein Volumen von 8 ml aufgefüllt und nochmals auf einem CsCl-Gradienten für 2 h ultrazentrifugiert. Die Virusbande wurde in

einem möglichst kleinen Volumen aus dem Gradienten abgezogen und mit 1 Vol. 2 x Lagerungspuffer versetzt. Die Viruslösung wurde bei -20 °C gelagert. Der Gehalt an viralen Partikeln wurde photometrisch durch Bestimmung der OD bei 260 nm einer 1:20 Verdünnung in 0,1 % SDS ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 10¹² viralen Partikeln/ml. Zur Bestimmung der infektiösen Adenoviruspartikel (pfu = *plaque forming units*) kann ein Infektionstest zur Quantifizierung durchgeführt werden (*Rapid-Titer*).

Lagerungspuffer (2x) CsCl-Gradient (für jeweils 100 ml)

10 mM Tris pH 8,0	Dichte 1,2 g/ml: 26,5 g CsCl, 92,5 ml H ₂ O*
100 mM NaCl	Dichte 1,4 g/ml: 53,5 g CsCl, 85,5 ml H ₂ O*
0,1 % BSA	* + je 1 ml Tris/HCl pH 7,5
50 % Glycerol	

5.5.4 Bestimmung des infektiösen Titers von adenoviralen Präparationen

Die quantitative Bestimmung der adenoviralen Partikel mittels optischer Dichte erlaubt keine Aussage über die tatsächliche Infektiosität einer adenoviralen Präparation. Die Quantifizierung durch den *Rapid-Titers-Assays* basiert auf immunocytochemischer Färbung von infizierten Einzelzellen anhand von Verdünnungsreihen einer Adenoviruspräparation. Der Zellrasen wird infiziert und die tatsächlichen infektiösen Ereignisse werden nach maximal 46 h durch Fixierung/Permeabilisierung und Färbung sichtbar gemacht. Die Zählung infizierter Einzelzellen im Lichtmikroskop bei definierter Vergrößerung erlaubt einen direkten Rückschluss auf die Infektiosität einer Präparation.

Zur Quantifizierung wurde das Adeno-X Rapid-Titer Kit von Clontech mit leicht modifiziertem Protokoll durchgeführt.

Dazu wurden am Vortag in eine 24-*well* Platte 2·10⁵ 293 Zellen pro *well* in 1 ml ausgesät. Am Tag der Infektion wurde eine Verdünnungsreihe einer Adenoviruspräparation von final 10⁻⁶ - 10⁻⁹ hergestellt und in die *wells* gegeben.

Exakt 46 h nach Infektion wurde das Medium verworfen und vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Fixierung und alle weiteren Schritte erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers. Für die HRP-Färbung gilt als Faustregel jeweils abnehmend die *wells* zu färben, die zwei logarithmische Verdünnungsstufen unter dem *well* liegt, in dem mikroskopisch Lyse zu sehen ist (erkennbar am CPE).

5.5.5 Dialyse der Adenoviren

Bei der Verwendung der Adenoviren *in vivo* ist der Austausch des Ladungspuffer und des Cäsiumchlorids gegen physiologischen Puffer in Form von einer Dialyse notwendig.

Vor Beginn einer virotherapeutischer Behandlung wurde die Dialyse der Adenoviren durchgeführt. Dazu wurde die notwendige Adenovirusmenge inklusive eines mindestens 50 % höheren Überschusses aufgrund des Verlustes an der Dialysemembran eingesetzt. Die

Dialyse wurde in mindestens 500 µl in eine zuvor angefeuchtete Dialysekassette mit einer 26 G Kanüle injiziert und die überschüssige Luft aus der Kassette entfernt. Dialysiert wurde 4 h gegen Dialysepuffer, wobei der Puffer nach 2 h vollständig ausgetauscht wurde. Danach wurde die virushaltige Lösung aus der Kassette abgezogen und die OD aufgrund der infolge der Dialyse auftretenden Volumenänderung erneut bestimmt. Die MOI berechnete sich aus dem zuvor im *Rapid-Titer* bestimmten Verhältnis [Gesamtpartikel/infektiöse Partikel].

5.5.6 Retrovirale Arbeitstechnik zur Generierung stabiler transgener Zelllinien

Zur Etablierung eines stabil integrierten, tumor-assoziierten Antigens (HA) in eine Zelllinie erfolgte der Gentransfer mittels VSV-pseudotypisierter Retroviren. Mit den Viren wurden die Zielzellen mehrmals transduziert, um eine möglichst hohe Transduktionsrate vor der FACS-Sortierung zu erreichen.

Die verwendeten Phönixzellen wurden zur Transfektion bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70-80 % angezogen. Etwa 5 min vor der Transfektion wurde zu jedem Ansatz Chloroquin zugegeben (Endkonzentration 25 µM). Die Transfektion eines 5 µg DNA-Ansatzes pro Schale erfolgte wie in 5.2.4 beschrieben.

Zur Transduktion der Zielzellen am zweiten und dritten Tag nach der Transfektion wurde der Retroviren-haltige Mediumüberstand abgenommen und bei 300 x g und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Phönixzellen wieder mit frischem Medium versorgt. Zur Infektion wurden 1,5 ml des Überstandes mit 1,5 ml frischem Medium sowie Polybren (4 µg/ml) vermischt und anschließend auf die Zielzellen gegeben. Nach 4 h wurde bei diesen wiederum das Medium gewechselt. Zur Steigerung der Effizienz wurden pro Zielzellansatz zwei Schalen mit Phönixzellen angesetzt, die sowohl am dritten, als auch am vierten Tag geerntet wurden.

Nach den Infektionszyklen und etwa eine Woche nach Expansion der Zellen wurden diese auf die Expression des Reportergens untersucht und selektioniert (s. Kap. 5.4.3).

5.6 Genotypisierung transgener Mäuse

Zur Prüfung des Genotyps wurde die Schwanzspitze der Maus entfernt und in 150 µl *Viagen Direct-PCR Tail*-Reagenz zusammen mit 0,2 mg/ml Proteinase K über Nacht bei 55 °C bei 1000 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K durch Schütteln für eine Stunde bei 85 °C inaktiviert und die festen Bestandteile durch zehnmündige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 10000 rpm und anschließendes Überführen des Überstandes in ein neues Reagiergefäß entfernt. Der DNA-haltige Überstand konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die PCR wurde mit dem 2xHot-Star-Mastermix im 20 µl Ansatz durchgeführt. Dazu wurde pro Maus 1 µl der DNA-Lösung, 10 µl Mastermix, je 1 µl CL4-V- und CL4-R-Primer (5 pmol/µl) und 7 µl ddH₂O eingesetzt, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle (NTC).

PCR-Protokoll:

95 °C 10 min	1 Zyklus
95 °C 30 s	
58 °C 90 s	
72 °C 90 s	9 Zyklen
95 °C 15 s	
58 °C 45 s	
72 °C 90 s	26 Zyklen

Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn nach Auftrennung im Agarosegel eine Bande von etwa 300 bp erscheint. Das Ergebnis ist negativ im Falle vom Ausbleiben einer Bande oder einer Bande mit 250 bp.

5.7 Tierexperimentelle Methoden

Es wurden gleichgeschlechtliche, spezifisch pathogenfreie Mäuse des Stammes DBA/2 oder Balb/c im Alter von ca. acht Wochen verwendet, die aus der Tierzucht des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover oder von der Firma Charles River bezogen wurden. Das Gewicht betrug bei den Mäusen ca. 15-20 g. Die Tiere wurden in Gruppen von maximal sechs Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Fa. Makrolon) des Typs II auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 +/- 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 +/- 5%, Belichtung 07.00 bis 19.00 MEZ, kontinuierliche Fütterung mit einer pelletierten und autoklavierten Alleindiät (Fa. Altromin, Gesamtprotein 19 %, Fett 4 %, N-freie Extraktstoffe 50,5 %, umsetzbare Energie 2850 kcal/kg). Leitungswasser wurde über Tränkflaschen zugeführt. Die Tiere wurden hinter einer Infektionsbarriere gehalten und monatlich auf Erregerfreiheit entsprechend der GV-SOLAS-Liste getestet.

KLN205-Tumoren wurden durch s.c. Injektion von 10^7 Zellen in sterilem PBS in die linke Flanke inokuliert. 10-14 Tage später nach Erreichen eines Tumordurchmessers von etwa 0,4-0,6 cm wurde mit der therapeutischen Behandlung begonnen.

Die Tumorgroße wurde nach Betäubung der Mäuse mit Ether mit einer digitalen Schieblehre gemessen und die Größe anhand der Formel $(\text{Länge des Tumors in mm} \cdot (\text{Breite des Tumors in mm}^2)/2) = \text{Volumen (mm}^3)$ berechnet.

Zur dendritischen Zellvakzinierung wurden $3-5 \cdot 10^5$ CD11c aufgereinigte, beladene und aktivierte dendritische Zellen und in den Bereich zwischen Tumor und inguinalen Lymphknoten s.c. appliziert.

Die Applikation von rekombinanten Adenoviren erfolgte je nach Versuchsaufbau entweder über die Schwanzvene oder intratumoral. In beiden Fällen kamen 27 G Insulinnadeln zum Einsatz. Die Virusdosis betrug $1 \cdot 10^8$ pfu/g Körpergewicht. Die zu verabreichende Virusmenge wurde vor der Injektion auf ein injizierbares Volumen von 300 µl gebracht. Bei Beendigung eines Versuchs wurden zur Auswertung die Tiere durch CO₂-Inhalation und nachfolgenden Genickbruch getötet. Zur Serumgewinnung wurde gegebenenfalls unmittelbar nach der Tötung das Blut aus dem Herzen abgenommen. Das Blut wurde dann in ein 1,5 ml

Reagiergefäß gegeben, eine Stunde auf Eis gelagert und dann bei 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Das Serum wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und analysiert.

Die *in vivo* Quantifizierung der Luziferaseaktivität erfolgte mit dem Gerät IVIS Imaging System 200 Series und wurde mit der Software „Living Image^R Software“ Version 2.5 ausgewertet. Die Mäuse erhielten dazu zusätzlich zum hTERT-Ad $5 \cdot 10^7$ PFU Ad-Luc. Zum angegebenen Zeitpunkt erhielten die Mäuse i.v. 0,5 mg Luziferinlösung und wurden dann mit Ketamin/Rompun narkotisiert. Zur Quantifizierung wurden die Mäuse in die Messkammer des IVIS gelegt und die Photonenemission für 1-3 min gemessen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche und Tötungen für die Primärzellkultur erfolgten gemäß dem Tierversuchsantrag 04/888 und der Anzeige §4/86.

6. Literatur

Abe, J., Wakimoto, H., Yoshida, Y., Aoyagi, M., Hirakawa, K., and Hamada, H. (1995). Antitumor effect induced by granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor gene-modified tumor vaccination: comparison of adenovirus- and retrovirus-mediated genetic transduction. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *121*, 587-592.

Ahonen, C.L., Wasiuk, A., Fuse, S., Turk, M.J., Ernstoff, M.S., Suriawinata, A.A., Gorham, J.D., Kedl, R.M., Usherwood, E.J., and Noelle, R.J. (2008). Enhanced efficacy and reduced toxicity of multifactorial adjuvants compared with unitary adjuvants as cancer vaccines. *Blood* *111*, 3116-3125.

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* *392*, 86-89.

Barnett, B., Kryczek, I., Cheng, P., Zou, W., and Curiel, T.J. (2005). Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am. J. Reprod. Immunol.* *54*, 369-377.

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., and Duke, R.C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* *377*, 630-632.

Berry, L.J., Au, G.G., Barry, R.D., and Shafren, D.R. (2008). Potent Oncolytic activity of human enteroviruses against human prostate cancer. *Prostate*.

Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283-1288.

Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 595-602.

Bevan, M.J. (2006). Cross-priming. *Nat. Immunol.* *7*, 363-365.

Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., 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.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68-73.

Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612-616.

Campbell, J.D., Piechaczek, C., Winkels, G., Schwamborn, E., Micheli, D., Hennemann, S., and Schmitz, J. (2005). Isolation and generation of clinical-grade dendritic cells using the CliniMACS system. *Methods Mol. Med.* *109*, 55-70.

-
- Chen,C.H. and Wu,T.C. (1998). Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy. *J. Biomed. Sci.* 5, 231-252.
- Cho,J.H., Youn,J.W., and Sung,Y.C. (2001). Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* 167, 5549-5557.
- Clark,L.B., Appleby,M.W., Brunkow,M.E., Wilkinson,J.E., Ziegler,S.F., and Ramsdell,F. (1999). Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J. Immunol.* 162, 2546-2554.
- Conroy,H., Marshall,N.A., and Mills,K.H. (2008). TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours. *Oncogene* 27, 168-180.
- Cresswell,P., Ackerman,A.L., Giodini,A., Peaper,D.R., and Wearsch,P.A. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* 207, 145-157.
- Davydova,J., Le,L.P., 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,V.S., Rapp,M., Sorg,R.V., Steiger,H.J., Stummer,W., van,G.S., and Sabel,M. (2006). Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery* 59, 988-999.
- Delluc,S., Tourneur,L., Fradelizi,D., Rubio,M.T., Marchiol-Fournigault,C., Chiocchia,G., and Buzyn,A. (2007). DC-based vaccine loaded with acid-eluted peptides in acute myeloid leukemia: the importance of choosing the best elution method. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1-12.
- Dhodapkar,K.M., Krasovsky,J., Williamson,B., and Dhodapkar,M.V. (2002). Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 125-133.
- Dower,W.J., Miller,J.F., and Ragsdale,C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.
- Doyle,S.L. and O'Neill,L.A. (2006). Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1102-1113.
- Dudziak,D., Kamphorst,A.O., Heidkamp,G.F., Buchholz,V.R., Trumpfheller,C., Yamazaki,S., Cheong,C., Liu,K., Lee,H.W., Park,C.G., Steinman,R.M., and Nussenzweig,M.C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.
- Fallarino,F., Uyttenhove,C., Boon,T., and Gajewski,T.F. (1999). Improved efficacy of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-

pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12. *Int. J. Cancer* 80, 324-333.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330-336.

Gallegos, A.M. and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* 200, 1039-1049.

Garba, M.L., Pilcher, C.D., Bingham, A.L., Eron, J., and Frelinger, J.A. (2002). HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J. Immunol.* 168, 2247-2254.

Georger, B., Grill, J., Opolon, P., Morizet, J., Aubert, G., Terrier-Lacombe, M.J., Bressac De-Paillerets, B., Barrois, M., Feunteun, J., Kirn, D.H., and Vassal, G. (2002). Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus ONYX-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts. *Cancer Res.* 62, 764-772.

Gershon, R.K. (1975). A disquisition on suppressor T cells. *Transplant. Rev.* 26, 170-185.

Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B., and Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* 34, 336-344.

Govinden, R. and Bhoola, K.D. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol. Ther.* 98, 257-265.

Graham, F.L. and Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 3, 207-220.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.

Grauer, O.M., Suttmüller, R.P., van, M.W., Jacobs, J.F., Bennink, E., Toonen, L.W., Nierkens, S., and Adema, G.J. (2008). Elimination of regulatory T cells is essential for an effective vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells in a murine glioma model. *Int. J. Cancer* 122, 1794-1802.

Gromeier, M., Lachmann, S., Rosenfeld, M.R., Gutin, P.H., and Wimmer, E. (2000). Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6803-6808.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Grutz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 77, 3-15.

-
- Harshyne, L.A., Watkins, S.C., Gambotto, A., and Barratt-Boyes, S.M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* *166*, 3717-3723.
- Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D., and Kirn, D.H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* *3*, 639-645.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* *294*, 870-875.
- Hughes, T.K., Jr., Chin, R., Tying, S.K., and Rady, P.L. (1994). Distinction of mouse interferon-alpha subtypes by polymerase chain reaction utilizing consensus primers and type-specific oligonucleotide probes. *J. Interferon Res.* *14*, 117-120.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* *176*, 1693-1702.
- Kamath, A.T., Pooley, J., O'Keeffe, M.A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A.M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D.F., and Shortman, K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol.* *165*, 6762-6770.
- Kao, J.Y., Zhang, M., Chen, C.M., Pierzchala, A., and Chen, J.J. (2006). Aberrant T helper cell response in tumor-bearing mice limits the efficacy of dendritic cell vaccine. *Immunol. Lett.* *105*, 16-25.
- Kawashima, T., Kagawa, S., Kobayashi, N., Shirakiya, Y., Umeoka, T., Teraishi, F., Taki, M., Kyo, S., Tanaka, N., and Fujiwara, T. (2004). Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 285-292.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159-170.
- Kitajima, T., Caceres-Dittmar, G., Tapia, F.J., Jester, J., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (1996). T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells: loss of adhesive and phagocytotic capacities. *J. Immunol.* *157*, 2340-2347.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., and Rock, K.L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 4942-4946.
- Krasnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T., and Curiel, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.* *70*, 6839-6846.
- 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.

Kusmartsev, S., Nagaraj, S., and Gabilovich, D.I. (2005). Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J. Immunol.* 175, 4583-4592.

Lee, M.G., Abina, M.A., Haddada, H., and Perricaudet, M. (1995). The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-, E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector. *Gene Ther.* 2, 256-262.

Liu, Y., Gao, X., Masuda, E., Redecha, P.B., Blank, M.C., and Pricop, L. (2006). Regulated expression of FcγR in human dendritic cells controls cross-presentation of antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 177, 8440-8447.

Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., and Linehan, D.C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* 169, 2756-2761.

Lopez, M., Amorim, L., Gane, P., Cristoph, A., Bardinet, D., Abina, A.M., Minty, A., and Bernard, J. (1997). IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J. Immunol. Methods* 208, 117-129.

Luft, T., Maraskovsky, E., Schnurr, M., Knebel, K., Kirsch, M., Gorner, M., Skoda, R., Ho, A.D., Nawroth, P., and Bierhaus, A. (2004). Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood* 104, 1066-1074.

Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Bradley, C.J., Savoia, H., Trapani, J., and Cebon, J. (1998). A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cells from adult CD34+ progenitor cells. *Exp. Hematol.* 26, 489-500.

Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92.

Lyon, M.F., Peters, J., Glenister, P.H., Ball, S., and Wright, E. (1990). The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 2433-2437.

Matsumoto, M. and Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*

Mellman, I. and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

-
- Meyerson, M. (2000). Role of telomerase in normal and cancer cells. *J. Clin. Oncol.* 18, 2626-2634.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A., and Weinberg, R.A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 172, 4676-4680.
- Murphy, K.M. and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 933-944.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42, 3858-3863.
- Nava-Parada, P., Forni, G., Knutson, K.L., Pease, L.R., and Celis, E. (2007). Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. *Cancer Res.* 67, 1326-1334.
- Nicholl, M., Lodge, A., Brown, I., Sugg, S.L., and Shilyansky, J. (2004). Restored immune response to an MHC-II-Restricted antigen in tumor-bearing hosts after elimination of regulatory T cells. *J. Pediatr. Surg.* 39, 941-946.
- Nicod, L.P. and el, H.F. (1992). Adhesion molecules on human lung dendritic cells and their role for T-cell activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 207-213.
- O'Keeffe, M., Grumont, R.J., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Gugasyan, R., Vremec, D., Shortman, K., and Gerondakis, S. (2005). Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 106, 3457-3464.
- Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.* 157, 2539-2548.
- Porosnicu, M., Mian, A., and Barber, G.N. (2003). The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Res.* 63, 8366-8376.
- Potter, N.S. and Harding, C.V. (2001). Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J. Immunol.* 167, 2538-2546.
- Prasad, S.J., Farrand, K.J., Matthews, S.A., Chang, J.H., McHugh, R.S., and Ronchese, F. (2005). Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting

protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 174, 90-98.

RMITAGE,P. and Doll,R. (1957). A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br. J. Cancer* 11, 161-169.

Rodriguez,R., Schuur,E.R., Lim,H.Y., Henderson,G.A., Simons,J.W., and Henderson,D.R. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 57, 2559-2563.

Routes,J.M., Metz,B.A., and Cook,J.L. (1993). Endogenous expression of E1A in human cells enhances the effect of adenovirus E3 on class I major histocompatibility complex antigen expression. *J. Virol.* 67, 3176-3181.

ROWE,W.P., HUEBNER,R.J., GILMORE,L.K., PARROTT,R.H., and WARD,T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 570-573.

Saff,R.R., Spanjaard,E.S., Hohlbaum,A.M., and Marshak-Rothstein,A. (2004). Activation-induced cell death limits effector function of CD4 tumor-specific T cells. *J. Immunol.* 172, 6598-6606.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151-1164.

Salucci,V., Mennuni,C., Calvaruso,F., Cerino,R., Neuner,P., Ciliberto,G., La,M.N., and Scarselli,E. (2006). CD8+ T-cell tolerance can be broken by an adenoviral vaccine while CD4+ T-cell tolerance is broken by additional co-administration of a Toll-like receptor ligand. *Scand. J. Immunol.* 63, 35-41.

Santra,S., Seaman,M.S., Xu,L., Barouch,D.H., Lord,C.I., Lifton,M.A., Gorgone,D.A., Beaudry,K.R., Svehla,K., Welcher,B., Chakrabarti,B.K., Huang,Y., Yang,Z.Y., Mascola,J.R., Nabel,G.J., and Letvin,N.L. (2005). Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J. Virol.* 79, 6516-6522.

Sauter,B., Albert,M.L., Francisco,L., Larsson,M., Somersan,S., and Bhardwaj,N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191, 423-434.

Schuurhuis,D.H., van,M.N., Ioan-FACSinay,A., Jiawan,R., Camps,M., Nouta,J., Melief,C.J., Verbeek,J.S., and Ossendorp,F. (2006). Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *J. Immunol.* 176, 4573-4580.

Shen,Z., Reznikoff,G., Dranoff,G., and Rock,K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723-2730.

Shibagaki,N. and Udey,M.C. (2003). Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur. J. Immunol.* 33, 850-860.

Song,W., Tong,Y., Carpenter,H., Kong,H.L., and Crystal,R.G. (2000). Persistent, antigen-specific, therapeutic antitumor immunity by dendritic cells genetically modified with an adenoviral vector to express a model tumor antigen. *Gene Ther.* 7, 2080-2086.

Stevens,T.L., Bossie,A., Sanders,V.M., Fernandez-Botran,R., Coffman,R.L., Mosmann,T.R., and Vitetta,E.S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334, 255-258.

Ternovoi,V.V., Le,L.P., Belousova,N., Smith,B.F., Siegal,G.P., and Curiel,D.T. (2005). Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. *J. Virol.* 79, 1308-1311.

Touret,N., Paroutis,P., and Grinstein,S. (2005). The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J. Leukoc. Biol.* 77, 878-885.

Tvinnereim,A.R., Hamilton,S.E., and Harty,J.T. (2004). Neutrophil involvement in cross-priming CD8+ T cell responses to bacterial antigens. *J. Immunol.* 173, 1994-2002.

Velders,M.P., Markiewicz,M.A., Eiben,G.L., and Kast,W.M. (2003). CD4+ T cell matters in tumor immunity. *Int. Rev. Immunol.* 22, 113-140.

Villadangos,J.A. and Ploegh,H.L. (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity.* 12, 233-239.

Walker,P.R., Saas,P., and Dietrich,P.Y. (1997). Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.* 158, 4521-4524.

Wang,D. and DuBois,R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* 55, 115-122.

Wickham,T.J. (2003). Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat. Med.* 9, 135-139.

Wiendl,H., Mitsdoerffer,M., Hofmeister,V., Wischhusen,J., Bornemann,A., Meyermann,R., Weiss,E.H., Melms,A., and Weller,M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.* 168, 4772-4780.

Wilczynski,J.R., Radwan,M., and Kalinka,J. (2008). The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 13, 2266-2274.

-
- Willinger,M. and Frankel,F.R. (1979). Fate of surface proteins of rabbit polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. I. Identification of surface proteins. *J. Cell Biol.* 82, 32-44.
- Wintterle,S., Schreiner,B., Mitsdoerffer,M., Schneider,D., Chen,L., Meyermann,R., Weller,M., and Wiendl,H. (2003). Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.* 63, 7462-7467.
- Wirth,T., Zender,L., Schulte,B., Mundt,B., Plentz,R., Rudolph,K.L., Manns,M., Kubicka,S., and Kuhnel,F. (2003). A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res.* 63, 3181-3188.
- Woo,E.Y., Chu,C.S., Goletz,T.J., Schlienger,K., Yeh,H., Coukos,G., Rubin,S.C., Kaiser,L.R., and June,C.H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 61, 4766-4772.
- Xie,J., Qian,J., Wang,S., Freeman,M.E., III, Epstein,J., and Yi,Q. (2003). Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38. *J. Immunol.* 171, 4792-4800.
- Yamaguchi,T., Hirota,K., Nagahama,K., Ohkawa,K., Takahashi,T., Nomura,T., and Sakaguchi,S. (2007). Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity.* 27, 145-159.
- Yamanaka,R., Homma,J., Yajima,N., Tsuchiya,N., Sano,M., Kobayashi,T., Yoshida,S., Abe,T., Narita,M., Takahashi,M., and Tanaka,R. (2005). Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin. Cancer Res.* 11, 4160-4167.
- Yang,Y., Ertl,H.C., and Wilson,J.M. (1994). MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* 1, 433-442.
- Yoshikawa,T., Okada,N., Tsujino,M., Gao,J.Q., Hayashi,A., Tsutsumi,Y., Mayumi,T., Yamamoto,A., and Nakagawa,S. (2006). Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor cell-lysate against murine B16BL6 melanoma. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 100-104.
- Youngusband,H.B., Tyndall,C., and Bellett,A.J. (1979). Replication and interaction of virus DNA and cellular DNA in mouse cells infected by a human adenovirus. *J. Gen. Virol.* 45, 455-467.
- Zabner,J., Couture,L.A., Gregory,R.J., Graham,S.M., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75, 207-216.
- Zeng,G., Li,Y., El-Gamil,M., Sidney,J., Sette,A., Wang,R.F., Rosenberg,S.A., and Robbins,P.F. (2002). Generation of NY-ESO-1-specific CD4+ and CD8+ T cells by a

single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res.* 62, 3630-3635.

Zhang,D., Zhang,G., Hayden,M.S., Greenblatt,M.B., Bussey,C., Flavell,R.A., and Ghosh,S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.

Zhou,G., Drake,C.G., and Levitsky,H.I. (2006). Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 107, 628-636.

Zwaveling,S., Ferreira Mota,S.C., Nouta,J., Johnson,M., Lipford,G.B., Offringa,R., van der Burg,S.H., and Melief,C.J. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J. Immunol.* 169, 350-358.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
Ak	Antikörper
ATCC	<i>american tissue culture company</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	<i>coxsackie adenovirus rezeptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cox-2	Zyklooxygenase-2
CRAd	<i>conditionally replicating adenovirus</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
d	Tag(e)
DC	dendritische Zelle
DCT	Tumorlysat beladene und aktivierte dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
ds	doppelsträngig
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FCS	fötales Kälberserum
FR4	Folatrezeptor 4
Foxp3	<i>forkhead winged/helix-transcription factor</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor</i>
GFP	<i>green fluoreszent protein</i>
GMP	<i>good manufacturing practise</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
KLN-HA	Zelllinie KLN 205 transgen mit Hämagglutinin
LacZ	β-Galaktosidase
Luc	Luziferase
LB	Luria Broth
Lsg	Lösung
MD-2	myeloides Differenzierungsprotein-2
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTA	<i>material transfer agreement</i>
nAk	neutralisierende Antikörper
NF- κ B	Nuklear Faktor Kappa B
OD	optische Dichte (Extinktion)
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
pAPC	<i>professional antigen presenting cell</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pBS	<i>plasmid Bluescript</i>
PGN	Peptidoglykan
RLU	<i>relative light units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Poly I:C	Polyriboinosin-Polyribocytidylsäure
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
s	Sekunden
s.c.	Subkutan
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TE	Tris/EDTA
TGF- β	<i>transforming growth-factor-β</i>
Th1, Th2, Th3	T-Helferzelle Typ 1-3
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	2-Amino-2,2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
T-regs	regulatorische T-Zellen
Tr1	T-regulatorische Zelle Typ 1
U	Unit
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

8. Lebenslauf und Publikationen

Curriculum Vitae:

Name:	Norman Woller	
Adresse:	Dragonerstr. 2 30165 Hannover	
Geburt:	19.04.1976, in Gehrden bei Hannover	
Familienstand:	verheiratet	
Schulbildung:	1982 bis 1986	Grundschule in Kirchheide und Detmold
	1987 bis 1995	Gymnasium Leopoldinum in Detmold
Schulabschluß:	1995	Allgemeine Hochschulreife
Wehrpflicht:	1995 bis 1996	8. Luftwaffenausbildungsregiment 2, Budel/NL; Verteidigungsbezirkskommando (VBK) 35, Augustdorf
Studium:	1996 bis 2002	Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld
	2002	Diplomarbeit am DKFZ im Bereich rekombinante Antikörper zum Thema: „Konstruktion und Charakterisierung rekombinanter bispezifischer Antikörper- fragmente zur experimentellen Therapie der Hodgkinschen Krankheit“
Studienabschluß:	2002	Diplom-Biochemiker
Wissenschaftliche Tätigkeit:	2003-2008	Etablierung immunologischer Methoden zur Charakterisierung onkolytischer Vektoren. „Untersuchung immunologischer Aspekte einer onkolytischen Virotherapie im murinen Modellsystem“ am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Publikationen:**Artikel:**

Edukulla,R., Woller,N., Mundt,B., Knocke,S., Gürlevik,E., Saborowski, M.,Malek,N., Wirth,T., Kuhnel,F., and Kubicka,S. (2008). Antitumoral immune response by recruitment and expansion of dendritic cells in tumors infected with Telomerase-dependent oncolytic viruses (submitted).

Wirth,T., Kuhnel,F., Fleischmann-Mundt,B., Woller,N., Djojosebroto,M., Rudolph,K.L., Manns,M., Zender,L., and Kubicka,S. (2005). Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Res.* 65, 7393-7402.

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.

Abstracts:

Woller, N., Edukulla, R., Kuhnel, F., Mundt, B., Knocke, S., Kubicka, S.: Migration and expansion of dendritic cells induce a strong antitumor immune response in virotherapy which provide an inflammatory environment for effective DC vaccination. ILCA, Barcelona, 2007.

Woller, N., Mundt, B., Knocke, S., Kühnel, F., Kubicka, S.: Oncolytic immunovirotherapy of solid tumors in a murine model. *Viroretreat/MHH*, 2007.

Edukulla, R., Woller, N., Mundt, B., Kuhnel, F., Manns, M. P., Kubicka, S.: Migration and Expansion of Dendritic Cells Improves Cross-priming of Tumor Antigens during Virotherapy, *Viroretreat/MHH*, 2007.

Boozari, B., Wirth, T., Woller, N., Kubicka, S., Kuhnel, F.: The Proteasome Inhibitor Bortezomib and Oncolytic Virotherapy act synergistically in hepatocellular carcinoma. ILCA, Barcelona, 2007.

Wirth, T., Schache, P., Woller, N., Mundt, B., Manns, M. P., Kubicka, S., Kuehnel, F.: Telomerase dependent virotherapy overcomes tumor resistance against chemotherapy and trail by elimination of MCL-1. *Adenovirustagung*, Ulm, 2007.

Woller, N., Schulte, B., Milewska, D., Schache, P., Guerlevik, E., Manns, M. P., Kubicka, S., and Kuhnel, F.: Telomerase dependent conditionally replicating adenovirus (hTERT-Ad) expressing CARex-PTDs displays enhanced oncolytic properties in nonpermissive tumor cells. *EASL*, Wien, 2006.

Woller, N., Schulte, B., Wirth, T., Manns, M. P., Kuhnel, F., and Kubicka, S.: Receptor-independent infection improves oncolysis by tumor-specific adenoviruses in permissive and non-permissive cancer cells. *AGO*, Aachen, 2005.

Woller, N., Schulte, B., Wirth, T., Manns, M. P., Kubicka, S., and Kuhnel, F.: Telomerase dependent conditionally replicating adenovirus (hTERT-Ad) expressing CARex-PTDs displays enhanced oncolytic properties in nonpermissive tumor cells. EASL, Paris, 2005.

Wirth, T., Kuhnel, F., Woller, N., Mundt, B., Manns, M.P., Kubicka, S.: Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. AGO, Aachen, 2005.

Woller, N., Schulte, B., Wirth, T., Manns, M. P., Kubicka, S., and Kuhnel, F.: Receptor-independent infection improves oncolysis by tumor-specific adenoviruses in permissive and non-permissive cancer cells. Virologentage, Hannover, 2005.

Wirth, T., Kuhnel, F., Woller, N., Mundt, B., Manns, M. P., Kubicka, S.: Selective adenoviral replication restores sensitivity to chemotherapy and TRAIL-mediated apoptotic stimuli in resistant tumor types. DG-GT, Frankfurt, 2004.

Woller, N., Schulte, B., Wirth, T., Manns, M. P., Kubicka, S., and Kuhnel, F.: Telomerase dependent conditionally replicating adenovirus (hTERT-Ad) expressing CARex-PTDs displays enhanced oncolytic properties in nonpermissive tumor cells. DG-GT, Frankfurt, 2004.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael P. Manns danke ich für die gewährte Unterstützung und die großzügige Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz im Labor der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Manns besonders für die gewährte finanzielle Unterstützung bei dem Erwerb des Durchflusszytometers „FACS-Cantoll“ danken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während des Promotionsverfahrens.

Herrn Prof. Dr. Klaus Resch danke ich für die Übernahme des Korreferates, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Stefan Kubicka für die intensive und engagierte Betreuung dieser Arbeit, die große Geduld, die er bei mir gegenüber während der Etablierung von immunologischen Methoden in der Arbeitsgruppe bewiesen hat, die stete Diskussionsbereitschaft und sein ansteckendes Engagement für die Forschung und seine zahlreichen Ideen, sowie für das Vertrauen in meine Arbeit und für die überaus großzügige Förderung in allen Belangen.

Bei Dr. Florian Kühnel möchte ich mich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die große Kompetenz auf dem Gebiet der Molekularbiologie bedanken, die es, gepaart mit seiner exzellenten Didaktik, leicht machte, schnell Zugang zu neuen Arbeitstechniken zu finden. Die nicht enden wollende kritische Hinterfragung des immunologischen Fachgebietes und die hitzigen Diskussionen bezüglich wissenschaftlicher Herangehensweisen waren stets eine Freude.

Dr. Bettina Fleischmann-Mundt möchte ich besonders für die Hilfe bei tierexperimentellen Arbeiten danken. Neben ihrer großen Hilfsbereitschaft in allen Bereichen, insbesondere bei der Organisation und Planung möchte ich mich für die zahlreichen Mandelhörnchen nach misslungenen Versuchen bedanken, sowie für das sehr akribische Gegenlesen dieser Dissertation.

Weiterhin gilt Sarah Knocke mein Dank für ihre exzellente Unterstützung in allen experimentellen und auch organisatorischen Belangen, die sehr zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Thomas Wirth möchte ich danken für die geleistete Vorarbeit in Bezug auf den Vektor hTERT-Ad, der die Grundlage dieser Arbeit ist, sowie für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen.

Dr. Thomas Gebhardt möchte ich danken für den kurz und bündigen „Crashkurs FACS-Analyse“, da sich die Durchflusszytometrie als elementare Methode während der Arbeit herausgebildet hat.

Dr. Ramakrishna Edukulla danke ich für die gemeinsame Bearbeitung einiger immunologischer Fragestellungen.

Weiterhin richtet sich mein Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Kubicka für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen Hilfen zur Erleichterung des Laboralltages.

Allen Mitarbeitern des Gastrolabors gilt mein Dank für die freundliche Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch der Zentralen Einrichtung Zellsortierung der Medizinischen Hochschule Hannover für die durchflusszytometrische Zellsortierung zahlreicher Proben, die stets schnell und in exzellenter Qualität durchgeführt wurde.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Vera Woller für das mühsame, „fachfremde“ Gegenlesen der Dissertation, für ihre Liebe, Geduld und ihre tatkräftige Unterstützung. Danken möchte ich auch meiner Tochter Johanna, die ich über alles liebe und meiner gesamten Familie, die immer für mich da war.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Untersuchung immunologischer Aspekte einer onkolytischen Virotherapie im murinen Modellsystem“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 02.04.2008

Norman Woller