

Kontrollierte Genexpression zur Induktion einer antitumoralen
Immunität gegen solide Tumore durch Transplantation
genetisch modifizierter hämatopoietischer Stammzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Fatih Bayram Noyan
geboren am 04. November 1972 in Hildesheim

Referent: Prof. Dr. Christoph Klein

Korreferent: Prof. Dr. Christopher Baum

Tag der Promotion: 26. November 2008

Kurzzusammenfassung

Mit dem Ziel der Etablierung einer neuen therapeutischen Strategie gegen solide Tumore, wurde im Verlauf dieser Arbeit die Möglichkeit einer kontrollierten Expression von immunmodulatorischen Molekülen im malignen Gewebe evaluiert. Hierzu wurde erstmals das Potenzial des induzierbaren HSP70B-Promotors in einer kontrollierbaren, lentiviral vermittelten Genexpression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen untersucht. Anhand verschiedener generierten lentiviraler Vektorsysteme wurde die Transgenexpression *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Dabei konnte nach Induktion eine 100-fache Verstärkung der GFP-Expression *in vitro* in verschiedenen transduzierten Zellen gemessen werden. Dieses hohe Expressionsniveau war im Maximum mit der mit dem eines konstitutiven Expressionssystems vergleichbar. Das Basalexpressionsniveau der HSP70B gesteuerten GFP-Expression blieb dahingegen minimal und unterschied sich nicht signifikant von der Leervektorkontrolle. Im weiteren Verlauf wurde *in vivo* die HSP70B gesteuerte GFP-Expression hämatopoietischer Zellen nach Transplantation von lentiviral transduzierten hämatopoietischen Stammzellen analysiert. Hierzu wurde komplettes Knochenmark aufgereinigt und mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren transduziert. Diese transduzierten murinen Stammzellen wurden anschließend in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Nach erfolgter Rekonstitution der Versuchstiere wurde diesen die Gliomzelllinie GL261 subkutan injiziert. Zur Analyse wurde die GFP Expression in verschiedenen Organen sowie in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen gemessen. Die HSP70B gesteuerte GFP Expression in tumorinfiltrierenden Zellen war bis zu zehnmal höher als in den vergleichbaren Zellpopulationen der Milz. Dieses lässt den Schluß zu, dass der induzierbare Promotor im tumoralen Microenvironment bereits ohne externe physikalische Stimuli bereits aktiviert war.

Im Hinblick auf die Etablierung eines lokal induzierbaren anti-Tumor Effektes wurde die gesteuerte Expression einer dominant negativen Variante des TGF- β Rezeptors (T β RII DNR) im tumoralen Microenvironment als immunmodulatorisches Molekül untersucht. Hierzu wurden letal bestrahlten Versuchstiere TGF- β -DNR transduzierte hämatopoietischen Stammzellen transplantiert und nach erfolgter Rekonstitution den Tieren GL261 Zellen subkutan injiziert. Mäuse, die den dominant negativen Rezeptor unter der Kontrolle des HSP70B Promotors exprimierten, zeigten eine bis zu 140-fache Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein vergleichbarer anti-Tumor Effekt konnte in Tieren gezeigt werden, bei denen das therapeutische Transgen konstitutiv exprimiert wurde.

Somit stellt eine HSP70B gesteuerte Expression eines therapeutischen Transgens in hämatopoietischen Zellen eine neue experimentelle Strategie für eine kontrollierte Freisetzung von immunmodulatorischen Molekülen zur Induktion einer lokalen anti-Tumor-Therapie dar.

Abstract

In an attempt to design novel therapeutic strategies against solid tumors, we hypothesized that spatial and temporal control of transgene expression may allow for the delivery of immunomodulatory molecules at the site of tumor. Here, we assess the potential of the HSP70B promoter to control lentivirus-mediated gene expression in tumor-infiltrating hematopoietic cells.

We generated a series of lentiviral vectors and characterized transgene expression *in vitro* and *in vivo*. Up to 100fold induction of GFP expression was seen when lentivirus-transduced cells were heated to 43°C *in vitro*. Only minimal leakiness was seen at 37°C.

Next, we analyzed HSP-driven GFP expression in hematopoietic cells upon transplantation of lentivirus-transduced hematopoietic stem cells, using constitutively active promoters and empty vectors as controls. Mice were inoculated with the glioma cell line GL261 and GFP expression was assessed in various organs as well as in tumor-infiltrating hematopoietic cells. Interestingly, HSP70-driven transgene expression was up to 10fold higher in tumor-infiltrating cells when compared to spleen cells, suggesting that the HSP70B promoter was active in the tumor microenvironment.

To assess whether confined expression of a dominant negative TGF- β -receptor within the tumor microenvironment would induce anti-tumor immunity, we transplanted mice with hematopoietic stem cells transduced with TGF- β -DNR and injected GL261 cells subcutaneously. The tumor volume was decreased up to 140 fold in mice expressing HSP70B-TGF- β -DNR, comparable to mice transplanted with hematopoietic stem cells that constitutively express TGF- β -DNR.

In summary, HSP70B-mediated transgene expression in hematopoietic cells may provide a novel experimental strategy for controlled release of immunomodulatory molecules to induce anti-tumor therapies.

Schlagworte:

Gentherapie
Tumorthherapie
Hitze-Schock Promotor

Keywords:

Gene therapy
Tumor therapy
Heat-Shock promoter

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Kapitel 1 Einleitung	1
Tumorimmunologie	1
Das unspezifische Immunsystem	1
Das spezifische Immunsystem	2
Immunantwort auf Tumore	2
T-Zell vermittelte Tumorabwehr	3
Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) in der Tumorimmunologie	4
Möglichkeiten von Tumoren die Immunabwehr zu umgehen	5
Transforming growth factor (TGF) -β	6
TGF-β-Signalkaskade	6
Rolle des TGF-β in der Tumorentstehung	9
Therapie von Tumorerkrankungen	11
Gentherapeutischer Ansatz zur Tumorthherapie	12
Einsatz von induzierbaren Promotoren	14
Heat-Shock Protein (HSP)-70	15
Gentransfer und Gentherapie	16
Gentherapeutische Ansätze zur Tumorthherapie	16
Transfer von genetischem Material in das Zielgenom - Retrovirale Vektoren	16
Aufbau der Retroviren	17
Genomarchitektur und funktionelle Organisation der Mausleukämieviren	17
Retroviren als Transfervektoren	19
Lentiviren	20
Arbeitsziel	21
Kapitel 2 Material & Methoden	23
Molekularbiologie	23
Kultivierung von Bakterien	23
Stammhaltung	23

Präparation und Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Bakterien.....	23
Flüssigkulturen von Bakterien.....	23
Elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA mittels Agarose Gel-Elektrophorese	24
Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	24
Restriktionsverdau der DNA mittels Restriktionsendonucleasen	24
Glätten der sticky-end sites in blunt-end sites.....	24
Abspaltung von 5´-Phosphaten durch alkalische Phosphatase	24
Ligation der DNA-Fragmenten.....	25
Minipreparation von Plasmid DNA.....	25
Maxi-Preparation von Plasmid DNA.....	25
Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	25
Arbeiten mit Säugetierzellen.....	26
Zellkultur.....	27
Transfektion von Säugetierzellen.....	27
Retro- und Lentivirale Transduktion von adhärenenten Zellen	28
Bestimmung des Virustiters.....	28
Durchflusszytometrie - (FACS, fluorescence activated cell sorting)	28
Tierexperimente.....	29
C57BL/6 Mäuse	29
Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung.....	29
Aufreinigung von murinem Knochenmark und Depletion von Lineage-Zellen.....	29
Retro- und Lentivirale Transduktion von murinen Lineage-negativen Zellen.....	29
Transplantation von retro- und lentiviral modifizierten murinen Lineage-negativen Zellen.....	30
Transplantation von GL261-Zellen in rekonstituierte Mäuse nach der Stammzelltransplantation	30
Organentnahme von rekonstituierten Mäusen nach der Stammzelltransplantation	30
Isolation der hämatopoietischen Zellen aus muriner Milz und Tumorgewebe	31
Induktionsexperimente zur Aktivierung der HSP getriebenen Transgenexpression	31
In A549- und GL216-Zellen	31
Induktionsexperimente zur <i>ex vivo</i> Aktivierung der HSP getriebenen Transgenexpression.....	32
In murinen hämatopoetischen Zellen der Milz und in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen.....	32
Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messung.....	32
Zellproliferations Assay (MTT-Assay).....	32

Kapitel 3 Ergebnisse	34
Amplifizierung des humanen HSP70B Promoters	34
Konstruktion der retroviralen Vektoren	34
Konstruktion des induzierbaren retroviralen Systems	35
Konstruktion des konstitutiv exprimierenden retroviralen Systems.....	36
Konstruktion von retroviralen Vektoren mit WPRE Fragment.....	36
Konstruktion der lentiviralen Transfervektoren	37
Konstruktion des induzierbaren lentiviralen Systems.....	37
Konstruktion des konstitutiv exprimierenden lentiviralen Systems.....	38
Konstruktion der lentiviralen Leervektorkontrolle	39
Charakterisierung der Transduktionseffizienz des verwendeten retro- und lentiviralen Systems in murinen hämatopoietischen Stammzellen	39
<i>In vitro</i> Charakterisierung des humanen HSP-Promotors in der Transgenexpression ..	41
Bestimmung der optimalen Induktionstemperatur	41
Bestimmung der optimalen Induktionsdauer	42
Bestimmung des postinduktiven Expressionsverlaufs	44
Das basale Expressionsniveau in Abhängigkeit der Kopienzahlen	46
Charakterisierung der HSP-dirigierten Genexpression in rekonstituierten hämatopoietischen Zellen der Milz nach Stammzelltransplantation	47
Transplantation von lentiviral manipulierten Stammzellen	48
Charakterisierung der HSP-kontrollierten Genexpression in hämatopoietischen Zellen der Milz rekonstituierter muriner Milzzellen nach Stammzelltransplantation	49
Charakterisierung der HSP-gesteuerten Genexpression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen von rekonstituierten Tieren nach Stammzelltransplantation	52
Charakterisierung einer induzierten Tumormunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant negativen Variante des TGF-β-Rezeptors	53
Amplifikation und Konstruktion der dominant negativen Variante des TGF- β -II-Rezeptors	53
Konstruktion des induzierbaren lentiviralen Systems zur kontrollierten Expression der dominant negativen Variante des TGF- β Rezeptors.....	54
Konstruktion des konstitutiv exprimierenden lentiviralen Systems zur Expression der dominant negativen Variante des TGF- β Rezeptors.....	55
Funktionelle Charakterisierung des TGF- β -DNR.....	55
Charakterisierung einer induzierbaren Tumormunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant negativen Variante des TGF- β -Rezeptors	57

Kapitel 4 Diskussion	59
Charakterisierung der Transduktionseffizienz des verwendeten retro- und lentiviralen Systems in murinen hämatopoietischen Stammzellen.....	59
<i>In vitro</i> Charakterisierung des humanen HSP-Promotors in der Transgenexpression.....	59
Konstitutive und induzierte Expression im Vergleich.....	62
Charakterisierung der HSP-dirigierten Genexpression in rekonstituierten hämatopoietischen Zellen der Milz nach Stammzelltransplantation.....	64
Charakterisierung der HSP-gesteuerten Genexpression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen von rekonstituierten Tieren nach Stammzelltransplantation	65
Charakterisierung einer induzierten Tumorimmunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant-negativen Variante des TGF- β -Rezeptors.....	67
Kapitel 5 Ausblick	70
Kapitel 6 Literatur	72
Anhang	87
Geräte.....	87
Verbrauchsmaterialien.....	88
Zytokine	89
Primer	89
Lebenslauf.....	90
Danksagung	91
Erklärung zur Dissertation	92

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DER HUMANEN TYP I UND TYP II REZEPTOREN DER TGF- β FAMILIE.	6
ABBILDUNG 2: PHYLOGENETISCHE DARSTELLUNG DER HUMANEN SMADS.	7
ABBILDUNG 3: DER ZELLULÄRE SIGNALWEG VON TGF- β .	9
ABBILDUNG 4: AUFBAU EINES RETROVIRUSPARTIKELS.	17
ABBILDUNG 5: GENOMORGANISATION EINFACHER RETROVIREN.	18
ABBILDUNG 6: MODULARE DARSTELLUNG DES AUFBAUS EINES LENTIVIRALEN VEKTORSYSTEMS.	20
ABBILDUNG 7: OBEN: SCHEMATISCHER AUFBAU DES HSP70B-PROMOTORS.	34
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER AUFBAU DES EINGESETZTEN ONKORETROVIRUS PMMP.ECT3-.	35
ABBILDUNG 9: MODULARER AUFBAU DES VEKTORS PMMP.ECT3-.HSP.GFP.PGK.NEO	35
ABBILDUNG 10: MODULARER AUFBAU DES VEKTORS PMMP.ECT3-.CMV.GFP.PGK.NEO	36
ABBILDUNG 11: MODULARER AUFBAU DES VEKTORS PMMP.ECT3-.	37
ABBILDUNG 12: MODULARER AUFBAU DES VEKTORS PRRL.SIN18.HSPEGFP.PGK.NEO.	38
ABBILDUNG 13: MODULARER AUFBAU DES VEKTORS PRRL.SIN18.CMV.EGFP.PGK.NEO.	38
ABBILDUNG 14: MODULARER AUFBAU DER LEERVEKTORKONTROLLE PRRL.SIN18. PGK.NEO.	39
ABBILDUNG 15: REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER KONSTITUTIVEN GFP-EXPRESSION.	39
ABBILDUNG 16: REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER HSP GESTEUERTEN GFP-EXPRESSION.	41
ABBILDUNG 17: OBEN: REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER HSP DIRIGIERTEN GFP-EXPRESSION.	42
ABBILDUNG 18: ZUSAMMENFASSUNG DER INDUZIERTEN GFP EXPRESSION.	44
ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER BASALEXPRESSION [%].	46
ABBILDUNG 20: OBEN: GEOMETRISCHES MITTEL DER CMV-KONTROLLIERTEN GFP-EXPRESSION.	48
ABBILDUNG 21: GEOMETRISCHES MITTEL DER NICHTINDUZIERTEN UND POSTINDUZIERTEN HSP70B-KONTROLLIERTEN GFP-EXPRESSION.	50
ABBILDUNG 22: GEOMETRISCHES MITTEL DER NICHTINDUZIERTEN UND DER INDUZIERTEN HSP70B-KONTROLLIERTEN GFP-EXPRESSION IN TUMORINFILTRIERENDEN HÄMATOPOIETISCHEN ZELLEN.	52
ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DER PCR-STRATEGIE.	53
ABBILDUNG 24: A: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMINANT NEGATIVEN VARIANTE DES TYP I REZEPTORS IM VERGLEICH ZU DEM T β RI.	54
ABBILDUNG 25: MODULARER AUFBAU DES LENTIVIRALEN VEKTORS PRRL.SIN18.HSP.TGF- β -DNR.PGK.GFP MIT INDUZIERBARER EXPRESSIONSKAPAZITÄT	54
ABBILDUNG 26: MODULARER AUFBAU DES LENTIVIRALEN VEKTORS PRRL.SIN18.CMV.TGF- β -DNR.PGK.GFP MIT KONSTITUTIVER EXPRESSIONSKAPAZITÄT	55
ABBILDUNG 27: MTT ASSAY ZUR FUNKTIONELLEN CHARAKTERISIERUNG DES KLONierten TGF- β -DNR.	55
ABBILDUNG 28: OBEN: GRAFISCHE DARSTELLUNG DES VERLAUFS DES TUMORWACHSTUMS IN TRANSPLANTIERTEN VERSUCHSTIEREN DER JEWEILIGEN VERSUCHSGRUPPE NACH INJEKTION DER GL261-ZELLEN. UNTEN: AUSZUG AUS DER DARSTELLUNG DER TUMORGRÖßENBESTIMMUNG AN DEN TAGEN 6, 16 UND 32 NACH INJEKTION DER GL261-ZELLEN IN DIE MAUS. CTR: LEERVEKTORKONTROLLE, LCD: KONSTITUTIVE EXPRESSION VON TGF- β -DNR, LHD: HSP-	

ANHÄNGIGE EXPRESSION VON TGF- β -DNR.	57
ABBILDUNG 29: CHARAKTERISTISCHE DARSTELLUNG DER GEWACHSENEN TUMORE IN DEN VERSCHIEDENEN TIERVERSUCHSGRUPPEN.	58

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	anti
α -MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
Δ , delta	Deletion
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Ψ	retrovirals Verpackungssignal
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
AMH	Anti Müller Hormon
AMP	Ampecelin
APCs	Antigen-presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BMP	Bone Morphogenic Proteins
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalivirus
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	Cytotoxic T-Lymphocytes (Zytotoxische T-Lymphozyten)
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dnase	Desoxyribonuklease
DNR	Dominant Negativer Rezeptor
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia Coli
EBV	Ebstein Bar Virus

EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich Enzym-Immunoassay)
ENV	Envelope, Retrovirales Protein
et al.	und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Flourescin Isothiocyanate
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G418	Geneticin
GAG	Group Antigens, Retrovirales Protein
GCV	Ganciclovir
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor)
GP	Glykoprotein
Gy	Gray
Gzm	Granzym
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethanolsulfonsäure
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSC	Hematopoietic stem cell (Hämatopoietische Stammzelle)
HSE	Heat Shock Elements
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockproteine)
HSVtk	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
HSZ	Hämatopoietische Stammzelle
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobase
KM	Knochenmark

LAK	Lymphokin aktivierte Killerzelle
LB	Liquid-Broth Medium
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molar
MA	Matrixprotein
mA	Milliampere
MACS	Magnetic Cell Sorting
max	Maximum
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (großer Histokompatibilitätskomplex)
Min	Minimum
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Murine Leukemia Virus
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity Of Infection <i>infection</i> (Multiplizität der Infektion)
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NC	Nucleocapsid
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Primerbindungsstelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pfu	<i>plaque-forming unit</i> (Plaque-bildende Einheit)
PI	Propidium Iodide
POL	Polyprotein
Pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
RBC	Red Blood Cell (Rote Blutkörperchen)
rek	rekombinant
REV	Responsive Element
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR (Reverse Transkriptase PCR)
s.c.	subcutaneous (subkutan)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIN	Self Inactivating (selbstinaktivierend)
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
t	Zeit
T	T-Zelle
TAA	Tumorassoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetate EDTA
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TAP	Transporter Associated Protein
TBR	TGF- β Receptor
TCR	T-Cell Receptor
TE	Tris / EDTA
TET	Tetrazyklin
TG	Transgen
TGF- β	Transforming Growth Factor (Mitogener Wachstumsfaktor)
Th	T-Helferzelle
Th1/2	T-Helferzelle des Typ 1/2
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TM	melting-Temperatur
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethane
U	Units
u	<i>unit</i> (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (endothelialer Gefäßwachstumsfaktor)
vgl.	Vergleiche
VSV-G	Glycoprotein, Vesicular Stomatitis Virus
wpre	Woodchuck Posttranscriptional Element
wt	wild-type (Wildtyp)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Kapitel 1 Einleitung

Tumorimmunologie

Krebs ist nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (1). Die Entartung einer körpereigenen Zelle zu einer malignen/transformierten Zelle bildet die Grundlage für das Entstehen eines soliden Tumors bzw. Lymphoms. Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Transformation einer Zelle führen können. Spontane Entartung, Transformation durch virale und/oder bakterielle Einflüsse, chemikalische Noxen oder genetische Disposition sind nur einige dieser Beispiele. Der körpereigenen Abwehr, dem Immunsystem, kommt hier eine entscheidende Bedeutung in der Abwehr von entarteten Zellen zu. In jedem Organismus entstehen permanent entartete Zellen, die jedoch durch das Immunsystem kontrolliert und eliminiert werden. Diese umstrittene Hypothese bezeichnet man als *Immunosurveillance von Tumoren* (2), die jedoch neuerdings wieder belebt wurde (3),(4). Neben *Cluster of differentiation-8*-positiven ($CD8^+$)-T-Zellen spielen auch andere Immunzellen, wie $CD4^+$ -T-Zellen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und dendritische Zellen (DC) eine entscheidende Rolle in der tumorassoziierten Immunantwort. Für B-Zellen und Makrophagen wird dieses noch diskutiert.

Seit Paul Ehrlich beschäftigen sich Immunologen mit der Frage, ob das gegen Infektionserreger so effiziente Immunsystem nicht auch gegen Tumore wirksam sein könnte. Die Beobachtung, dass Tumorgewebe, das zur Impfung gegen Tumoren von einem Tier auf ein anderes transplantiert wurde, vom Empfängertier abgestoßen wurde, hat sich zwar nicht als tumorspezifische Immunreaktion erwiesen, sie hat jedoch zur Entdeckung des *Major Histocompatibility Complex (MHC)* geführt. Im folgenden wurde versucht die Frage zu beantworten, ob Tumorzellen Antigene präsentieren, die a) selektiv in diesem Gewebe vorkommen bzw. b) diese von den Zellen des Immunsystems erkannt werden können. Anhand monoklonaler Antikörper gelang die Identifizierung von Tumor-assoziierten Proteinen, die als MHC-Komplex für $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Lymphozyten erkennbar sind.

Das unspezifische Immunsystem

Die erste natürliche Barriere gegen eingedrungene Pathogene sowie gegen entartete Zellen bildet das unspezifische Immunsystem. Diese primäre Abwehr des Organismus besteht aus der anatomischen Grenzfläche (Haut) und aus Schleimhäuten des Verdauungs-, des Respirations- und des Urogenitaltraktes. Kann ein Pathogen diese primäre Hürde überwinden, steht es einer Reihe von gewebständiger und zirkulierender Zellen gegenüber. Langerhanszellen der Haut, Granulozyten, $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen (DC) sowie Makrophagen bilden die körpereigene Immunabwehr. Die Makrophagen zirkulieren als Monozyten im Blut, liegen in der Lunge als Alveolarmakrophagen und in der Leber als Kupffer'sche Sternzellen vor. Sie besitzen die Fähigkeit Pathogene durch Endo- und Phagozytose zu eliminieren. Gemeinsam mit DC und B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APC) stehen sie gemeinsam mit der spezifischen Immunabwehr in enger Verbindung.

Das spezifische Immunsystem

Im Gegensatz zu dem unspezifischen Immunsystem, das sofort nach Eintritt von Pathogenen oder nach Verletzungen eine Entzündungsreaktion initiiert, reagiert das unspezifische Immunsystem deutlich später. Es übernimmt die Funktion zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses auf in den Körper eingedrungene Pathogene. Dieses Gedächtnis wird aus den Lymphozyten - einer Population der Leukozyten - gebildet. Lymphozyten können zwischen körpereigenen und -fremden Substanzen unterscheiden. Im Verlauf der Zirkulation zwischen Blut und Lymphsystem treten sie sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz mit anderen Zellen in Kontakt. Lymphozyten zeigen morphologisch eine einheitliche Zellpopulation, können jedoch aufgrund ihres Reifungsortes, ihrer Oberflächenmarker und ihrer Effektormechanismen in B- und T-Lymphozyten klassifiziert werden. B- und T-Lymphozyten sind darauf spezialisiert, Antigene (Ag) über einen Rezeptor zu erkennen und eine spezifische Antwort zu generieren. Klingt die Immunreaktion ab, verbleiben wenige spezifische Gedächtniszellen im Körper mit Potenzial, schneller auf ein erneutes Aufflammen einer Entzündung zu reagieren (5). B-Zellen können auf lösliche Ag hin die Bildung von Antikörpern (Ak), die die humorale Immunantwort initiieren, bilden. T-Zellen sind darauf spezialisiert zellgebundene Peptide, zu erkennen und dadurch die zelluläre Immunantwort auszulösen.

Immunantwort auf Tumore

Das angeborene und erworbene Immunsystem spielen bei der Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Nach den ersten Versuchen mit 3-methylcholanthrene (MCA) induzierten Tumoren in Mäusen, ging man zunächst davon aus, dass die T-Zellen die Tumorantwort initiieren bzw. vermitteln (6). Jedoch besitzen auch unspezifische Abwehrmechanismen eine tragende Funktion in der Immunabwehr. Hierzu zählen NK-Zellen, die in der Lage sind, MHC-Klasse I-moleküldefiziente Tumorzellen und Metastasen abzutöten (7), indem sie über Sekretion von GranzymA (GzmA), GranzymB (GzmB) und Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ) zytotoxisch auf Tumorzellen wirken. Makrophagen setzen nach Aktivierung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) Stickstoffmonoxid (NO) frei und induzieren in den transformierten Zellen Apoptose. Auch $\gamma\delta$ -T-Zellen konnten als Effektorzellen bei der Tumorabwehr nachgewiesen werden (5). Zu den Zellen des erworbenen Immunsystems gehören B-Zellen, die Antikörper gegen Epitope auf den transformierten Zellen bilden können. Dies konnte z.B. für EBV-assoziierte Lymphome nachgewiesen werden. Antikörper binden an die Lymphomzelle und vermitteln deren Apoptose (8). Dendritische Zellen können über MHC-Klasse I und II Moleküle Ag präsentieren, die CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺-T-Zellen über die Ligation von CD40/CD40L aktivieren können (4). Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen spielt die Anzahl von tumorspezifischen T-Lymphozyten im T-Zellrepertoire (9).

T-Zell vermittelte Tumorabwehr

Die gegen Tumorzellen gerichtete Immunität wird im Wesentlichen durch T-Lymphozyten vermittelt (6). Dabei ist entscheidend, dass fast alle genannten Ag MHC Klasse-I Moleküle assoziiert präsentiert werden und demnach $CD8^+$ T-Zell restringiert sind. Bei der Aktivierung dieser T-Zellen spielen antigenpräsentierende Zellen (APC) eine entscheidende Rolle, wobei sie die Fähigkeit zur Cross-Präsentation haben und ein ausreichendes kostimulatorisches Potenzial gewährleisten müssen. Einmal differenzierte tumorspezifische Zytotoxische-T-Lymphozyten (CTL) können Tumor-Assoziierte-Antigene (TAA) auch ohne Kostimulation auf den Tumorzellen erkennen und angreifen. Die Rolle von $CD4^+$ T-Zellen bei der Elimination von Tumoren hingegen ist unklar. Im Fall des TAA Thyrosinase, dessen Expression im Kontext von MHC Klasse-I und MHC Klasse-II Molekülen nachgewiesen werden konnte, ist eine direkte Beteiligung dieser T-Zellen gezeigt worden. Aus Tierexperimenten geht hervor, dass eine durch CD40-CD40L Interaktion verstärkte Kostimulation durch APC in einigen Systemen erforderlich ist, die durch $CD4^+$ T-Lymphozyten gewährleistet werden könnte. Eine Beeinflussung des Tumorwachstums durch die von ihnen sezernierten Zytokine TNF- α und IFN- γ ist wahrscheinlich (10), (11), (12). Gegen eine Vielzahl verschiedener Tumore konnten außerdem spezifische Ak im Serum nachgewiesen werden. Diese scheinen bei der Elimination von Tumoren jedoch gegenüber T-Lymphozyten eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sie trotz ihres Vorkommens keine effiziente Abstoßung des entarteten Gewebes hervorrufen. Ein von Ak unabhängiger Einfluß von B-Lymphozyten auf die Tumormunität ist hingegen im Tiermodell beschrieben worden. Es stellte sich heraus, dass diese Zellen einen hemmenden Effekt auf T_H1 Zellen ausübten, der in dem untersuchten System für das Absterben der Tumorzellen *in vivo* verantwortlich war (13). Ihre Relevanz konnte jedoch lediglich bei der $CD4^+$ T-Zell abhängigen Tumorabstoßung im Tiermodell nachgewiesen werden. Trotz ihres ineffektiven Angreifens an den Tumorzellen bestehen Bestrebungen, Ak bei immuntherapeutischen Behandlungsverfahren einzusetzen (14). Die Rolle des unspezifischen Immunsystems bei der Tumorbekämpfung ist ebenfalls unvollständig geklärt. NK-Zellen spielen eine Rolle bei der Kontrolle verschiedener Tumore, was im Mausmodell nachgewiesen werden konnte (15). Nach ihrer Stimulation durch IL-12 und IL-2 können sie als Lymphokin aktivierte Killerzellen (LAK) im adoptiven Transfer gegen Tumore eingesetzt werden (16). Sie können Tumorzellen aufgrund bestimmter Oberflächenmoleküle erkennen und sie durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen lysieren (17). Dabei fördert eine geringe MHC Klasse-I Expression, wie sie häufig auf Tumorzellen beobachtet wird, die Erkennung durch die NK-Zellen. In Anbetracht der Tatsache, dass sie neben T-Zellen die zweite entscheidende IFN- γ -produzierende Zellpopulation darstellen, wird ihre Beteiligung an einer Tumormunität auch in diesem Zusammenhang diskutiert. Dennoch ist ihre Funktion bei der Immunantwort gegen Tumoren nicht eindeutig, da aus Tierexperimenten hervorgeht, dass Tiere ohne Lymphozyten - jedoch mit intakten NK-Zellen - eine erhöhte Inzidenz für Tumore aufweisen (18). Neben NK-Zellen spielen auch Makrophagen bei der Immunität gegenüber Tumore eine Rolle. Aus *in vitro*-Versuchen ist bekannt, dass aktivierte Makrophagen Tumorzellen direkt abtöten können. Sie wirken über Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und TNF direkt auf ihre Zielzellen und beeinflussen auf der anderen Seite durch die Sekretion von IL-12 die zelluläre Immunabwehr (19), (20). Schließlich konnte auch für $\gamma\delta$ -T-Zellen

eine antitumorale Wirkung beschrieben werden (21), (22).

Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TILs) in der Tumorummunologie

Die Effektivität zellulärer Immunreaktionen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Funktion der T-Lymphozyten. Das Aktivitätsspektrum dieser Zellpopulation umfasst in Abhängigkeit ihrer Differenzierung unterschiedliche Funktionen und charakteristische Eigenschaften wie Zytotoxizität, Zytokinsynthese bzw. -sekretion. Nach ihrer Entwicklung im Thymus zirkulieren die zunächst naiven T-Zellen zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen und differenzieren sich nach Antigenkontakt zu den sogenannten Effektorzellen. $CD4^+$ - und $CD8^+$ - Zellen repräsentieren hierbei zwei unterschiedliche Klassen. $CD8^+$ -Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TCR) Tumorantigenbruchstücke. Dabei müssen die Zielzellen das Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse-I Molekülen auf der Oberfläche exprimieren. Unter dem Einfluss von Zytokinen laufen klonale Expansions- und Reifungsprozesse der Ag-sensibilisierten T-Zellen ab. IL-2 gilt als Wachstums- und Differenzierungshormon für Lymphozyten (T-, B-, NK-Zellen) und aktiviert die zytotoxischen $CD8^+$ -Zellen. Das IL-2 wiederum wird von $CD4^+$ -Zellen sekretiert, nachdem sie Komplexe aus MHC-Klasse-II Molekülen und Tumorantigenfragmenten auf APC registriert haben. Nach ihrer Aktivierung stimulieren sie B-Zellen zur Ig-Produktion und induzieren zytotoxische Reaktionen von Makrophagen. MHC-Klasse-II Moleküle werden hauptsächlich von APC exprimiert. MHC-Klasse-I befinden sich dagegen auf allen kernhaltigen Zellen. Das Auftreten von TILs ist auf die Erkennung von tumorspezifischen Antigenen durch T-Lymphozyten zurückzuführen und wurde in der Vergangenheit als wirtspezifische Immunantwort auf den wachsenden Tumor angesehen. Bei einigen Tumorentitäten wurde diese Antigenerkennung bereits nachgewiesen. Aktivierte Lymphozyten synthetisieren und sezernieren verschiedene immunmodulatorische Zytokine nach Antigenkontakt. Anhand der Zytokinfreisetzung und der Bestimmung an der Zelloberfläche exprimierter Adhäsions- und Aktivierungsmarker ist eine Beurteilung der TIL-Aktivität möglich. Die Expression bestimmter Zytokine kennzeichnet, wie bereits beschrieben, weitere funktionelle Subpopulationen der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. Die Produktion von $IFN-\gamma$ und IL-2 ist für T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen vom Typ1 (Th1, Tc1) charakteristisch (23), (24). Von Th2- und Tc2-Zellen werden vor allem IL-4, IL-5 und IL-10 freigesetzt (25), (26). Letztere fördern die humorale Immunität und blockieren zudem die Typ-1 Reaktion, bei welcher die zelluläre Immunität im Vordergrund steht. Im Verlauf der Tumorerkrankung und -progression könnte sich ein Missverhältnis der Zellpopulation einstellen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein. Eine Reihe von klinischen Daten von Tumorpatienten mit soliden Tumoren belegen eine Korrelation zwischen einer hohen Dichte von infiltrierenden Leukozyten und einer schlechteren Verlaufsprognose für den Patienten (27). Demgegenüber stehen Studien, die zeigen, dass eine erhöhte Infiltration von T-Zellen einen durchaus positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der Tumorpatienten haben (28), (29), (30). Diese Diskrepanz zwischen den vorliegenden Arbeiten kann darin begründet sein, dass nicht die Quantität der infiltrierenden Zellen, sondern die Art der einwandernden Lymphozyten über den Krankheitsverlauf entscheiden (31). So bedingt z.B. eine Erhöhung der infiltrierenden regulatorischen T-Zellen eine deutlich schlechtere Verlaufsprognose, im Gegensatz zu einer erhöhten Anzahl an infiltrierenden Memory $CD8^+$ T-Zellen (32).

Möglichkeiten von Tumoren die Immunabwehr zu umgehen

Der fundamentale Grundsatz der *Immunosurveillance* Hypothese, vertreten durch Lewis Thomas und Macfarlane Burnet, besteht in der Aussage, dass es im Körper eine hochfrequente Tumorentstehung, vergleichbar mit der Infektionsfrequenz durch mikrobiologische Keime, gibt, die jedoch genauso häufig vom körpereigenen Immunsystem erkannt und zerstört wird (2). Inzwischen weiss man, dass Tumore eine Anzahl von eigenen und mutierten Proteinen exprimieren, die als Tumor-assoziierte-Antigen (TAA) bezeichnet werden. Gegenwärtig sind folgende Tumorantigene beschrieben und werden in sechs Klassen unterteilt:

1. Gene, die Proteine kodieren, die im normalen adulten Gewebe inaktiv sind, jedoch in verschiedenen Tumorarten exprimiert werden (MAGE (33), BAGE (34), GAGE (35) und RAGE (36)).
2. Differenzierungsantigene, die gewebsspezifisch, d.h. sowohl in Tumorzellen als auch in den korrespondierenden normalen Zellen exprimiert werden (Tyrosinase (37), Melan A (38), gp100 (39)).
3. Ubiquitär exprimierte Gene, die Proteine kodieren, die jedoch in Tumorzellen mutiert vorliegen (CDK4 (40), β -Catenin (41), bcr-abl (42)).
4. Proteine, die von nicht mutierten Genen codiert werden, die in Tumorzellen deutlich überexprimiert werden (Her-2/neu (43), p53 (44), Telomerase (45), Survivin (46)).
5. Proteine, die sich von onkogenen Viren ableiten (E6 (47), E7 (48)).
6. Kohlenhydratreiche Mucine (Muc-1) (49).

Jedoch werden viele dieser TAA vom körpereigenen Immunsystem toleriert, da sie ebenfalls in verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert werden. Viele Tumorzellen exprimieren wenige bis keine MHC-Klasse-I-Moleküle und sind infolgedessen für T-Lymphozyten nicht zu erkennen. So können z.B. die Untereinheiten des MHC-Moleküls vermindert translatiert oder funktionsuntüchtige Transporter Associated protein (TAP) der Proteasomen exprimiert werden. Experimente mit Tumorzellen, deren MHC Klasse-I Molekülexpression durch Transfektion oder unter IFN- γ -Behandlung erhöht wurde, bestätigen eine verstärkte Immunogenität *in vivo*. *In vitro* konnte eine vermehrte Lyse dieser Zellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) im Zytotoxizitätstest nachgewiesen werden. Teilweise wird jedoch ausschließlich die Expression des MHC-molekülassoziierten TAA vermindert. Dazu kommt es z.B. bei *in vitro*-Experimenten nach Kultivierung mit tumorspezifischen Antikörpern (AK) oder -CTL. Ein weiterer Mechanismus, mit dem sich Tumore dem Immunsystem entziehen, besteht in ihrer Fähigkeit, immunsuppressive Substanzen wie den Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (50) zu sezernieren. TGF- β bindet an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, in der Zelle wird das Signal über SMAD-Proteine bis zum Zellkern weitergeleitet. Dort werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die für die Aktivierung von speziellen Genen sorgen (51). TGF- β erfüllt unter anderem Aufgaben eines Tumorsuppressors, wie z.B. die Hemmung der Zellproliferation (52). Eine Deregulierung der TGF- β -Signaltransduktion kann zur Tumorentstehung beitragen.

Transforming growth factor (TGF) - β

Das pleiotrope Zytokin gehört der TGF- β Superfamilie an, die eine große Gruppe von strukturell verwandten Liganden, u.a. Inhibine, Activin A, BMP (Bone Morphogenetic Proteins), AMH (Anti-Müller Hormone), DPP (Decapentaplegic) und Vg-1 umfaßt. Eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, die Reproduktion, die Motilität, die Zelladhäsion, das Nervenwachstum, das Knochenwachstum, Wundheilungsprozesse und die Immunantwort werden von diesen Liganden reguliert (53-56). Gegenwärtig konnten bislang 34 Familienmitglieder der TGF- β Superfamilie im menschlichen Genom identifiziert werden. Das namensgebende Mitglied dieser Familie wurde in den frühen 80er Jahren als sezernierter Faktor von Virus-transformierten Zellen entdeckt (57, 58). Neben den o.g. Funktionen dieses Zytokins ist der stark inhibitorische Einfluss auf das Zellwachstum zu erwähnen (59). Auf molekularbiologischer Ebene führt der Einfluß von TGF- β zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase. Es hemmt dadurch das Zellwachstum und fördert die Differenzierung, wirkt also im Sinne eines Tumorsuppressors. Darüber hinaus spielt TGF- β eine Rolle bei Immunsuppression, Onkogenese und Entwicklung (60). Störungen in der TGF- β - Signalkette sind beteiligt an der Pathogenese von Arthritis, Arteriosklerose, Glomerulonephritis und hereditärer Teleangiektasie sowie an der Karzinogenese (61) (62).

TGF- β -Signalkaskade

Die unterschiedlichen Isoformen des TGF- β binden an einen Rezeptorkomplex, der aus TGF- β Typ I ($T\beta$ RI), Typ II Rezeptoren ($T\beta$ RII) und Typ III Rezeptoren ($T\beta$ RIII) besteht.

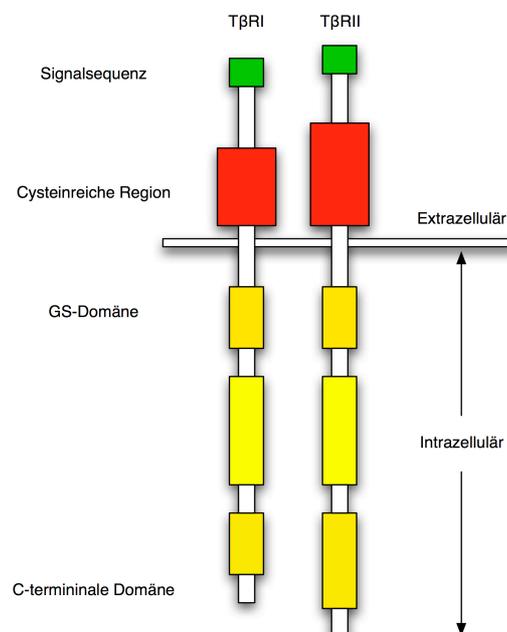


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Typ I und Typ II Rezeptoren der TGF- β Familie. T β RI und T β RII sind Rezeptoren mit einer Transmembrandomäne, kurzer cyteinreicher, extrazellulärer Domäne und einer intrazellulären Serin/Threonin Kinasedomäne. T β RI enthält eine Glycin- und Serin-Reiche Domäne (GS-Domäne), in der teilweise Serin oder Threoninreste durch die T β RII Kinase phosphoryliert werden.

Dieser heterooligomere Komplex ist an intrazelluläre Signalmediatoren, den sog. Smad Proteinen gekoppelt, die die Signale in den Zellkern weiterleiten (63, 64). T β RI und T β RII sind strukturell verwandte Serin/Threoninkinasen, bestehend aus einer kurzen cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer kurzen hydrophoben Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Region mit intrinsischer Kinasedomäne (53, 65, 66). In Abwesenheit des Liganden liegen beide Rezeptoren als Homodimere in der Membran vor. Nach Ligandenbindung an T β RII bilden sie einen heterotetrameren Komplex. Der Typ II Rezeptor besitzt eine Kinase mit konstitutiver Funktion, die nach Liganden-induzierten Heteromerkomplexbildung den Typ I Rezeptor an Serin und Threoninresten an der GS-Domäne phosphoryliert (56). Die Typ I Rezeptoren sind den Typ II Rezeptoren nachgeschaltet und determinieren die Ligandenspezifität des heteromeren Rezeptorkomplexes (67). Die aktivierte Kinasedomäne innerhalb des Typ I Rezeptors interagiert und phosphoryliert die Smad Proteine (68, 69). Die Bezeichnung Smad leitet sich von den kodierenden Genen ab, die in verschiedenen Studien erstmals an *Drosophila* und *C. elegans* identifiziert wurden. Das *Drosophila*-Gen wird als *MAD* (Mother against decapentaplegic), das Gen in *C. elegans* als *SMA* (Small body size) bezeichnet. Strukturell und funktionell unterscheidet man drei Unterfamilien der Smad-Proteine, denen allen eine stark konservierte Grundsequenz zu eigen ist:

- R-Smads (receptor-regulated Smads),
- Co-Smads (common partner-Smads),
- I-Smads (inhibitory-Smads)

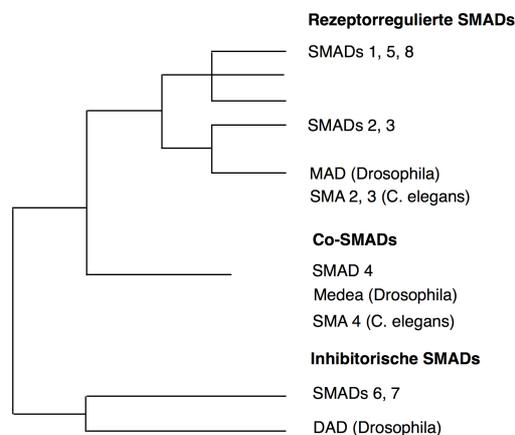


Abbildung 2: Die Smad-Familie. Phylogenetische Darstellung der humanen Smads. Unterteilung: Smad 1, 5, 8, 2, 3 gehören den rezeptorregulierten Smads (R-Smads) an. Smad 4 bildet den einzig bekannten Co-Smad und Smad 6,7 gehören den für die negative Rückkopplung zuständigen inhibitorischen Smads an (modifiziert nach (51))

R-Smads werden am C-terminalen Ende (SSXS-Motiv) vom aktivierten Typ I Rezeptor phosphoryliert (68-70). R- und Co-Smads haben zwei hochkonservierte Domänen an ihren N- und C-terminalen Domänen. Diese werden als *Mad Homology 1* (MH1) und *Mad Homology 2* (MH2) bezeichnet (66, 71, 72). Beide separaten Domänen sind durch eine weniger konservierte Linker-Region miteinander verbunden. Diese ist reich an Prolinresten und von variabler Länge (68). Die MH1 Domäne der der R-

Smads kann mit Hilfe eines elf Aminosäuren langen β -Hairpin direkt an spezifische DNA Sequenzen binden (73, 74). Ferner enthalten die MH1 Domäne der R- sowie Co-Smads eine Kernlokalisierungssequenz (*NLS-like*). Die ist in der Linkerregion assoziiert und agiert direkt mit Smad3 und Smad4 über Importin α und $-\beta$ (75, 76). Smad4 enthält eine Kernexportsequenz (NES), die in der Linkerregion lokalisiert ist und direkt mit CRM1 (Kernexporter) interagiert (77). Die MH2 Domäne kontrolliert die Bildung von heteromeren Komplexen zwischen den R- und Co-Smads. Aber auch Co-Aktivatoren und Co-Repressoren können von der MH2 Domäne gebunden werden (78). Nach der Translokation der Smads in den Nukleus interagieren sie dort mit verschiedenen spezifischen DNA-Bindeproteinen, die über Wechselwirkungen der MH2 Domäne verläuft (55, 79). I-Smads besitzen eine konservierte MH2 Domäne (55, 65, 79). Sie interagieren über das PY-Motif mit den Ubiquitin-Ligasen (*Smurfs*). Smad7, als I-Smad, interagiert sowohl im TGF- β - als auch im BMP Signalweg (80). Über die Interaktion mit Smad2 und Smad3 signalisieren die Typ I TGF- β Rezeptoren ALK4, ALK5 sowie ALK7. Durch die durchgeführte Phosphorylierung vom SSXS-Motif wird die Interaktion der R-Smads mit dem Rezeptor und den unterstützenden Hilfsproteinen (*SARA* – „*small ancor for receptor activation*) unterbrochen (81). Die aktivierten Smads lösen sich vom Rezeptorkomplex ab und bilden mit Co-Smad4 einen heterotrimeren Komplex (68). Der Smad-Komplex permeiert nach der Phosphorylierung in den Zellkern, wo er über die MH2-Domäne der R-Smads Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren eingeht oder durch die Anlagerung von der MH1-Domäne von Smad 4 an Promotoren direkt die Genexpression vermittelt (p15, p21). Beide kodieren cyclinabhängige Kinaseinhibitoren, die den Zellzyklus anhalten und damit die Proliferation verlangsamen. Auch an den Promotoren der I-Smad-Gene finden sich Bindungsstellen für SMADs, die der Hochregulierung der I-Smads dienen. Smad-Komplexe scheinen sich aber auch hemmend auf DNA-Segmente wachstumsfördernder Gene wie c-myc auszuwirken. Für den Zusammenschluss von Smad-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren sei der Activin Responsive Factor (ARF) angeführt. Dieser kann mit dem Activin Responsive Element (ARE) am Mix2-Gen erst nach Kooperation mit dem Smad-Komplex interagieren.

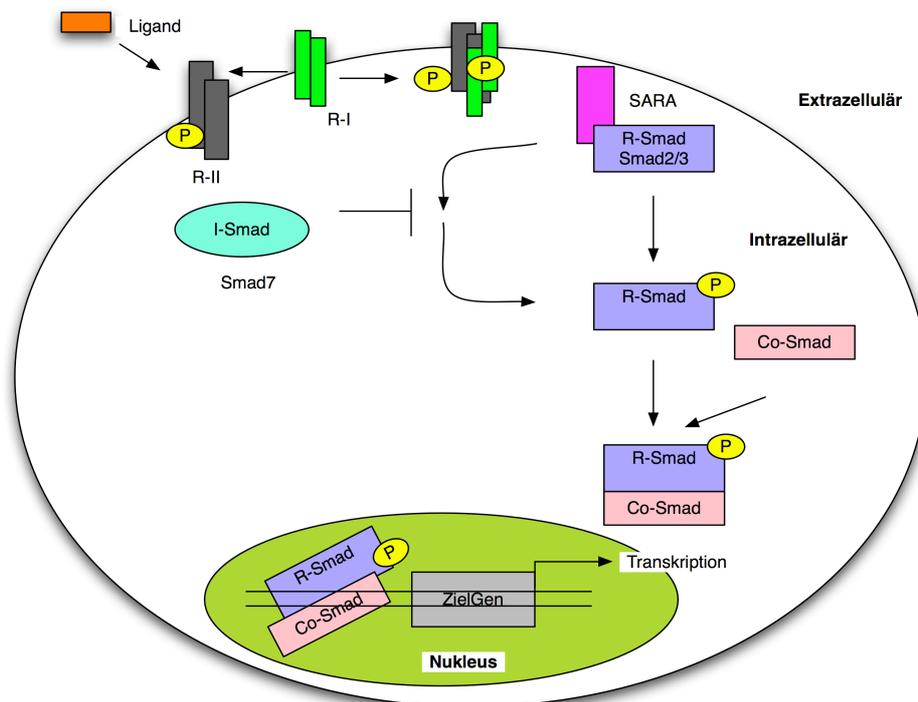


Abbildung 3: Der zelluläre Signalweg von TGF- β . TGF- β bindet und stabilisiert den heterotetrameren Komplex aus Typl und Typll Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren. Typll Rezeptor ist eine konstitutiv aktive Kinasedomäne und phosphoryliert den Typl Rezeptor an der GS-Domäne. Nach Aktivierung leitet der Typl Rezeptor das Signal in das Zellinnere durch die Phosphorylierung der R-Smads am C-terminalen Ende weiter. Die R-Smads (Smad 2, 3) werden durch einen Smad-Anker SARA im Zytosol bereitgestellt. Aktivierte Smad 2,3 bilden mit dem Co-Smad4 einen heterotrimeren Komplex und werden in den Kern transloziert. In Kombination mit spezifischen Transkriptionsfaktoren binden sie an die Promotoren von TGF- β Zielgenen. Diese Wirkung der Komplex wird durch die Bindung von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren reguliert.

Rolle des TGF- β in der Tumorentstehung

TGF- β ist ein pleiotropes Zytokin und ist in verschiedene Rollen bei der Entstehung von Tumoren, wie der Hemmung der DNA-Synthese und der Zellproliferation, Induktion der Zelldifferenzierung und Apoptose und an der Beteiligung an Angiogenese und Hämatopoese verankert. Bislang wurde bei der Tumorentstehung ein wachstumshemmender und damit tumorsupprimierender Effekt von TGF- β angenommen. Entartete Zellen zeigen häufig Veränderungen, die es ihnen ermöglichen, diesem antiproliferativen Effekt von TGF- β zu entkommen. Hierzu gehören die Inaktivierung von Signalkaskadenkomponenten infolge von Mutationen oder durch eine Dysregulation der Expression (52). Diese Eigenschaften der Tumorsuppression wurde durch verschiedene Untersuchungen an diversen soliden Tumoren und –zelllinien dahingehend bestätigt, dass Veränderungen in der TGF- β Signalkaskade nachgewiesen wurden. Kolon- und Magen-Karzinome zeigen eine häufige Mutation des TGF- β -Rezeptors-II, Pankreaskarzinome im Smad4-Gen. Ferner konnte eine Überexpression des TGF- β - Antagonisten Smad7 in Pankreaskarzinomen gezeigt werden. Den Einfluß von TGF- β in der Tumorentstehung zeigen neuere Untersuchungen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass dieses

Zytokin den antiproliferativen Effekt, überwiegend auf das tumorumgebende Gewebe als auf die Tumorzellen selbst ausübt, wodurch die Tumorentstehung begünstigt wird (82). Im fortgeschrittenen Stadium zeigen Tumorzellen eine erhöhte Sekretion von TGF- β , was diesen Zellen, einen Selektionsvorteil verschafft. Durch Induktion der Angiogenese können diese Zellen der Immunabwehr entgehen und weitere Invasion und Metastasierung werden erleichtert (82). Ferner kann TGF- β durch die aktive Hemmung der cytolytischen Proteine Perforin, GranzymA, GranzymB, IFN- γ und FasL (83) der CTL induzierten Immunantwort entgehen. Die wachstumshemmende Wirkung auf die tumorumgebenden Zellen, die nicht TGF- β -refraktär sind, fördert jede weitere Selektion der entarteten Zellen und somit die Progression des Tumors in Richtung entdifferenzierter Stadien. Die Überexpression von Smad7 kann auch zu einer Insensitivität gegenüber TGF- β führen. Weiterhin kann es durch die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs zu einer Reduzierung oder zu einem Abbruch der Wachstumskontrolle durch TGF- β führen. Diese Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs entsteht während der Karzinogenese, sowie eine Überexpression von Zyklin D. Eine Überexpression des Zyklin D1-Gens konnte z.B. in TGF- β resistenten HCC-Zelllinien nachgewiesen werden (84). Zyklin D1 fördert den Übergang zwischen der G1- und der S-Phase in den Zellen und ist damit ein positiver Wachstumsregulator. Mutationen des Zyklin D1-Gens scheinen in der Karzinogenese vieler verschiedener Tumoren verwickelt zu sein. Daher liegt der Schluß nahe, dass Zyklin D1 die Rolle eines Onkogens einnimmt. Die Resistenz gegenüber TGF- β muß nicht zwangsläufig auf Dysfunktionen in der TGF- β -Signalkaskade, wie z.B. Veränderungen der TGF- β -Rezeptoren oder der Smad-Proteine oder eine Überexpression von Smad7, darstellen, sondern kann ebenso auch durch andere Mechanismen ausgelöst werden.

Therapie von Tumorerkrankungen

Die Tumorthherapie erfolgt gegenwärtig mit traditionellen Methoden, bestehend aus der operativen Tumorentfernung, der Chemo- und der Strahlentherapie. Eine vollständige Heilung bestehender Tumorerkrankungen konnte bislang jedoch nur in einzelnen Tumorentitäten erfolgen, wie im Beispiel des Hodenkrebses. Hingegen zeigen Hirn-, Prostata-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs die höchste Mortalitätsrate und sind somit besonders schwer therapierbar (85). Die Chemo- und Strahlentherapie führen zu schwerwiegenden zytotoxischen Nebenwirkungen im gesunden Gewebe des Patienten. Der Einsatz von Chemotherapeutika soll eine Hemmung der Proliferation und der Syntheseleistung der Krebszellen initiieren. Jedoch verhindert die bislang unvermeidbare Schädigung gesunder Körperzellen einen breiten therapeutischen Einsatz dieser Medikamente. Eine unvollständige Entfernung der Tumorzellen kann zu a) Resistenzentwicklung gegen die Verabreichten Chemotherapeutika, b) Metastasenbildung und/oder c) Rezidiven führen und somit die fortführende Behandlung erschweren. Somit wird nach neuen Ansätzen in der Tumorthherapie geforscht, die eine für Tumorzellen selektive und hohe antitumorale Wirkung aufweisen, und bei gleichzeitiger Reduktion der Beeinträchtigung des umliegenden gesunden Gewebes die möglichen Nebenwirkungen minimieren. Die gegenwärtige Forschung in der Tumorthherapie belegt, dass das adaptive Immunsystem prinzipiell entartete Zellen erkennt und diese somit theoretisch angreifbar sind. Dennoch entziehen sich die maligne entarteten Zellen durch verschiedene Mechanismen erfolgreich der Kontrolle durch das Immunsystem. Eine Supprimierung bzw. Neutralisierung dieser Faktoren ist derzeit Fokus der Forschung, um durch immunmodulatorische Therapieverfahren eine effiziente Funktion des Immunsystems zu ermöglichen. Die Antwort des Immunsystems auf Tumore ist häufig ineffektiv und führt nicht zur Eradikation des Tumors. Im Rahmen der Immuntherapie wird versucht, über Stimulation des unspezifischen und spezifischen Immunsystems Therapieformen zu entwickeln, die zu einer Unterstützung der antitumoralen Antwort führen. Bisher konnten erfolgreiche Versuche mit der Injektion von inflammatorischen Substanzen wie Endotoxinen, TNF- α sowie Interferonen in tumortragenden Mäusen durchgeführt werden (86). Diese Moleküle stimulieren unspezifisch das Immunsystem und dienen als polyklonale Antikörper von Lymphozyten. Eine lokale Applikation von BCG (Bacillus Calmette-Guérin) an der Stelle des Tumorwachstums und die dadurch vermittelte Tumorregression wurde bereits weitreichend erforscht (87). Die Stimulation des spezifischen Immunsystems kann über aktive und passive Immunisierung erfolgen. Die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen, die eine Regression eines Tumors einleiten, kann durch die Verabreichung von apoptotischen Tumorzellen oder Tumor Assoziierte Antigene in Adjuvantien erfolgen. Die apoptotischen Tumorzellen setzen intrazelluläre Substanzen frei (Doppelstrang DNA, Hitzeschockproteine), die durch „Cross-Präsentation“ eine von dendritischen Zellen (DC) vermittelte Aktivierung von Lymphozyten auslösen können (88). Ferner besteht die Möglichkeit, mit Hilfe eines adoptiven T-Zell-Transfers von tumorspezifischen T-Lymphozyten, experimentell gewachsene Tumore zu eradizieren (89). Ein grundsätzliches Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass viele der möglichen Tumorantigene auch Selbstantigene sind. Diese Tatsache kann zu einer Reduktion oder zum möglichen Verlust von hochaviden tumorantigenspezifischen T-Zellen durch negative Selektion im Thymus bzw. durch periphere Mechanismen der Toleranz führen. Mittels Immunisierungen kann

ein solches T-Zellrepertoire demnach kaum amplifiziert und therapeutisch genutzt werden. Adoptiver T-Zelltransfer von tumorantigenspezifischen T-Zellen, durch den das vorhandene T-Zell Repertoire erweitert wird, kann dieses Phänomen umgehen. Jedoch ist eine breite klinische Anwendung der individuellen Expansion der antigenspezifischen T-Zellen bei diesem Ansatz infolge der hohen logistischen und finanziellen Umstände kaum möglich.

Gentherapeutischer Ansatz zur Tumorthherapie

Gegenwärtig dominieren drei Ansätze die Gentherapie von Tumoren:

i) die direkte Korrektur genetischer Defekte in malignen Zellen, ii) neue Therapiestrategien für eine medikamentöse Behandlung, iii) neue bzw. verbesserte Immuntherapie.

Die korrektive Gentherapie zielt auf die Behandlung von sich häufenden Gendefekten, die im Laufe der Tumorprogression entstehen. Es handelt sich hierbei mehrheitlich um Defekte, die für zellzyklusregulierende Proteine kodieren. Infolge einer gezielten Applikation von funktionsfähigen Genen, die diesen Zyklus regulieren, wie z.B. p53 oder p16, können diese Defekte mit dem Ziel behandelt werden, einen Wachstumsstop des Tumors und eine Einleitung der Apoptose zu initiieren.

Im Gegensatz dazu drängt die Immuntherapie auf eine Wiederherstellung der Immunreaktivität des Tumors, durch z.B. eine verstärkte Expression von MHC-Proteinen, die zur Stärkung des Immunsystems des Patienten gerichtet ist. Die Anwendung von Selbstmordgenen findet in der Tumorthherapie als sog. Therapiogene ebenfalls Anwendung. Diese werden mit dem Ziel verabreicht, transfizierte Zellen abzutöten. Dabei erfolgt eine Applikation von Genen deren Expressionsprodukte im Tumor nicht-toxische Propharmaka in toxische Pharmaka umwandeln. Ein Beispiel für diese Therapiogene ist das Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase-Gen (HSVtk) (90). Hierbei produzieren die transfizierten Tumorzellen, die das virale Thymidinkinase-Gen exprimieren, nach Gabe von Ganciclovir (GCV), den zytotoxischen Metaboliten GCV-Triphosphat und sterben ab. Untransfizierte Zellen bleiben dagegen durch das Pharmakon unbeeinträchtigt, was in einer verminderten systemischen Toxizität resultiert. Die zweite Hauptgruppe besteht aus möglichen therapeutischen Transgenen zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems. Diese Aktivierung kann mit Zytokinen hervorgerufen werden. Zytokine sind körpereigene Peptide mit proinflammatorischen, immunregulatorischen, wachstumsregulierenden oder anderen steuernden Funktionen, die von aktivierten T-Zellen oder anderen Zellen während der natürlichen oder spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Eine herausragende Rolle in der Tumorummunologie bilden folgende Zytokine: IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- γ , GM-CSF und TNF- α (91).

Zytokin	Freisetzung	Funktion
IL-2	aktivierte T-Zelle	Proliferation/Aktivierung von CTL, Th, NK
IL-4	aktivierte Th	humorale Immunantwort (Th2); APC Differenzierung
IL-6	T-Zelle	inflammatorisches Zytokin
IL-7	Stromazelle	Proliferation von lymphoiden Stammzellen; Differenzierung von T-/B-Zellen
IL-12	APC	Aktivierung von NK, LAK, CTL, Th1
IL-18	Makrophage	Proliferation/Aktivierung von CTL, Th1, NK, B-Zellen
IFN- α	Leukozyt	Proliferationshemmung (Tumor), Aktivierung LAK
IFN- γ	T-Zelle	Aktivierung von NK und Makrophagen
GM-CSF	T-Zelle	APC Differenzierung und reifung
TNF- α	Makrophage	Proliferation/Aktivierung von LAK, Makrophagen

Die immunstimulatorischen Proteine können entweder direkt appliziert oder ihre genetische Information mit entsprechenden gentherapeutischen Mitteln in das Tumorgewebe eingeschleust werden. Das direkte Einbringen durch eine Injektion beschreibt die Immunmodulation und kann systemisch oder lokal erfolgen. Zur besseren Erreichbarkeit schwer therapierbarer Metastasen eignet sich die systemische Applikation der Zytokine. Klinische Studien mit systemischer Gabe von IL-2 zeigen im Durchschnitt eine Ansprechrate von 20% bei einer Langzeitremission von 3%. Es sind jedoch hohe Dosen an IL-2 nötig, um dieses zu erreichen. Demgegenüber stehen die teilweise schweren toxischen Nebenwirkungen von IL-2, die eine systemische Gabe des Zytokins erschweren (92). Das Immunsystem gegen Tumorzellen zu aktivieren, stellt eine weitere Strategie in der Krebsbekämpfung dar. Bei der Erforschung dieser Strategie stehen die hohe Spezifität immunologischer Prozesse und eine systemische, also körperweite Abwehr von Tumorzellen als Ziele im Vordergrund (93). Zytokine nehmen in diesem Ansatz eine Schlüsselposition ein. Ihr Einsatz ist jedoch bislang mit geringer Wirksamkeit und hoher Toxizität verbunden. (94). Beispiele potenter tumorizidalen Agenzien, mit immunmodulatorischen Eigenschaften sind u.a. die Zytokine IFN- γ , Fas/FasL und TNF- α (95). Obwohl der Einsatz zu einer Tumorabstoßung führt, ist der Ansatz einer systemischen körperweiten Abwehr durch die systemische Toxizität begrenzt (96, 97). Ein weiterer Ansatz beruht auf Unterstützung der antitumoralen Antwort des Immunsystems durch ein geeignetes therapeutisches Transgen und der daraus resultierenden Reduktion des induzierten immunsupprimierenden Effektes. Wie bereits beschrieben, zeigen solide Tumore Fähigkeiten, der wirtseigenen Immunantwort zu entgehen. Einer der initialen Hauptfaktoren besteht in der Sekretion des pleiotropen Zytokins TGF- β und der damit aktiven Unterdrückung der möglichen Abstoßung des Immunsystems (98). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Inaktivierung des TGF- β -Signalweges, vermittelt durch eine dominant-negative Variante des TGF- β -II-Rezeptors, zu einer Regression des

Tumorstadium im Mausmodell führt (99), (100), (101). Bei der dominant negativen Variante dieses Rezeptors handelt es sich um ein membranständiges Oberflächenprotein, bestehend aus der extrazellulären „Binding-Domain“ und der Transmembran-Domäne. Studien, bei denen diese Rezeptorvariante im Tierversuch eingesetzt wurde belegen jedoch, dass eine konstitutive Expression dieses dominant negativen Rezeptors in den Mäusen zu dahingehend erheblichen Nebenwirkungen führt, dass alle Versuchstiere im Verlauf der ersten neun Monate posttransplant sterben (101). Ebenso wie das beobachtete lymphoproliferative Syndrom in TGF- β -1 „knock-out“ Mäusen, zeigen sich drastische Nebenwirkungen bei einer konstitutiven Expression der Dominant negativen Variante des TGF- β -II Rezeptors. Alle Versuchstiere zeigen einen hohen Anstieg an myeloiden Zellen (vornehmlich Monozyten/Makrophagen), der mit Kachexie und einer erhöhten Mortalität in dieser Versuchstiergruppe, die letal bestrahlt und mit dem dominant negativen Rezeptor transduzierten Stammzellen rekonstituiert wurden, verknüpft ist (101).

Dieses verdeutlicht die Notwendigkeit einer kontrollierten Expressionskapazität der therapeutischen Transgene. Eine zeitliche und räumliche Kontrolle eines therapeutischen Transgens *in vivo* könnte daher einen erfolgreichen Lösungsansatz in der Gentherapie von Tumoren darstellen.

Einsatz von induzierbaren Promotoren

Aus diesem Grund werden Strategien gesucht, um eine räumliche und zeitliche auf den Tumor eingegrenzte Anwendung der Zytokine zu erreichen. Lokale Applikationstechniken für rekombinante Proteine wie das Einkapseln in Trägermaterialien erlauben zwar dieses (102), es bleibt jedoch die kostspielige Herstellung und aufwändige Aktivitäts- und Stabilitätsprüfung. Umgehen lässt sich dieses durch den Einsatz verschiedener gentherapeutischer Verfahren. Die erste Möglichkeit besteht im Einbringen der genetischen Information für das Transgen durch lenti- oder retrovirale Transduktion der Tumorzellen. Das Ergebnis wäre die Expression des therapeutischen Transgens durch die Tumorzellen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (103). Durch den Einsatz der retro- bzw. lentiviralen Vektoren kann benachbartes gesundes Gewebe jedoch ebenso transduziert werden, wie die Zielzellen, da den Vektoren die ausschliessliche Tumorspezifität fehlt. Um eine unkontrollierte Transgenexpression im gesunden Gewebe zu verhindern, ist es notwendig, diese zu kontrollieren und somit lokal zu begrenzen. Die meisten Strategien zur kontrollierten Transgenexpression erfolgen durch biochemische Stimuli. Der Einsatz von zellspezifischen Promotoren, wie z.B. der Prostata-spezifische-Antigen Promotor (104), oder die „disease-specific-gene activation“ (105), ermöglicht eine selektive Transgenexpressionskontrolle in verschiedenen Tumorgeweben. Hypoxie- und Angiogenesegene sind in der Regel in Bereichen schnellwachsender Zellen, wie im Tumorgewebe, überexprimiert. Die insuffiziente Sauerstoffversorgung führt zur Aktivierung des humanen-alpha-fetoprotein Promotors in hepatozellulären Carzinomen (106), so dass dieser Promotor ebenso zur kontrollierten Transgenexpression im tumoralen Gewebe genutzt werden kann. Eine weitere Strategie zur zwingend kontrollierten Genexpression in Verbindung mit sauerstoffarmen Regionen besteht in der Verwendung von bakteriellen Promotoren, die in der Regel unter anaeroben Bedingungen aktiviert

werden (107). Eines der bekanntesten und am besten charakterisierten Systeme zur temporären Expressionskontrolle ist das TET-ON/Tet-OFF-System (108), das auf dem bakteriellen Tetrazyklin-Operon basiert. Die Verwendung des TET-Systems ermöglicht jedoch keine räumliche Eingrenzung der Genexpression. Neben diesen biochemischen und metabolischen Ansätzen zur temporär-lokalen Transgenexpressionskontrolle kann durch äußere physikalische Stimuli ebenso eine kontrollierte Genexpression erwirkt werden. Der Einsatz von ionisierender Strahlung ermöglicht z.B. eine zeitliche und räumliche Expression des unter dem EGR-1-Promotor stehenden TNF- α -Gens (109), (110). Weitere radiosensitive Promotoren sind der C-IAP2- und WAF1-Promotor und der Maus-Albumin-Promotor-Enhancer (111, 112). Der große Vorteil dieser radiosensitiven Promotoren besteht im präzisen Targeting der zur bestrahlenden malignen Fläche, in der eine Transgenexpression induziert werden soll. Allerdings zeigen die veröffentlichten Studien, dass die gegenwärtig zur Verfügung stehenden radiosensitiven Promotoren eine geringe Induzierbarkeit bei einer gleichzeitig sehr hohen Strahlungsbelastung (bis zu 20 Gy) aufweisen (113). Ferner zeichnen sich diese Promotoren durch eine sehr hohe Basalexpression (Transgenexpression in Abwesenheit des Stimulus) aus. Diese als „leakiness“ bezeichnete Eigenschaft, kann zu einer ungewollten Transgenexpression des therapeutischen Transgens und damit verbunden, zu einer systemischen Toxizität führen (114). Im Gegensatz dazu steht der Ansatz der hyperthermie abhängigen Transgenexpression. Die Heat-shock-Protein (HSP) Promotoren zeigen eine hohe Induzierbarkeit bei gleichzeitig niedrigem Basalexpressionsniveau (114), jedoch bei einer geringeren Auflösung des Areal, im Vergleich zu radiosensitiven Promotoren, in dem die Transgenexpression induziert werden soll.

Heat-Shock Protein (HSP)-70

HSP70-Systeme spielen bei den unterschiedlichsten zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Komponenten des HSP70-Systems konnten bisher in allen untersuchten prokaryontischen und eukaryontischen Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten identifiziert werden. Wegen der erhöhten Expression der HSP70-Proteine unter Hitzestress werden diese auch als Hitzeschockproteine (HSP) klassifiziert, obwohl inzwischen auch konstitutiv exprimierte homologe Proteine bekannt sind

Die gesteuerte Genexpression kann infolge von Hyperthermie bis zu dem 100-fachen über dem basalen Expressionsniveau liegen (115). Die Funktion der vom HSP70-Promotor kontrollierte Expression des HSP70-Proteins liegt u.a. in der Sicherstellung korrekter Proteinfaltungen unter Stressbedingungen, so dass HSP70 die Proteine gegen Hyperthermie, pH-Änderung und anderen Stressfaktoren schützt (115). Aber auch die Aktivierung des Promotors durch Hypoxie konnte gezeigt werden (116), (117). Durch diese Charakteristika der lokalen und temporären Aktivierung des Promotors eignet sich dieser zur Anwendung unter diesen Randbedingungen der kontrollierten Genexpression (118). Der erfolgreiche Einsatz des Promotors konnte sowohl *in vitro* (119), (114), (120) als auch *in vivo* (121) gezeigt werden.

Gentransfer und Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man eine medizinische Intervention, bei der Gene in Zellen eingeführt werden, um Krankheiten zu diagnostizieren oder zu heilen (122).

Gentherapeutische Ansätze zur Tumorthherapie

In der Onkologie bzw. Tumorthherapie werden fünf unterschiedliche Ansätze verfolgt (123), (87), (124), (125), (126): Zum einen können Gene in die Tumorzellen eingeschleust werden, deren Produkte entweder zum Absterben der Zelle führen (Suizidgentransfer), immunstimulierend wirken (Tumorvakzinierung) oder als Tumorsuppressoren wirken (Tumorsuppressorgentransfer); zum anderen versucht man, schnell-proliferierende Nicht-Tumorzellen vor den Nebenwirkungen der Chemotherapie durch den Transfer von Resistenzgenen zu schützen (Resistenzgentransfer). Der letzte Ansatz beschreibt die adoptive Immuntherapie: Im Rahmen der Leukämiebehandlung wird häufig mittels Chemo- und Strahlentherapie das gesamte hämatopoietische System des Patienten und damit auch die leukämischen Blutzellen zerstört. Da sich das gesamte blutbildende System aus Stammzellen regenerieren lässt, kann der Patient anschließend durch Knochenmarktransplantation eines Spenders gerettet werden. In einigen Fällen tritt jedoch eine Autoimmunreaktion beim Empfänger auf (*graft-versus-host-disease*), die durch Spender-Immunzellen (genauer: T-Zellen) im Transplantat hervorgerufen wird. Transduziert man die T-Zellen *ex vivo* vor Retransplantation mit einem Suizidgenvektor, können, falls es zu einer Immunreaktion kommt, die transduzierten Zellen selektiv eliminiert werden.

Transfer von genetischem Material in das Zielgenom - Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind die häufigsten und am besten charakterisierten Vektorsysteme, die derzeit bei einem Gentransfer von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen angewendet werden (127). Die meisten dieser Vektoren sind abgeleitet von den Mausleukämieviren (MLV) oder dem humanen Immundefizienzvirus (HIV). Ein essentieller Teil des Lebenszyklus von Retroviren bringt es mit sich, dass sie ihr Genom mit hoher Effizienz stabil in das Wirtsgenom integrieren, um RNA und Proteine exprimieren zu können. Das gleiche gilt für ein Transgen, das in einen Vektor integriert wird.

Aufbau der Retroviren

Infektiöse Partikel der verschiedenen Vertretern der *Retroviridae* haben einen ähnlichen Aufbau mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 100nm.

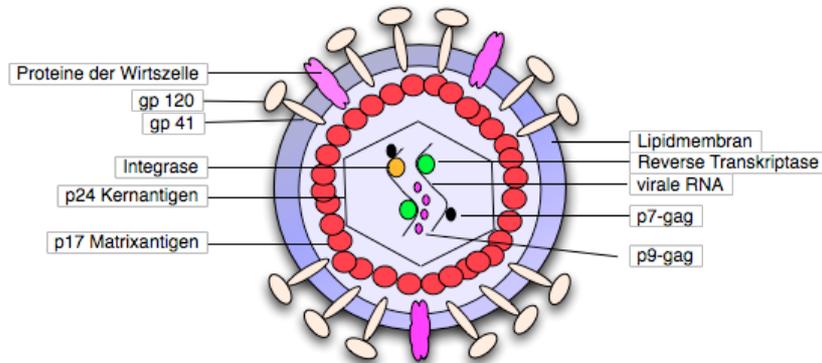


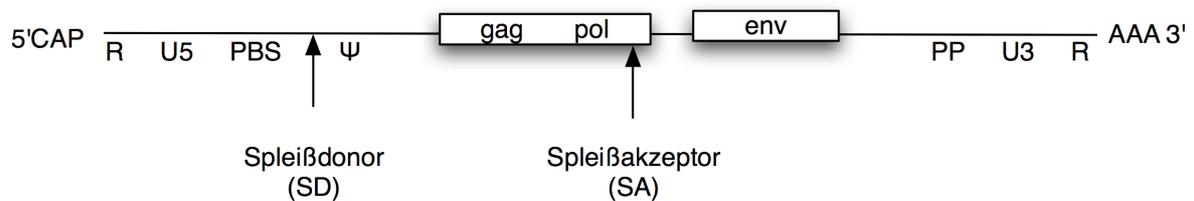
Abbildung 4: Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel des humanen Immundefizienzvirus Typ1 (HIV-1).

Im Partikelinnern befindet sich das Capsid; je nach Virus sphärisch-ikosaedrisch oder konisch. Das Capsid, bestehend aus dem Capsidprotein (p24), die wie die Matrixproteine, Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (*gag*-Proteine) sind. Es enthält zwei virale einzelsträngige RNA-Genome (128). Sie enthalten alle Charakteristika einer zellulären mRNA und liegen im Komplex mit den Nucleocapsidproteinen (p7, NC) vor. Umgeben wird das Capsid von einer Hüllmembran, die von der wirtseigenen Cytoplasmamembran abgeleitet ist und die externen und die transmembranen Glycoproteine (gp120 und gp41) enthält. Ausgekleidet wird die Innenseite des Partikels von einer Schicht von Matrixproteinen (p17, MA). Das Link-Protein (p6, LI) verbindet das Capsid mit der Membran; virale Glycoproteine sind mit dieser assoziiert.

Genomarchitektur und funktionelle Organisation der Mausleukämieviren

Das retrovirale Genom besteht aus zwei RNA-Strängen, die mit der 5'-CAP-Struktur und 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA aufweist.

RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels



Integrierte Provirus-DNA

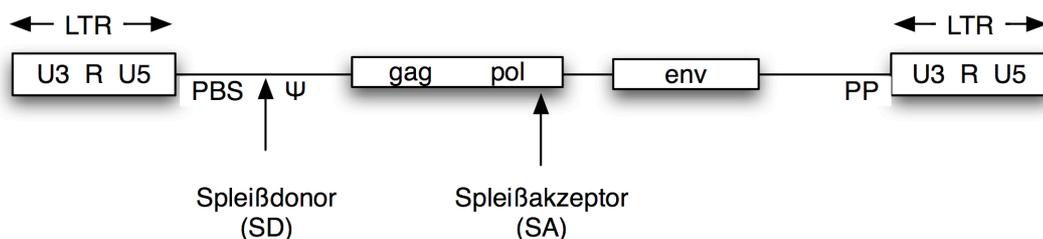


Abbildung 5: Genomorganisation einfacher Retroviren am Beispiel von MLV. Oben: Darstellung als genomische RNA. Unten: Darstellung der proviralen Form. (LTR: long terminal repeats; PBS, Primerbindungsstelle, SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, ψ : Verpackungssignal; PP: Polypurintrakt, gag, pol, env: kodierende Regionen für Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine).

Die redundante Region (R-Region) am 5'-Ende liegt in identischer Basenfolge und Orientierung ebenfalls am 3'-Ende des Genoms vor. Diese Region trägt sowohl Transkriptionsstartpunkt als auch ein Signal zur Termination. Die U5-Region (U=unique) ist für eine Integration des Provirus in das Zielgenom notwendig. Die Primerbindungsstelle (PBS) ist mit dem 3'-Ende eines tRNA-Moleküls über Basenpaarung komplexiert. Das freie Hydroxylende (3'OH) stellt den Startpunkt der reversen Transkription dar. Die Sequenzfolge zwischen PBS und den *gag*-Genen wird als Leader-Region bezeichnet. Diese umfasst die Spleißdonorstelle, die für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle verantwortlich ist. Bei den komplexen Retroviren werden hier die akzessorischen Proteine translatiert. Die als Verpackungssignal (ψ) definierte Sequenzfolge dient der Anlagerung der RNA-Genome bei der Morphogenese der sich bildenden Viruspartikel an die Nucleocapsidproteinabschnitte. Im Anschluß an diese Sequenzfolge folgen die für Proteine kodierenden Gene. In diesem Abschnitt liegt der Polypurintrakt (PPT), der für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription zuständig ist. Im Anschluß folgt die U3-Region. Analog zu der U5-Region wird sie nach ihrer Lage am Ende des 3'-Endes des Genoms bezeichnet. Wie bei der U5-Region sind hier die notwendigen Sequenzen für eine Integration und für die Genexpression des in das Wirtsgenom integrierten Provirus lokalisiert. Diese Basenfolge ist essentiell, da sich hier die Promotoren und *cis*-aktiven Elemente befinden. Transaktive zelluläre Proteine binden an diese Region, die so die virale Transkription und Genexpression regulieren. Auf die U3-Region folgt ein weiterer redundanter Bereich sowie ein PolyA-Signal.

Retroviren als Transfervektoren

Bei den in den bisherigen klinischen Studien eingesetzten gentherapeutischen Transfervektoren handelt es sich auf dem Murinen Leukämie Virus (MLV) basierende retrovirale Vektoren. Die Generation dieser replikationsdefekten Vektoren beruht auf der Deletion und dem Austausch aller Protein-kodierender Sequenzen gegen ein Transgen. Jedoch müssen bestimmte *cis*-Elemente auf der viralen RNA codiert sein, damit der virale Lebenszyklus für eine Runde gewährleistet werden kann. Hierzu zählen die terminalen Integrationsstellen der U3- und U5-Region, die R-Region (inklusive Verpackungssignal und PBS), der PPT, Promotor- und Enhancersequenzen. Da die kodierenden Regionen für Gag/Pol und Env separat von diesen *cis*-Elementen der RNA angeordnet sind, können sie in MLV-abgeleiteten Vektoren leicht von dem Vektor ausgeschlossen werden und von kotransfizierten Plasmiden in Verpackungszellen exprimiert werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination mit verwandten viralen Sequenzen von endogenen Viren in der Verpackungs- oder Zielzelle und damit die Entstehung von möglicherweise neuen replikationskompetenten Viren, die unter Umständen pathogen sind, herabgesetzt (129, 130) und die Sicherheit des Vektorsystems gesteigert. Ferner werden die in den LTRs vorhandenen viralen Promotoren durch nicht-virale counterparts ersetzt, so dass eine Entstehung replikationsfähiger Retroviren durch Rekombination überlappender Sequenzen sehr unwahrscheinlich ist. Um die Effizienz und die Sicherheit der Vektoren zu erhöhen, wurden im Laufe der Zeit viele Veränderungen der Transfervektoren vorgenommen. Eine der wichtigsten Veränderungen, die die Effizienz der Virusproduktion betrifft, war das Ersetzen der U3-Region des 5'-LTRs mit der „immediate-early“ Region des humanen Cytomegalievirus (CMV)-Enhancer/Promotors. Das entstandene CMV/LTR-Hybrid hat in geeigneten Produzentenzellen eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität und führt nach Kotransfektion mit ebenfalls CMV-Promotor-getriebenen Helferplasmiden zur Generierung hochtitriger Virusüberstände (131). Bei den einfachsten Vektoren erfolgt die Expression des Transgens in den Zielzellen über den 5'-LTR des integrierten Provirus.

Lentiviren

Lentiviren gehören zu den komplexen Retroviren (128). Neben den für die viralen Strukturproteine und Enzyme kodierenden Genen *gag*, *pol* und *env*, die auch die Onkoretroviren und andere Retroviren besitzen, tragen Lentiviren zusätzliche, für regulatorische und akzessorische Proteine kodierende Sequenzen. Für den Replikationszyklus sind die regulatorischen Gene essentiell, während die akzessorischen Gene *in vitro* zumeist entbehrlich sind (132).

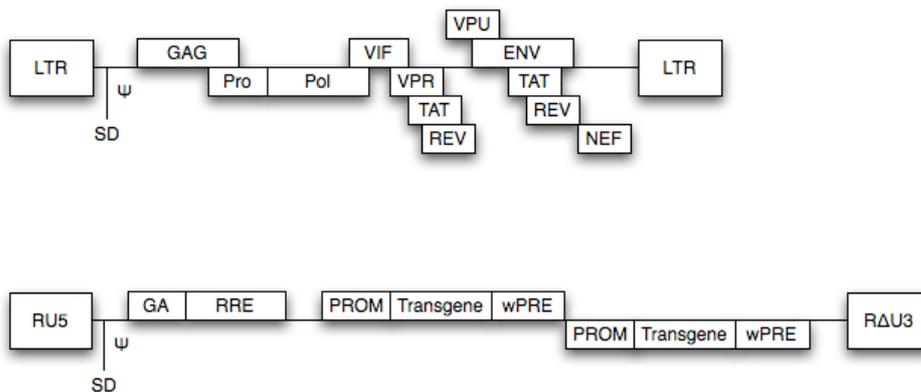


Abbildung 6: Modulare Darstellung des Aufbaus eines lentiviralen Vektorsystems. Oben: Darstellung des Provirus; Unten: eingesetztter selbstinaktivierender (SIN) lentiviraler Transfervektor: pRRL.sin18-. Der 3'-LTR umfasst eine komplette Deletion der U3-Region. Im Zuge der reversen Transkription stellt der 3'-LTR die Matrize für beide LTRs. Hieraus resultiert eine Transduktion dieses Vektors in einer transkriptionellen Inaktivierung der 5'-LTR.

Im Gegensatz zu den Onkoretroviren besitzen Lentiviren das Potenzial ihr Genom auch in nicht teilungsaktive Zellen zu integrieren. Ausserhalb der Mitose wird der Prä-Integrationskomplex bei Lentiviren von der zellulären Kernimportmaschinerie ebenfalls erkannt. Der Transport in den Kern erfolgt aktiv mit Hilfe der Integrase durch die Poren einer intakten Kernmembran (133, 134). Diesen Vorteil der Lentiviren ausnutzend wurden verschiedene auf Lentiviren basierenden (Primaten und andere Spezies) rekombinante Gentransfer-Vektoren etabliert. Im Fokus standen dabei die Entwicklung von abgeleiteten Human Immundeficiency Virus (HIV-1) Vektoren. Es wurden mehrere Generationen dieser replikationsdefizienter, vermeintlich sicherer Vektoren entwickelt, die hinsichtlich ihrer biologischen Sicherheit als unbedenklich angesehen werden. Das eingeschränkte Wirtsspektrum dieser Viruspartikel (Lymphozyten, Makrophagen), kann durch eine sogenannte Pseudotypisierung erweitert werden. Die Pseudotypisierung beschreibt die Fähigkeit, virale Vektoren mit Hüllproteinen anderer Viren infektiöse Partikel zu bilden. Hierzu wird insbesondere das VSV-G-Protein („Vesicular Stomatitis Virus“) zur Verpackung der lentiviralen Vektoren verwendet. Das VSV-G Hüllprotein besitzt ein unspezifisches Wirtsspektrum, so dass pseudotypisierte lentivirale Partikel unterschiedliche Zellen infizieren können (135-137).

Arbeitsziel

Solide Tumore werden durch die Infiltration von Elementen des hämatopoietischen Immunsystems charakterisiert. Solide maligne Tumore bestehen zum einen aus neoplastischen Zellen und der sie umgebenden Extrazellulärmatrix und zum anderen aus einer Vielzahl nicht-neoplastischer Zellen, unter denen Fibroblasten, Endothelzellen, T-Lymphozyten und Makrophagen den größten Anteil ausmachen. So kann die Gesamtmasse eines soliden malignen Tumors bis zu 80 % aus Immunzellen bestehen, vor allem aus mononukleären Zellen (140) T-Lymphozyten, welche in den Tumor und in die Mikroumgebung des Tumors eindringen, werden als tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) (141), Makrophagen als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) (142) bezeichnet. B-Lymphozyten und NK-Zellen kommen nur in sehr geringem Umfang im Tumordinfiltrat vor (7, 143). Das Ziel dieser Arbeit besteht nunmehr in der Unterstützung dieser infiltrierenden hämatopoietischen Zellen in einer erfolgreichen Immunantwort gegen Tumore. Der immunsupprimierende Effekt von TGF- β wurde bereits ausführlich besprochen. Die Hypothese dieser Arbeit beruht auf einer Unterstützung der antitumoralen Antwort des Immunsystems durch die rezeptorvermittelte Inaktivierung des TGF- β -Signalweges und somit der Neutralisation des negativen immunsupprimierenden Effektes. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Inaktivierung dieses Signalweges vermittelt durch eine dominant-negative Variante des TGF- β -II-Rezeptors in eine Regression des Tumorwachstums im Mausmodell führt (99-101). Die konstitutive Expression dieses Rezeptors in den hämatopoietischen Zellen der Versuchstiere führt jedoch zu einer erhöhten Morbidität sowie Mortalität der Tiere dahingehend, dass die prozentuale Überlebensrate neun Monate posttransplant bei 0 liegt (101). Die Möglichkeit der systemischen Toxizität durch eine konstitutive Expression eines Transgens wurde bereits ausführlich besprochen. Umgangen kann diese mögliche systemische Toxizität durch den Einsatz eines kontrollierten Genexpressionssystemes, das eine zeitliche und räumliche Expressionskontrolle erlaubt.

Im Verlauf dieser Arbeit soll ein „SIN“-retro- und „SIN“-lentivirales induzierbares Expressionssystem basierend auf dem HSP-Promotor konstruiert, charakterisiert und etabliert werden. Im weiteren Verlauf werden diese verschiedenen viralen Systeme auf ihre Effektivität in der Transduktionseffizienz von hämatopoietischen Stammzellen hin verglichen. Die Charakterisierung des eingesetzten induzierbaren HSP-Promotors erfolgt sowohl *in vitro* als auch *in vivo*; zunächst mit GFP als Markergen. In den *in vitro* Versuchen werden durch retro- bzw. lentivirale Manipulation Zelllinien generiert, bei denen das Markergen unter der Kontrolle des induzierbaren bzw. eines konstitutiven Promotors stehen. Anhand der GFP Expression kann zum einen die Induzierbarkeit des HSP-Promotors im Durchflusszytometer nachgewiesen und quantifiziert werden. In den *in vivo*-Versuchen werden immunsupprimierten Versuchstiere retro- bzw. lentiviral manipulierten Stammzellen transplantiert. Ebenso wie in den *in vitro* Versuchen steht das GFP-Transgen unter der Kontrolle des HSP- bzw. CMV-Promotors. Im Anschluss an die Transplantation erfolgt die Injektion einer Gliomzelllinie. Anhand des im Tier gewachsenen Tumors können die infiltrierenden Zellen nach Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt werden. Ferner kann die GFP Expression, unter der Kontrolle des induzierbaren HSP-Promotors, in den verschiedenen infiltrierenden Zellpopulationen bestimmt und verglichen werden.

Nach Etablierung dieser „Proof-of-Principle“ Versuche wird im weiteren Schritt der kurative Effekt des unter dem induzierbaren Promotors stehende therapeutische Transgens evaluiert werden. Es handelt sich bei diesem Transgen um die bereits beschriebene dominant negative Variante des TGF- β -Rezeptors. Letal bestrahlten Tieren werden, analog zu den „Proof-of-principle“-Versuchen, Stammzellen, die diesen Rezeptor unter der Direktion des HSP-, bzw. CMV-Promotors exprimieren, transplantiert. Nach erfolgreicher Rekonstitution erfolgt die Injektion der Gliomzellen mit anschließendem Monitoring des Tumorwachstums.

Diese Experimente eröffnen neue Wege im Einsatz der Gentherapie in der Tumorforschung. Durch den Einsatz eines neuen Vektorsystems, dass eine streng kontrollierbare Transgenexpression ermöglicht, können neue Wege in der Tumorthherapie besritten werden.

Kapitel 2 Material & Methoden

Molekularbiologie

Luria Bertani (LB) medium

10g Tryptone peptone, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7.4 mit 10N NaOH eingestellt. Falls benötigt, wird dem autoklaviertem LB-Medium steril filtriertes Ampicillin in einer finalen Konzentration von 100mg/l zugeführt. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wird dem Medium vor Sterilisation Bacto-Agar in einer finalen Konzentration von 1.5% (w/v) beigefügt und im Anschluß autoklaviert. Das sterile LB-Medium wird dann in Petrischalen zu einem Volumen von 25ml portioniert. Die fertigen LB-Agar-Platten werden anschließend bei 4°C gelagert.

Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von E.coli Bakterien beginnt mit dem Picken einer Kolonie einer mit E.coli bewachsenen LB-Agarplatte. Diese Kolonie wird in Flüssigmedium mit Antibiotikumzusatz bei 37°C in einem aeroben Schüttelinkubator 16 Stunden bei 220rpm inkubiert.

Stammhaltung

Zur Stammerhaltung werden transformierte Bakterien in einem Glycerol-Stock gehalten. Hierzu werden 0.5ml 87% steriles Glycerol mit 0.5ml der Bakterienkultur gemischt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Präparation und Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Bakterien

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der E.coli-Stamm XL-1Gold der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Dieser zeichnet sich durch eine besonders niedrige Rekombinationsfrequenz sowie eine hohe Transformierbarkeit aus.

Die Präparation der chemisch kompetenten E.coli-Stämmen wurde gemäß Protokoll (144) durchgeführt. Die anschließende Transformation der Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte gemäß *Sambrock et al.* (1989).

Flüssigkulturen von Bakterien

Die Kultivierung von transformierten Bakterien erfolgte in Gegenwart eines Antibiotikums. Für kleine DNA-Präparationen wurden sterile Röhrchen mit 5ml LB-Amp mit Bakterien von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm geschüttelt. Zur Großaufreinigung von DNA wurden 230ml LB-Amp in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und für 16 Stunden geschüttelt.

Elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA mittels Agarose Gel-Elektrophorese

Die Separation der DNA erfolgte mittels eines 0.6% bis 2% (in Abhängigkeit der erwarteten DNA-Fragmentgröße) Agarosegels. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTAE-Buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.4) unter Benutzung eines Mikrowellengerätes zum Schmelzen gebracht. Im Anschluß wurde die heiße Lösung in die entsprechenden Gelkammern nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 2µg/ml umgefüllt. Nach Festwerden der Agaroselösung wurden die DNA-Proben mit einem Ladepuffer (0.15% Bromphenolblau, 0.10 Xylenecyanol, 50mM EDTA/pH 8.0, 50% Glycerol in aqua dest.) gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE Puffer zwischen 600-100Volt. Nach der erfolgten Auftrennung wurde das Agarose Gel für 20 Minuten in 1x TAE entfärbt und die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektiert. Der Größenvergleich erfolgte mit entsprechenden DNA-Größenmarkern; i.d.R mit HindIII verdaute Lamnda-Phagen DNA oder einer 1 kB-Leiter. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254nm) sichtbar gemacht und mittels einer angeschlossenen Kamera mit angeschlossenenem Drucker (Sony, Tokio) dokumentiert.

Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die Gelstückchen mit den benötigten DNA-Fragmenten wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung unter langwelligen UV-Licht (366nm) ausgeschnitten. Die Gelextraktion wurde mit dem *QiaexII-Gel-Extraction-Kit* der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Restriktionsverdau der DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Die Spaltung der Vektor-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen wurden gemäß Herstellerangaben (NEB, Fermentas) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

Glätten der sticky-end sites in blunt-end sites

Mit Hilfe der Klenow-Reaktion konnten die überhängenden Enden der sticky-end sites durch Auffüllen in glatte (blunt-end sites) überführt werden. Die enzymatische Umwandlung erfolgte mit Hilfe des Klenow-Enzyms der Firma Roche. Die Enzymreaktion wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Die enzymatische Abspaltung der 5'-Phosphomonoester ist besonders bei Ligasereaktionen notwendig, um eine intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern. Dieses geschieht in der Regel, wenn der Vektor mit nur einem Enzym geschnitten wurde. Die Reaktion erfolgte unter Einsatz der *Antarctic-Phosphatase* der Firma NEB. Die enzymatische Reaktion wurde gemäß

Herstellerangaben durchgeführt.

Ligation der DNA-Fragmenten

Die Ligation der Vektor DNA mit dem DNA-Fragment wurde in einem molaren Verhältnis von 1:6 in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Die T4-Polymerase der Firma *Fermentas* wurde gemäß Herstellerangaben eingesetzt und die Ligation durchgeführt.

Minipreparation von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Bakterien erfolgte mit dem *QiaprepMiniPrep-Kit* der Firma *Qiagen* gemäß Herstellerangaben

Maxi-Preparation von Plasmid DNA

Zur Isolation größerer Mengen an Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Bakterien wurde das Produkt *Endo-Free-Plasmid Maxi-Kit* der Firma *Qiagen* nach Herstellerangaben eingesetzt.

Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR Reaktionen wurden in einem Ansatz von 20 bis 50µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250 nM dNTPs, 25-50 ng Template-DNA, 1 pmol/µl Primer, 1 U Polymerase-Mix (Taq Polymerase und Pfu Polymerase 50:1), Puffer (20 mM Tris/HCl, pH=8, 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂).

Arbeiten mit Säugetierzellen

Zellkulturmedium	Anmerkungen
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium
IMDM	Isocove's Modified Eagle's Medium
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

Zusätze	Anmerkungen
10% FKS	Fetales Kälberserum, wärmebehandelt 60min bei 56°C
Antibiotika	100IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
2-Mercaptoethanol	1% in RPMI-Vollmedium
G418 (Genitacin)	1mg/ml

Die Medien und Zusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich verwendet.

Verwendete Lösungen für die Zellkultur

CaCl ₂ -Lösung	250 mM CaCl ₂ . Sterilisiert durch Filtration. -20°C
Chloroquin-Stammlösung	25 mM Chloroquindiphosphat (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio) in PBS.
Einfriermedium für Zellen	FKS 50%, DMSO 10% und DMEM- oder RPMI-Medium 40%.
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O, 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH=7.3. Sterilisiert durch Autoklavieren.
Polybren-Lösung	8 µg/ml Polybren (Sigma, Deisenhofen) in PBS.
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin 0.5 g/l, EDTA 0.2 g/l in PBS. -20°C
RBC-Lysepuffer	7 mM Tris, 140 mM NH ₄ Cl, pH 7.65
MACS-Puffer	1x PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA

Verwendete Zielzellen

293T	Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie	DuBridge et al., 1987
SC-1	Zelllinie aus Mäusefibroblasten	Hartley et al., 1975
A549	Humane alveolar Epithelzellen	Lieber et al., 1976
GL-261	Murine Gliomzelllinie	Ausman et al., 1970

Zellkultur

Wenn nicht anders angegeben, wurden sämtliche Zellen in DMEM, versetzt mit 10% FKS, 2mM Glutamin und Antibiotika (100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die adhären Zellen nach Waschen mit PBS vom Boden des Gefäßes durch Trypsin gelöst und nach einem Waschschrift nach Bedarf in neue Zellkulturgefäße überführt.

Transfektion von Säugetierzellen

Sämtliche Transfektionen in 293GPG bzw. 293T-Zellen wurden ausschließlich mit der Calciumphosphatmethode nach Chen *et al.* (145) durchgeführt. Hierzu wurden 5x10⁶ 293T-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in Zellkulturschalen (Durchmesser 10cm) ausgesät. Am folgenden Tag wurde unmittelbar vor Transfektion das Medium abgenommen und durch 4ml frisches DMEM-Medium inklusive der Zusätze ersetzt. Ferner wurde diesem Medium 25µM Chloroquin zugesetzt. Chloroquin inaktiviert lysosomale DNAsen und führt dadurch zu einer erhöhten Transfektionseffizienz. 8µg Transfervektor-DNA, 12µg gag/pol (M13), 5µg Rev-DNA und 5µg eines vsv/G-Expressionsplasmides wurden mit 50µl 2.5M CaCl₂ vermischt. Das Gemisch wurde auf 500µl mit LowTE-Puffer aufgefüllt und durch Einleiten von Luftblasen mit 500µl 2xHeBS Puffer vermischt. Nach einer exakten Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch vorsichtig auf die Zielzellen getropft. Die Zellen wurden für 14 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Weiterkultivierung unter den genannten Bedingungen. Ab 36 Stunden nach Transfektion konnte der virushaltige Überstand gesammelt und weiter verwendet werden. Nach Filtration durch einen 0.22µm Porenfilter konnte dieser Virusüberstand aliquotiert und bei -80°C für mehrere Jahre gelagert werden.

Retro- und Lentivirale Transduktion von adhärenenten Zellen

Zur Generierung von GFP-exprimierenden A549 und GL261-Zellen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren wurden jeweils 16 Stunden vor Transduktion 50.000 Zellen in eine 6-well-Schale ausgesät. Kurz vor Zugabe der viralen Partikel wurde das Medium entnommen und durch 1ml frisches Medium, das zusätzlich Polybren in einer Konzentration von 8µg/ml enthielt, zugesetzt. In Abhängigkeit der Multiplicity Of Infection (MOI) wurden die viralen Partikel in das Medium gemischt und die Zellen plus Viren für weitere 16 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert. Anschliessend wurde das Medium durch frisches nicht-virus enthaltendes Medium ersetzt. Nach 48 Stunden posttransduktion konnte die GFP-Expression durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Bestimmung des Virustiters

10.000 A549-Zellen wurden in eine 6-well-Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen gemäß Transduktionsprotokoll transduziert. Variabel war hierbei das Volumen des zugesetzten viralen Überstandes, der in Verdünnungen pur bis hin zu 1: 10.000 zugegeben wurde. Zusätzlich wurde eine Kontrolle angesetzt, die keinen Virus enthielt, welche aber anzeigte, wann nicht infizierte Zellen in Anwesenheit von G418 (Genitacin) abstarben. Einen Tag nach Viruszugabe wurde G418 in einer Konzentration von 1mg/ml zugegeben. Nach zehn bis zwölf Tagen wurde anhand der Kolonienzahl („colony forming units“) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe pro well der Virustiter bestimmt.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Titers bestand in der durchflusszytometrischen Analyse der GFP-exprimierenden Zellen nach Transduktion. 50.000 Zellen wurden gemäß Transduktionsprotokoll mit unterschiedlichen Volumina transduziert. Die GFP-Expression wurde 48 Stunden Posttransduktion durchflusszytometrisch bestimmt und der Titer berechnet.

Durchflusszytometrie - (FACS, fluorescence activated cell sorting)

Die zur FACS-Analyse benötigten Zellen werden als Einzelzellsuspension auf eine Dichte von 1x10⁵ Zellen pro 300µl eingestellt. Die Akquisition erfolgte an einem FACS-Calibur (BD, San Jose, USA), die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7 Software (Treestar, USA). Eine auf Durchflußzytometrie basierende Zellsortierung erfolgte an einem Moflo-Zellsorter (DAKO Cytomation, DK). Folgende monoklonale Antikörper (sofern nicht anders angegeben: BD Pharmingen, USA) wurden bei den Analysen benutzt:

CD3 ϵ -FITC & -biotin, CD4-FITC & -PE, CD8 α -FITC, -PE & -PerCP, CD11b-FITC & -biotin, CD11c-PE & -APC, B220-FITC, -PE, Ly-6A/E-PE, -FITC, CD117-PE, -APC.

Tierexperimente

C57BL/6 Mäuse

Die Arbeiten an den C57BL/6 Mäusen wurden in Übereinstimmung mit dem derzeit geltenden Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt.

Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung

Eine besonders geeignete Methode zur schnellen und komfortablen Anreicherung einer großen Menge an Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenmolekül exprimieren, ist die magnetische Zellsortierung (magnetic cell sorting = MACS). MACS erlaubt die Markierung der anzureichernden Zellen durch Antikörper, welche entweder direkt an kleine Metallpartikel gebunden sind oder durch einen Sekundär-Antikörper an diese konjugiert werden. Mit Hilfe eines Magneten und unter Verwendung spezieller Säulen lassen sich unmarkierte Zellen durch Waschen entfernen, während die an die Metallpartikel gebundenen Zellen zurückbleiben und anschließend von der Säule eluiert werden können.

Aufreinigung von murinem Knochenmark und Depletion von Lineage-Zellen

Das Knochenmark (KM) zur Gewinnung von Lineage-negativen Zellen wurde aus den *Femora* von sechs bis acht Wochen alten C57BL/6 weiblichen Mäusen gewonnen. Die bei der Autopsie entnommenen Knochen wurden nach Entfernung des umgebenden Muskelgewebes bis zur Knochenmarkentnahme in 1x MACS-Buffer aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Markhöhle eröffnet und das Mark mit einer 10ml Einmalspritze (Becton Dickinson, New Jersey, USA) und einer 27G1, 0.5x25mm Kanüle (Becton Dickinson, Dublin, Irland) mit 1x MACS-Puffer herausgespült. Die Homogenisierung der Zellsuspension sowie die Entfernung möglichen Fettgewebes erfolgte durch den Cell-Strainer (FIRMA). Die Depletion der Lineage-Zellen erfolgte mit dem *Lineage-Cell-Depletion Kit* (Miltenyi, Bergisch-Gladbach). Die Kultur der Lineage-negativen Zellfraktion erfolgt in serumfreien Expansionsmedium für hämatopoietische Zellen StemSpan (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) unter Zugabe der Wachstumsfaktoren für die Hämatopoese rekombinantes humanes Interleukin-11 (IL-11, Peprotech, New Jersey, USA), muriner Stammzellfaktor (mSCF, Peprotech, New Jersey, USA) und rekombinat humanes FLT3-Ligand (hFLT3-Ligand, Peprotech, New Jersey, USA) in 24 well-Platte bei einer Zelldichte von 1×10^6 /ml.

Retro- und Lentivirale Transduktion von murinen Lineage-negativen Zellen

VSV/G-pseudotypisierte virale Partikel wurden als Überstand von 293GPG (Retroviren) bzw. 293T (Lentiviren) abgenommen. 5×10^6 murine Lineage-negative Zellen wurden in einer 6-well-Platte

ausgesät und mit einer Multiplicity Of Infection (MOI) von 10 transduziert. Hierzu wurde das entsprechende Volumen an Virusüberstand den Zellen beigefügt. Die Transduktionseffizienz wurde durch Reduktion der Oberflächenspannung durch Zugabe von Polybren in einer finalen Konzentration von 8µg/ml gesteigert. Nachfolgend wurden die 6-well-Platten für 60 Minuten bei 700xg und Raumtemperatur zentrifugiert (Spin-Infection). Anschließend wurden die Zellen wieder resuspendiert und am nächsten Tag in frischem StemSpan inklusive Wachstumsfaktoren aufgenommen und bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert.

Transplantation von retro- und lentiviral modifizierten murinen Lineage-negativen Zellen

Die Immunsupprimierung der Mäuse erfolgte durch die Ganzkörperbestrahlung der Tiere in einem β -Linearbeschleuniger (Siemens) mit einer Dosisleistung von 10,5Gy bei einer Dosisrate von 0.5Gy pro Minute. Direkt im Anschluß wurden die Tiere im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover unter sterilen Bedingungen mit reguliertem Hell-Dunkel Rhythmus gehalten. Zur Transplantation wurden 1x10⁶ retro- bzw. lentiviral manipulierte Zellen pro Tier eingesetzt. Die Zellen wurden nach Zentrifugation in 250µl PBS aufgenommen und das Xenotransplantat langsam in die Schwanzvene (i.v) injiziert. Die Überwachung des Gesundheitszustandes der Tiere erfolgt täglich. Wurde durch die virale Manipulation der Zellen das GFP-Reportergen inseriert, kann nach 21 Tagen posttransplant Blut aus der Mandibularvene entnommen werden um die Transplantationseffizienz durchflusszytometrisch zu bestimmen. Hierzu wird das Blut in Röhrchen mit 0.05M EDTA gesammelt. Die Aufarbeitung erfolgt zunächst mit der Lyse der roten Blutkörperchen. Im Anschluß wird die Blutprobe im FACS gemessen. Anhand der GFP initiierten Fluoreszenz im FITC-Kanal kann die Effizienz bestimmt werden.

Transplantation von GL261-Zellen in rekonstituierte Mäuse nach der Stammzelltransplantation

Die Transplantation der murinen Gliomzellen GL261 erfolgte in den Rücken der rekonstituierten Mäuse nach der Stammzelltransplantation, indem 4x10⁵ GL261-Zellen s.c. appliziert wurden. Die Injektionsstelle wurde zuvor mit einem speziellen Tierhaarrasierer enthaart. Diese Enthaarung wurde alle vier Tage wiederholt. Das Tumorstadium wurde mit einer digitalen Schieblehre vermessen. Hierzu wurde an verschiedenen Punkten des Tumors der Durchmesser bestimmt und mit dem Mittelwert das Tumolvolumen gemäß der Formel $Vol = \frac{4}{3} (\pi * r^3)$ berechnet. Zeigte sich im Verlauf des Tumorstadiums eine Ulzeration wurde das betroffene Tier durch eine Dislokation der Nackenwirbel getötet.

Organentnahme von rekonstituierten Mäusen nach der Stammzelltransplantation

Um die operative Organentnahme der Milz und des Tumors der rekonstituierten Tiere durchzuführen und die hämatopoietischen Zellen in Milz und Tumor zu analysieren wurden die entsprechenden Tiere zunächst durch Dislokation der Nackenwirbel getötet und die Organe unter sterilen Bedingungen

entnommen und steril aufgearbeitet.

Isolation der hämatopoietischen Zellen aus muriner Milz und Tumorgewebe

Nach Tötung des Tieres durch Dislokation der Nackenwirbel wurde die Milz und der solide Tumor entfernt und bis zur Aufarbeitung in 1x PBS auf Eis aufbewahrt. Im anschließenden Schritt erfolgt die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz und Tumor. Die roten Blutkörperchen der Milz werden durch die RBC-Lyse aus der Zellsuspension entfernt und diese im Anschluß zur Beseitigung von Gewebeklumpen mit Hilfe eines Cell-Strainers (BD) homogenisiert. Mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml werden die Zellen bei 37°C, versetzt mit RPMI-Vollmedium zzgl. 1% 2-Mercaptoethanol (Gibco), in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert. Die Homogenisierung der Tumor-Einzelzellsuspension erfolgte ebenso mit dem Cell-Strainer. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Zellen bei 37°C, versetzt mit RPMI-Vollmedium zzgl. 1% 2-Mercaptoethanol (Gibco), in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert.

Induktionsexperimente zur Aktivierung der HSP getriebenen Transgenexpression

In A549- und GL216-Zellen

Zur Insertion der HSP-Promotor/Transgenkassette wurden die Zielzellen mit den verschiedenen lentiviralen Konstrukte transduziert. Hierzu sind 50.000 A549- bzw 50.000 GL261-Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert worden. Das Medium wurde kurz vor Transduktion abgesaugt und durch frisches Polybren (8µg/ml) enthaltendes Medium ersetzt. Die lentivirale Transduktion erfolgte bei einer MOI von 10. Nach weiteren 16 Stunden wurde das Medium durch DMEM-Vollmedium ersetzt. Die Passagierung der Zellen aus den 6-well-Platten in eine T25-Zellkulturflasche erfolgte nach ca. fünf Tagen.

Zur *in vitro* Charakterisierung des HSP-Promotors in den Zielzellen wurden 50.000 A549- bzw. GL261-Zellen aus der jeweiligen Bulk-Zellkultur ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ kultiviert. Ferner ist die Temperatur des Zellkulturinkubators, in dem die Induktion durchgeführt wurde, 24 Stunden vor Beginn auf die jeweilig erhöhte Temperatur eingestellt worden. Die Induktionsversuche wurden bei Temperaturen von 39°, 40°, 41°, 42°, 43°, 44° und 45°C durchgeführt. Die Länge der Induktionszeit unter den bestimmten Temperaturen wurde im Verlauf der Charakterisierung variiert. Die Zellen wurden für t= 15, 30, 45, 60, 75 und 90 Minuten unter den o.g. Temperaturen inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression erfolgte nach 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 96, 144 Stunden. Die Analyse der HSP-getriebenen Transgenexpression erfolgt durchflusszytometrisch. Hierbei wird das GFP-Signal der induzierten mit der nicht-induzierten Kultur verglichen. Ferner dienen die durchflusszytometrischen Messungen der Leervektorkontrolle sowie die konstitutive GFP-Expression in den entsprechenden Zellen als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Induktionsexperimente zur *ex vivo* Aktivierung der HSP getriebenen Transgenexpression

In murinen hämatopoetischen Zellen der Milz und in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen

Die Charakterisierung der HSP-dirigierten Transgenexpression in hämatopoietischen Zellen der Milz sowie in tumorinfiltrierenden hämatopoetischen Zellen erfolgt *ex vivo*. Die unter 2.x gewonnenen Einzelzellsuspensionen aus Milz und Tumor werden bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen pro Milliliter RPMI-Vollmedium mit 1% 2-Mercaptoethanol in jeweils zwei getrennte Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden) ausgesät von denen eine zunächst unter den beschriebenen Induktionsbedingungen (43°C, 90 Minuten) kultiviert wurde. Im Anschluß wird diese Kultur für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Analyse der HSP-getriebenen Transgenexpression erfolgt durchflusszytometrisch. Hierbei wird das GFP-Signal der induzierten mit der nicht-induzierten Kultur verglichen. Ferner dienen die durchflusszytometrischen Messungen der Leervektorkontrolle sowie die konstitutive GFP-Expression in den entsprechenden Zellen als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messung

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren oder die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen (FACS = Fluorescence activated cell sorting) durchgeführt.

Die Charakterisierung der hämatopoietischen Zellen aus der Milz bzw. der tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen erfolgte durch Antikörperfärbung. Hierzu wurden 1×10^7 in ein FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Die FC-Rezeptoren der Zellen wurden mit 100µl 5% Ratten- oder Mausserum auf Eis für 15 Minuten blockiert. Hierdurch konnte eine unspezifische Bindung des Antikörpers verhindert werden. Die primären Antikörper wurden jeweils den Herstellerangaben zufolge eingesetzt. Die entsprechenden Verdünnungen des Antikörpers wurden in 100µl FACS-Puffer den Zellen zugegeben und für 45 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 250µl FACS-Puffer aufgenommen und im FACS gemessen. Die Messungen der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS-Calibur Flow-Cytometer). Die Analyse erfolgte mit der FACS-Software FlowJow 8.2 (Treestar, USA)

Zellproliferations Assay (MTT-Assay)

Dieser Test erlaubt die photometrische Bestimmung der lebenden, proliferierenden Zellen. Das Substrat MTS tetrazolium wird von den stoffwechselaktiven Zellen zu einem farbigen Formazanprodukt reduziert, dabei kommt es zu einem Farbumschlag im Medium von gelb zu rot bzw. braun. Die Reduktion wird durch den Zellmetabolismus NADH/NADPH katalysiert und ist somit ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen. Die Farbreaktion lässt sich durch SDS stoppen. Die Absorption des braunen Formazans wird bei 490 nm gemessen. Die Durchführung dieses Proliferationstests wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Auslesung der Platten

erfolgte am ElisaReader (Dynatech) bei einer Wellenlänge von 490nm.

Kapitel 3 Ergebnisse

Amplifizierung des humanen HSP70B Promoters

Der humane HSP70B Promoter wurde per PCR amplifiziert. Das 461bp lange Fragment wurde nach Elution in das pGEM-T-Vector System kloniert und im *E.coli* Stamm XL-10-Gold per Transformation amplifiziert. Die Überprüfung des Transgens erfolgte zunächst mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

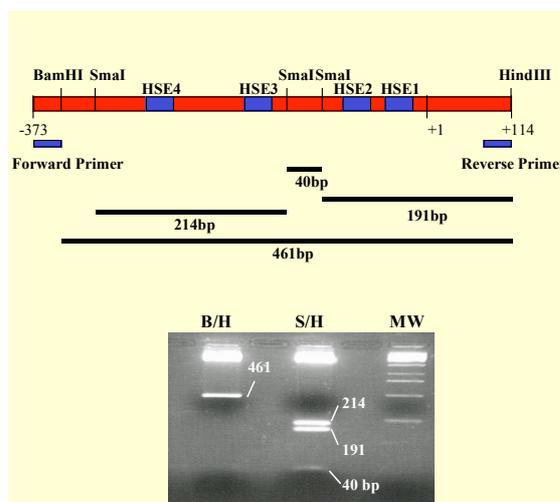


Abbildung 7: oben: Schematischer Aufbau des HSP70B-Promotors; unten: Kontrollverdaubild des HSP70B-Amplifikates

Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, konnte nach der Restriktion mit den Enzymen *SmaI* und *HindIII* Fragmente in der Größe von 214bp, 191bp und 40bp herausgelöst werden. Dieses Bandenmuster entspricht genau der vorgegebenen Sequenz. Im Anschluss wurde der Klonierungsvektor mit Promotor mit den Enzymen *BamHI* und *HindIII* verdaut. Das entstehende Fragment wurde zur genauen Analyse anschliessend aufgereinigt und sequenziert. Das Plasmid wird im Weiteren als pGemT_HSP bezeichnet.

Konstruktion der retroviralen Vektoren

Die Genexpression eines retroviralen Vektors folgt den Gesetzmäßigkeiten der zellulären Genexpression, weist aber einige Besonderheiten auf. Das virale Transkript wird im 5'LTR initiiert. Die U3-Region des LTRs übernimmt Promotor- und Enhancerfunktionen und beinhaltet zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Bei dem im folgenden benutzten retroviralen Basisvektor pMMP_ECT3-GFP handelt es sich um einen „SIN-Vector“, da der 3'LTR selbstinaktivierend ist. Nach reverser Transkription wird der U3-deletierte 3'LTR zum 5'LTR. Demzufolge wird der retrovirale Vektor in der Zielzelllinie durch den

weiter 3' gelegenen internen Promotor angetrieben.

Abgeleitet wurde pMMP_ECT3_GFP von dem pMMP Basisvektor (146), der auf dem Moloney Murin Leukemia Virus (MoMLV) basiert, durch die Deletion (Δ) der TATA Box und dem viralen Promotor in der U3 der 3'LTR. Da der 3'-LTR im Zuge der reversen Transkription die Matrize für beide LTRs darstellt, resultiert die Transduktion dieses Vektors in transkriptioneller Inaktivierung des 5'-LTR. Daher wird dieser LTR als selbstinaktivierend (sin) bezeichnet.

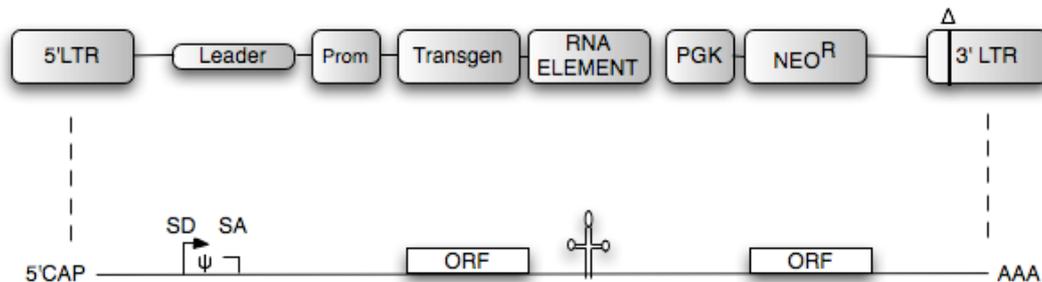


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des eingesetzten Onkoretrovirus pMMP.ECT3-. Das Schema zeigt den modularen Aufbau des retroviralen Vektors mit den Long Terminal Repeats (LTR). In der 3'-LTR ist die TATA-Box sowie der virale Promotor deletiert. Im Zuge der reversen Transkription stellt die 3'-LTR die Matrize für beide LTRs dar, was in einer transkriptionellen Inaktivierung der 5'-LTR resultiert.

MoMLV basierende Vektoren besitzen die Fähigkeit der *in vitro* und *in vivo* Insertion von Genes of Interests in Genome von Säugetierzellen (147). Der retrovirale Leader (5' untranslatierter Bereich) besteht aus der R-Region, der U5-Region, der Primerbindungsstelle (PBS), dem Verpackungssignal (ψ) und enthält gegebenenfalls Spleißsignale. Es werden drei Serien dieses retroviralen Vektors mit zwei unterschiedlichen Promotoren hergestellt. Die eine Serie beinhaltet den induzierbaren Promotor HSP70B, die zweite den konstitutiv exprimierenden CMV Promotor. Die dritte umfasst die Serie, die als Kontrollvirus eingesetzt wird. Bei dieser wird das GFP-Gen von keinem Promotor dirigiert.

Konstruktion des induzierbaren retroviralen Systems

Der HSP70B Promotor aus Klonierungsvektor pGemT_HSP wird mit der Enzymkombination *Bam*HI und *Hin*DIII herausgeschnitten. Die *sticky ends* werden mit Hilfe des Klenow-Enzyms zu *blunt ends* modifiziert. Nach der Dephosphorylierungsreaktion wird das HSP70B Fragment in den mit PmlI geöffneten pMMP_ECT3_GFP_PGK_NEO hineinkloniert. Die erfolgreiche Ligation sowie die Orientierung des Gens werden mit dem Restriktionsenzym *Bp*II überprüft. Es wird ein Bandenmuster in der Größe von 6.3kbp und 2.2kbp erwartet. Im Weiteren wird dieser retrovirale Transfervektor als pMMP_ECT3_HSP_GFP_PGK_NEO bezeichnet.



Abbildung 9: Modularer Aufbau des Vektors pMMP.ECT3-.HSP.GFP.PGK.NEO mit induzierbarer Expressionskapazität

Konstruktion des konstitutiv exprimierenden retroviralen Systems

Der CMV Promotor stammt aus dem retroviralen Transfervektor CMMP_GFP (146), der mit der Enzymkombination *NarI* und *HindIII* herausgeschnitten wird. Die Enden des 500bp grossen Fragments werden mit dem Klenow-Enzym modifiziert und in den mit *PmlI* geöffneten pMMP.ECT3-.GFP.PGK.NEO hineinkloniert. Mit dem RE *HincIII* wird die erfolgte Ligation und die Orientierung des Gens bestimmt. Es wird bei *sense* Orientierung ein Bandenmuster von Fragmenten der Grösse 6.3kbp und 2.4 kbp erwartet. Im Weiteren wird dieser retrovirale Transfervektor als pMMP_ECT3-_CMV_GFP_PGK_NEO bezeichnet.



Abbildung 10: Modularer Aufbau des Vektors pMMP.ECT3-.CMV.GFP.PGK.NEO mit konstitutiver Expressionskapazität

Konstruktion von retroviralen Vektoren mit WPRE Fragment

Bei dem WPRE-Fragment handelt es sich um ein postranskriptionell regulatorisches Element (PRE) des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV). Die effiziente Expression des WHV kann auf die Position des WPRE zurückgeführt werden, welches auf allen vier Transkripten vorhanden ist. Dieses regulatorische Element verbessert die Genexpression durch eine mögliche Modifikation von Polyadenylierung, RNA-Stabilität und/oder Translation (148, 149). Es stellt somit ein Ideal in der Optimierung der Genexpression von inserierten Transgenen dar (150). Zur Verbesserung der Transgenexpression in den o.g. Vektoren wurden die für das RNA-Element *wpre* kodierende DNA unmittelbar 3' der cDNA eingesetzt. Basisvektor für die *wpre* Klonierung ist das Plasmid MP110 β *wpre* (freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Baum zur Verfügung gestellt). Das β *wpre*-Fragment wird von den Restriktionsenzymen *EcoRI* flankiert. Durch den Verdau mit diesem Enzym erhält man ein 0,6kb Fragment. Nach Modifikation der Enden durch das Klenow-Enzym, wird das Fragment in den mit den Enzymen *SnaBI* und *StuI* geöffneten Vektor pMMP_ECT3-_CMV_GFP_PGK_NEO sowie pMMP_ECT3-_HSP_GFP_PGK_NEO, nach Modifikation dessen Enden mit dem Klenow-Enzym, liegert. Der Kontrollverdau erfolgt mit *StuI*; es wird ein Fragment der Grösse von 1kb erwartet.

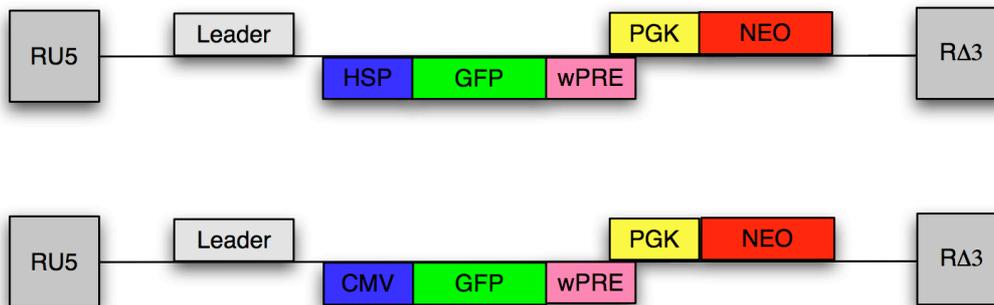


Abbildung 11: a) Modularer Aufbau des Vektors pMMP.ECT3-.HSP.GFPwpre.PGK.NEO mit induzierbarer Expressionskapazität. b) Modularer Aufbau des Vektors pMMP.ECT3-.CMV.GFPwpre.PGK.NEO mit konstitutiver Expressionskapazität. Zur Verbesserung der Transgenexpression in den o.g. Vektoren wurden die für das RNA-Element wpre kodierende DNA unmittelbar 3' der cDNA eingesetzt.

Konstruktion der lentiviralen Transfervektoren

Als Basisvektor für die Produktion dieser lentiviralen Serie, wird das von Naldini entwickelte lentivirale System pRRLsin18.PPT.hPGK.eGFPpre verwendet.

Konstruktion des induzierbaren lentiviralen Systems

Ausgehend vom lentiviralen „*SIN-Vector*“ Basisvektor pRRL.cppt.sin18.hPGK.GFP (freundlicherweise von Dr. L. Naldini zur Verfügung gestellt) wird zunächst der PGK Promotor per Restriktionsverdau herausgeschnitten und gegen den HSP70B Promotor ausgetauscht. Der HSP70B Promotor wird aus dem Klonierungsvektor pGemT_HSP mit den Restriktionsenzym *EcoRI* herausgelöst. Das 5' und 3' Ende des Fragmentes wird zu einer *blunt end* Schnittstelle mit dem Klenow-Enzym modifiziert. Der lentivirale Transfervektor wird mit dem Enzym *PstI* geöffnet und die Enden ebenfalls mit dem Klenow-Enzym zu einer *blunt-end*-Schnittstelle modifiziert. Das Promotor-Fragment HSP70B wird anschliessend in diesen geöffneten und modifizierten Transfervektor kloniert. Die Überprüfung der erfolgten Ligation sowie die Orientierung wird mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *StuI* überprüft. Es wird ein Fragment der Größe 1,7kb erwartet. Das Neomycinresistenz vermittelnde Gen wird einschliesslich PGK Promotor als *KpnI* Fragment in den mit *KpnI* geöffneten pRRL.sin18.HSP.eGFP ligiert.

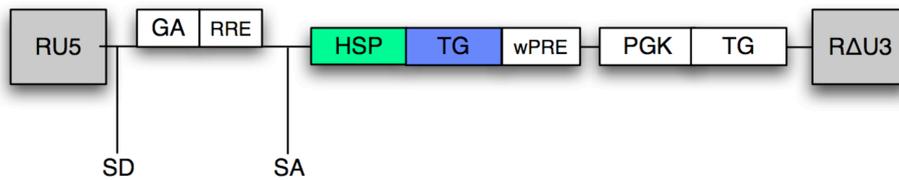


Abbildung 12: Modularer Aufbau des lentiviralen Vektors pRRL.sin18.HSPeGFP.PGK.NEO mit induzierbarer Expressionskapazität

Konstruktion des konstitutiv exprimierenden lentiviralen Systems

Zur Konstruktion des lentivirale Transfervektors, der eine konstitutiv exprimierende GFP Expression vermittelt, wird der hPGK Promotor aus dem Basisvektor gegen den konstitutiv exprimierenden CMV Promotor ausgetauscht. Hierzu wird der Basisvektor mit den Enzymen *AgeI* und *BamHI* geöffnet und die Enden der Schnittstellen mit dem Klenow-Enzym modifiziert. In den geöffneten Vektor wird der CMV Promotor aus dem retroviralen Transfervektor CMMP_GFP, mit *NarI* und *HindIII* herausgeschnitten. Die 3' und 5'-Enden werden mit dem Klenow-Enzym modifiziert, und im Anschluß ligiert kloniert. Das Neomycinresistenz vermittelnde Gen wird einschliesslich PGK Promotor als *KpnI* Fragment in den mit *KpnI* geöffneten pRRL.sin18.CMV.eGFP ligiert.

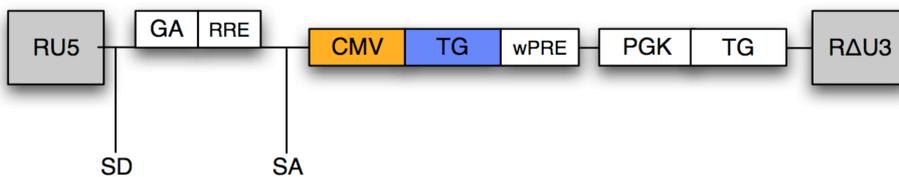


Abbildung 13: Modularer Aufbau des lentiviralen Vektors pRRL.sin18.CMV.eGFP.PGK.NEO mit konstitutiver Expressionskapazität

Konstruktion der lentiviralen Leervektorkontrolle

Die in dieser Arbeit genutzte Leervektorkontrolle besteht aus dem lentiviralem Vektor, der ausschließlich das unter dem PGK-Promotor dirigierte Transgen enthält. Zur Konstruktion dieses Transfervektors, wird die HSP-GFP-Promotor-Transgenkassette aus pRRL.sin18.HSPeGFP.PGK.NEO mit den Restriktionsenzymen *PSTI* und *Sall* entfernt. Die Ligation erfolgt nach Modifikation der Restriktionsenden mit dem Klenow-Enzym.



Abbildung 14: Modularer Aufbau des lentiviralen Leervektorkontrolle pRRL.sin18. PGK.NEO

Charakterisierung der Transduktionseffizienz des verwendeten retro- und lentiviralen Systems in murinen hämatopoietischen Stammzellen

Die Charakterisierung der Transduktionseffizienz der jeweiligen Vektorsysteme erfolgt in aufgearbeiteten murinen lineage negativen Zellen. Hierzu werden die gewonnenen Zellen jeweils mit den beschriebenen konstitutiv GFP-exprimierenden Retro- bzw. Lentiviren mit einer MOI=10 infiziert. Die Auswertung der Insertionen erfolgt anhand des geometrischen Mittels der GFP Expression.

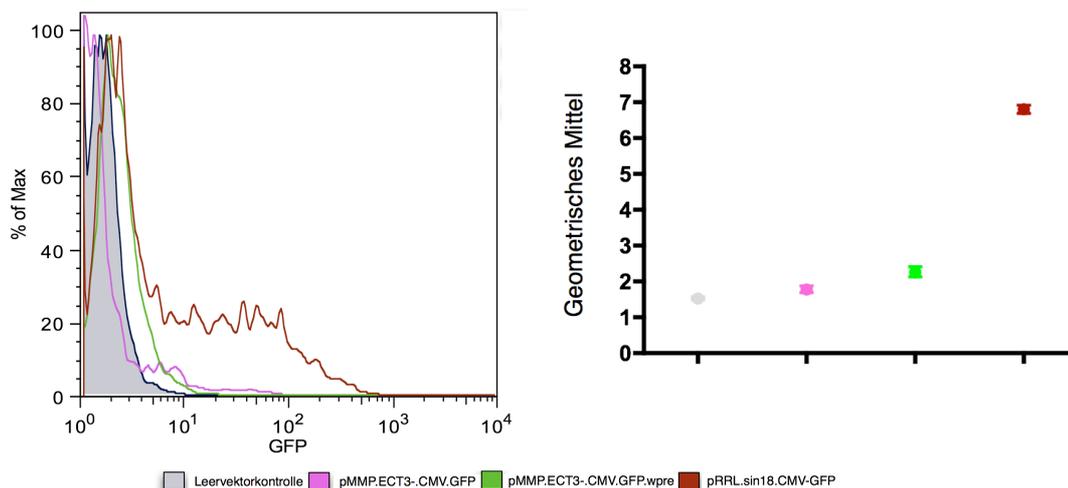


Abbildung 15: links: Repräsentative Darstellung der konstitutiven GFP-Expression nach Transduktion (MOI=10) mit retro- und lentiviralen Vektoren in murinen hämatopoietischen Stammzellen. Rechts: Darstellung des geometrischen Mittels der konstitutiven GFP-Expression posttransduktionell in hämatopoietischen Stammzellen. Leervektorkontrolle: 1.523 ± 0.039 ; pMMP.ECT3-CMV.GFP: 1.783 ± 0.093 ; pMMP.ECT3-CMV.GFP.wpre: 2.267 ± 0.145 ; pRRL.sin18.CMV.GFP: 6.803 ± 0.113

Das geometrische Mittel der GFP-Expression verdeutlicht den Unterschied in der Transduktionseffizienz der verwendeten Vektoren. Der Wert des geometrischen Mittels der GFP-

Expression in den retroviral manipulierten Zellen liegt im Bereich von 1.6 bis 1.9. Auch die Modifikation durch Insertion eines posttranskriptionell regulatorischen Elementes, wpre-Fragmentes, bedingt nur eine geringen Erhöhung dieses Wertes auf 2.0 bis 2.5. Die CMV-dirigierte GFP-Expression in den lentiviral manipulierten lineage negativen Zellen liegt dahingegen um das drei bis vier-Fache, mit einem Wert von 6.5 bis 7, höher. Da die Verwendung des retroviralen Vektors in den Zielzellen im Vergleich zu den lentiviralen Vektor nur eine geringe Transduktionseffizienz zeigt, liegt der Fokus im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich auf dem lentiviralen Expressionssystem.

In vitro Charakterisierung des humanen HSP-Promotors in der Transgenexpression

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der Hitzeinduzierbarkeit des HSP70B Promotors und des daraus resultierenden GFP-Expressionsprofils. Die Charakterisierung erfolgt *in vitro* anhand verschiedener Zelllinien, der humanen A549- bzw. der murinen GL261-Zelllinien. In diesen Zelllinien wird die GFP-Expression posttransduktionell durch den induzierbaren HSP- bzw. den konstitutiven CMV-Promotor gesteuert. Die Definition des Expressionsprofils erfolgt durch die vergleichende Quantifizierung der induzierten bzw. der konstitutiven Reportergenexpression.

Bestimmung der optimalen Induktionstemperatur

Zur Bestimmung der optimalen Induktionstemperatur werden die generierten Zelllinien, bei denen das GFP-Transgen unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors steht, bei verschiedenen Temperaturen hitzebehandelt. Die Auswertung der induzierten Transgenexpression erfolgt durchflusszytometrisch.

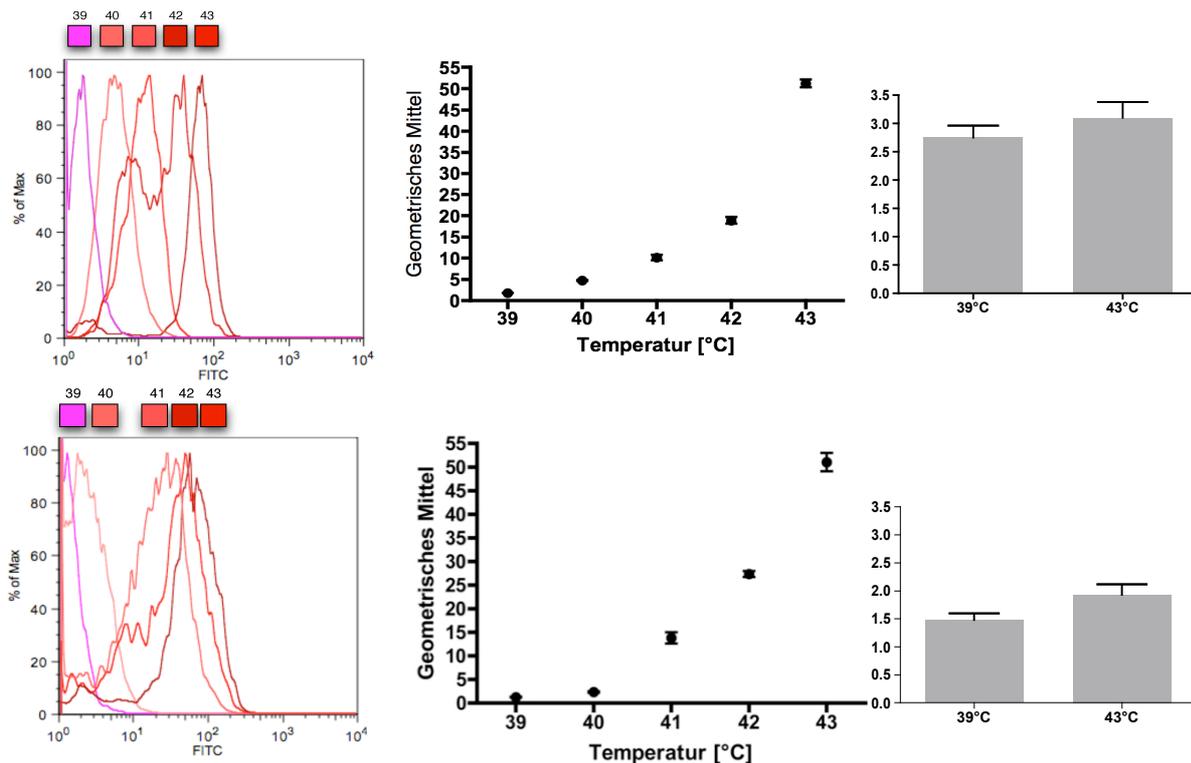


Abbildung 16: Repräsentative Darstellung der HSP gesteuerten GFP-Expression in A549-Zellen (oben) bzw. GL261_Zellen (unten): links: nach Induktion bei verschiedenen Temperaturen (39°C-43°C). Mitte: geometrisches Mittel der GFP-Expression in Abhängigkeit von der Induktionstemperatur in A549-Zellen (39°C): und in GL261-Zellen (39°C: 1,3±0,1, 40°C: 2,4±0,2, 41°C: 13,8±1,7, 42°C: 27,4±0,9, 43°C: 51,05±2,8). Rechts: Geometrisches Mittel einer PI-Färbung von Zellen, die bei 39°C bzw. 43°C für 90 Minuten kultiviert wurden; oben: A549-Zellen (39°C: 2,75 ± 0,14, 43°C: 3,1 ± 0,23), unten: GL261 (39°C: 1,81 ± 0,14, 43°C: 3,1 ± 0,23)

Das Expressionsniveau des induzierten Transgens steht in direkter Verbindung mit der

Induktionstemperatur (Aktivierungstemperatur). Eine signifikante Expression wird ab einer Aktivierungstemperatur von 41°C erreicht, das Maximum der Expression wird bei 43°C erreicht. Falschpositive Signale im Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Kanal werden durch die Färbung mit Propidiumiodid (PI) vermieden. Es werden ausschließlich PI-negative Zellen analysiert. Die Auswertung der PI-Färbung zeigt, dass die erhöhte Induktionstemperatur keinen Einfluss auf die Zellviabilität zeigt.

Bestimmung der optimalen Induktionsdauer

Zur Bestimmung der optimalen Induktionsdauer werden die generierten Zelllinien, bei denen das GFP-Transgen unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors steht, bei konstant 43°C unter verschiedenen Induktionszeiten hitzebehandelt. Die Auswertung der induzierten Transgenexpression erfolgt durchflusszytometrisch.

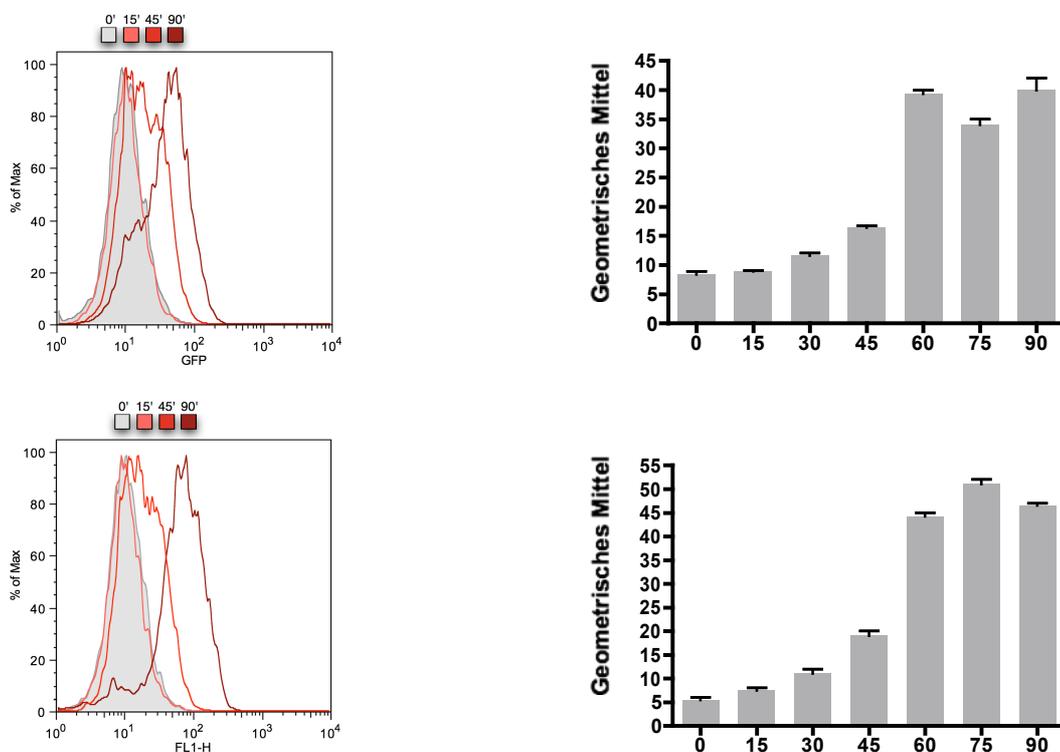


Abbildung 17: oben: Repräsentative Darstellung der HSP dirigierte GFP-Expression in A549-Zellen postinduktion bei verschiedenen Induktionszeiten (0min-90min), geometrisches Mittel der GFP-Expression in Abhängigkeit der Induktionszeit (0min: 5,44±0,79, 15min: 7,5±0,71, 30min: 11,00±1,41, 45min: 18,85±0,91, 60min: 44,25±1,1, 75min: 51,00±1,41, 90min: 46,50±0,71); unten: Repräsentative Darstellung der HSP dirigierte GFP-Expression in GL261-Zellen postinduktion bei verschiedenen Induktionszeiten (0min-90min), geometrisches Mittel der GFP-Expression in Abhängigkeit der Induktionszeit (0min: 8,35±0,78, 15min: 8,9±0,14, 30min: 11,55±0,64, 45min: 16,35±0,49, 60min: 39,35±0,78, 75min: 34±1,41, 90min: 39,95±2,90).

Das Expressionsniveau des induzierten Transgens steht sowohl mit der Induktionstemperatur (Aktivierungstemperatur) als auch mit der Induktionsdauer in Verbindung. Die deutliche Zunahme der

GFP-Expression nach Induktion beginnt erst ab einer Exposition der Zellen von 45 Minuten. Das Maximum der Expression wird erst bei einer Induktionsdauer bei 43°C von 60 bis 90 Minuten erreicht. Eine Verlängerung der Induktionszeit bedingt keine weitere Zunahme des geometrischen Mittels der GFP-Expression.

Bestimmung des postinduktiven Expressionsverlaufs

Der postinduzierte Expressionsverlauf wird anhand der generierten Zelllinien charakterisiert. Als Expressionskontrolle werden Zelllinien verwendet, bei denen das Reportergen GFP unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. Die Leervektorkontrolle bildet in diesem Teil der Arbeit die Negativkontrolle. Die durchflusszytometrische Messung und Analyse erfolgt zu den Zeitpunkten $t=0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 144$ nach Induktion. Zu Stunde 144 werden die Zellen erneut induziert, und die GFP-Expression wird erneut zu den Zeitpunkten $t^*=0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 144$ Stunden bestimmt.

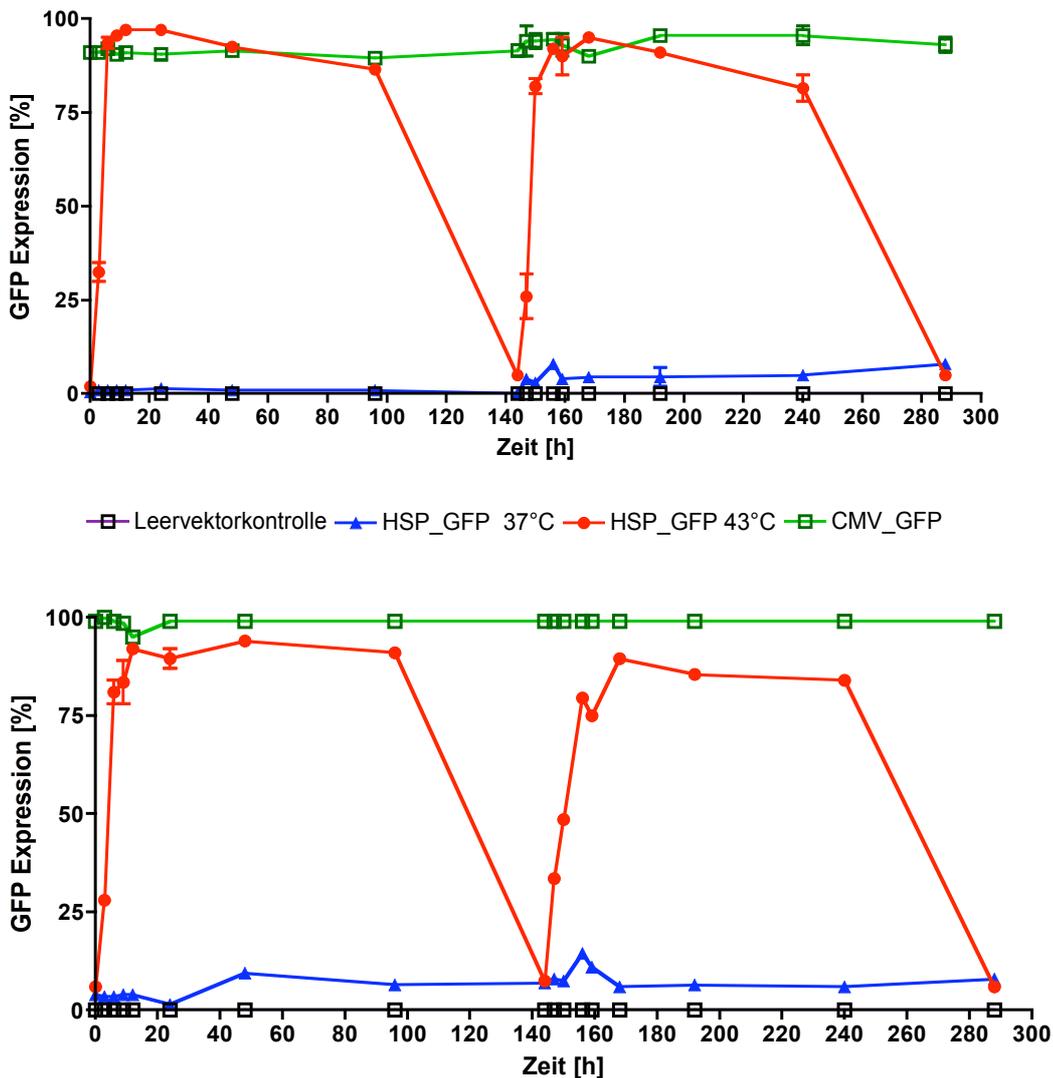


Abbildung 18: Zusammenfassung der induzierten GFP Expression in: Oben: A549-Zellen. Das maximale Expressionsplateau wird zum Zeitpunkt $t=12$ postinduktion mit 97% an GFP-positiven Zellen erreicht. Diese maximal induzierte Expression bleibt relativ stabil bis zum Zeitpunkt $t=96$ mit 86% GFP positiven Zellen. Zum Zeitpunkt $t=144$ postinduktion exprimieren nur noch 5% dieser induzierten Zellen GFP. Im Vergleich dazu: gemittelte 91% GFP positive Zellen bei einer konstitutiven GFP Expression im Zeitraum $t=0$ bis $t=144$, sowie gemittelte 1% an GFP positive Zellen in der nicht-induzierten Zellfraktion im Zeitraum $t=0$ bis $t=144$. Im Zeitraum $t=159$ (12 Stunden nach Reinduktion) bis $t=240$ exprimieren 92% bzw. 82% der induzierten Zellen GFP. Basalexpression wird nach $t=288$ mit 5% GFP exprimierenden Zellen erreicht. Im Vergleich dazu: gemittelte 94% GFP positive Zellen bei einer konstitutiven GFP Expression im Zeitraum $t=144$ bis $t=288$, sowie gemittelte 5% an GFP positive Zellen in der nicht-induzierten Zellfraktion im Zeitraum $t=144$ bis $t=288$.

Unten: GL261-Zellen. Das maximale Expressionsplateau wird zum Zeitpunkt $t=12$ postinduktion mit 92%

an GFP-positiven Zellen erreicht. Diese maximal induzierte Expression bleibt stabil bis zum Zeitpunkt $t=96$ mit 91% GFP positiven Zellen. Zum Zeitpunkt $t=144$ postinduktion exprimieren nur noch 5% dieser induzierten Zellen GFP. Im Vergleich dazu: gemittelte 99% GFP positive Zellen bei einer konstitutiven GFP Expression im Zeitraum $t=0$ bis $t=144$, sowie gemittelte 11% an GFP positive Zellen in der nicht-induzierten Zellfraktion im Zeitraum $t=0$ bis $t=144$. Im Zeitraum $t=159$ (12 Stunden nach Reinduktion) bis $t=240$ exprimieren 80% bzw. 84% der induzierten Zellen GFP. Basalexpression wird nach $t=288$ mit 6% GFP exprimierenden Zellen erreicht. Im Vergleich dazu: gemittelte 94% GFP positive Zellen bei einer konstitutiven GFP Expression im Zeitraum $t=144$ bis $t=288$, sowie gemittelte 8% an GFP positiven Zellen in der nicht-induzierten Zellfraktion im Zeitraum $t=144$ bis $t=288$.

Der Vergleich der postinduktiven Expressionsverläufe bestätigt die zeitliche Abhängigkeit der Expression in den verschiedenen Zelllinien. Zwölf bis 24 Stunden nach Induktion wird das HSP-gesteuerte Transgen maximal exprimiert. Dieses Expressionsniveau ist in diesem Zeitraum mit der konstitutiven Transgenexpression vergleichbar. Im weiteren Verlauf sinkt die induzierte Genexpression; 144 Stunden nach Induktion erreicht sie ihren präinduktiven Wert. Eine erneute Induktion des Promotors nach 144 Stunden zeigt ein vergleichbaren Verlauf der GFP-Expression mit einem Maximum zwischen zwölf und 24 Stunden, bzw. einem Abfall auf den Basalwert nach 144 Stunden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der HSP-Promotor *in vitro* in beiden getesteten Systemen die Fähigkeit der Hitzeinduzierbarkeit bei sehr geringer Basalexpression im nicht-aktivierten Zustand aufweist. Durch Induktion des Promotors bei einer erhöhten Temperatur von 43°C für 60 bis 90 Minuten erreicht man im Zeitraum von zwölf bis 24 Stunden nach Induktion ein Maximum der Transgenexpression. Das Niveau dieser Expression reicht bis an das des konstitutiv exprimierenden Systems (CMV) heran. Die Expression fällt 144 Stunden nach Induktion auf den Basalwert zurück. Ein wiederholtes Aktivieren des Promotors resultiert in einem vergleichbaren Expressionsverlauf. Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst die *in vivo* Charakterisierung der HSP-gesteuerten Transgenexpression in murinen hämatopoietischen Zellen sowie die Charakterisierung der durch den induzierbaren Promotor kontrollierten Reportergenexpression in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten anhand eines Maus Tumormodells *in vivo*.

Das basale Expressionsniveau in Abhängigkeit der Kopienzahlen

Neben den Randbedingungen Induktionstemperatur und Induktionszeit wird der Einfluss der Kopienzahl auf das basale Expressionsniveau nach lentiviraler Transduktion bestimmt. Hierzu werden murine GL261-Zellen bei denen GFP unter der Direktion des HSP-Promotors steht mit einer Serie von verschiedenen MOIs transduziert. Die Messung erfolgt durchflusszytometrisch, die Auswertung aufgrund der GFP-positiven Zellen.

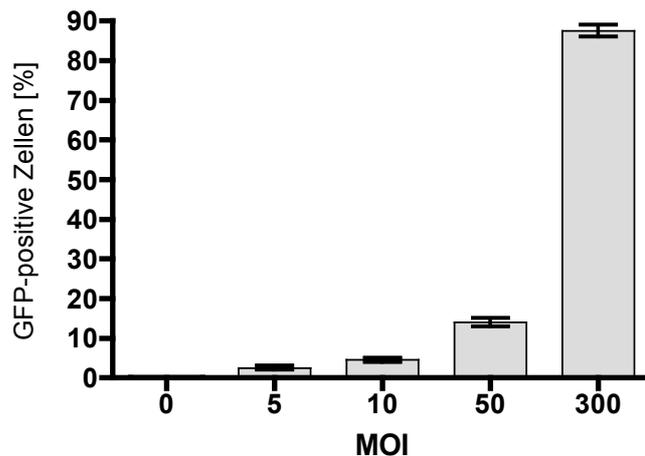


Abbildung 19: Darstellung der Basalexpression [%] der nicht-induzierten HSP-kontrollierten GFP-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Kopienzahl (MOI) von 0 bis 300 in GL261-Zellen. Die Basalexpression steigt in Abhängigkeit der eingesetzten MOI von $3\% \pm 0,05$ (MOI=5) über $12\% \pm 0,9$ (MOI=50) auf $87\% \pm 1,2$ (MOI=300).

Das ermittelte Basalexpressionsniveau der nicht-induzierten GFP-Expression steht in direktem Zusammenhang mit der Kopienzahl der integrierten Transgene. Es kann gezeigt werden, dass eine geringe MOI=5 keine unkontrollierte Transgenexpression bedingt. Eine subsequente Erhöhung der MOI (MOI=10, 50, 300) resultiert in einer Zunahme der GFP Basalexpression von 5% GFP-positiver Zellen (MOI=10) über 13% (MOI=50) auf 90% (MOI=300). Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Basalexpression in direkter Abhängigkeit der eingesetzten MOI steht.

Charakterisierung der HSP-dirigierten Genexpression in rekonstituierten hämatopoietischen Zellen der Milz nach Stammzelltransplantation

Nachdem *in vitro* die Rahmenbedingungen für die optimale Expression des Transgens nach Induktion bestimmt wurden, richtet sich der Fokus im zweiten Teil dieser Arbeit auf die HSP-dirigierte Transgenexpression in den hämatopoietischen Zellen. Wie in der Einleitung beschrieben, besteht das Ziel dieser Arbeit in der Entwicklung einer immunmodulatorischen Therapie, die durch eine kontrollierte Expression eines Transgens in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen eine erfolgreiche Immunantwort moduliert und zur Tumorabstossung führt. Im ersten Teil dieses zweiten Abschnittes werden die Versuche zunächst im "Proof-of-Principle" mit GFP durchgeführt, um dann im zweiten Teil die Versuche mit Einsatz eines therapeutischen Transgens fortzuführen.

Transplantation von lentiviral manipulierten Stammzellen

Die Charakterisierung der lentiviral eingebrachten Transgenexpression in den hämatopoietischen Zellen posttransplant erfolgt anhand der konstitutiv dirigierten GFP-Expression. Immunsupprimierten Tieren werden manipulierte Stammzellen transplantiert und nach erfolgter Rekonstitution die GFP-Expression anhand des geometrischen Mittels in verschiedenen Zellpopulationen bestimmt.

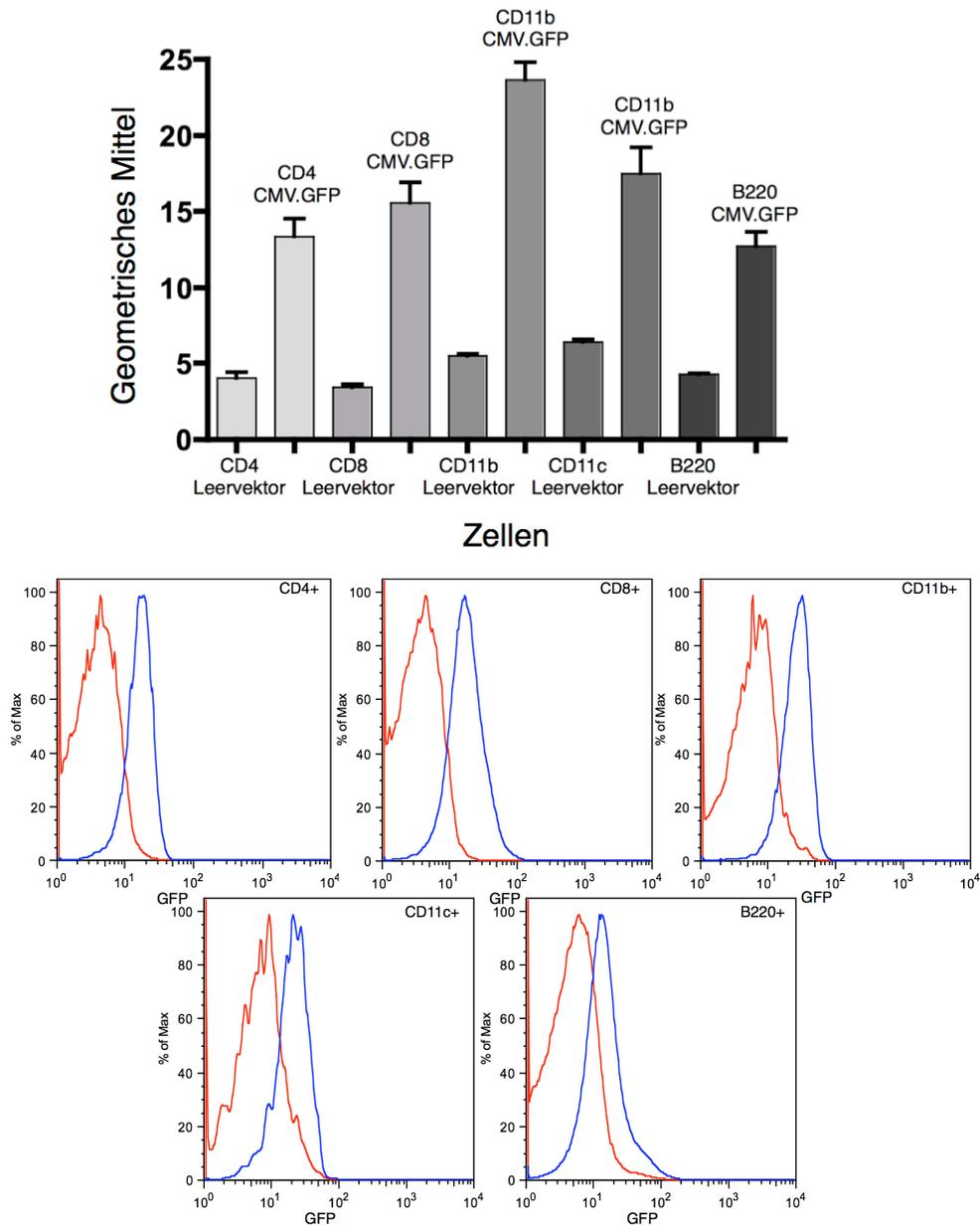


Abbildung 20: oben: Geometrisches Mittel der konstitutiven CMV-kontrollierten GFP-Expression in hämatopoietischen Zellen (CD4⁺: 13,37 ± 1,97, CD8⁺: 15,57 ± 2,31, CD11b⁺: 23,67 ± 1,96, CD11c⁺: 17,47 ± 3,04, B220⁺: 12,73 ± 1,60) posttransplant im Vergleich zu der Leervektorkontrolle in hämatopoietischen Zellen (CD4⁺: 4 ± 0,67, CD8⁺: 3,14 ± 0,34, CD11b⁺: 5,40 ± 0,19, CD11c⁺: 6,40 ± 0,28, B220⁺: 4,27 ± 0,11). Unten: charakteristisches Histogramm der CMV-kontrollierten GFP-Expression in CD4⁺ (1), CD8⁺ (2), CD11b⁺ (3), CD11c⁺ (4), B220⁺ (5)-Zellen.

Der Vergleich der geometrischen Mittel der GFP-Expression in den untersuchten hämatopoietischen Zellen der Milz zeigt, dass die in die hämatopoietischen Stammzellen lentiviral eingebrachte CMV-GFP-Promotor-Transgenkassette in den von diesen Zellen abstammenden Lymphozyten nach Rekonstitution des Immunsystems nachzuweisen ist. In den CD8⁺, CD11b⁺, CD11c⁺ CD4⁺ und B220⁺-Zellen ist das geometrische Mittel der GFP Expression um das drei- bis vierfache im Vergleich zur Leervektorkontrolle erhöht.

Charakterisierung der HSP-kontrollierten Genexpression in hämatopoietischen Zellen der Milz rekonstituierter muriner Milzzellen nach Stammzelltrans-plantation

Hierzu werden letal bestrahlten Versuchstieren hämatopoietische Stammzellen transplantiert, in deren Zellgenom der HSP-GFP Promotor-Transgenkomplex posttransduktionell inseriert wurde. In diesen Proof-of-Principle Versuchen soll zunächst die HSP-induzierte GFP-Expression in den verschiedenen, von hämatopoietischen Stammzellen abstammenden Zellpopulationen charakterisiert werden. Im weiteren Verlauf wird die Induzierbarkeit und die Expressionskapazität des HSP-Promotors in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen untersucht.

Den im Anschluß an die Transplantation erfolgreich rekonstituierten Tieren werden s.c. GL261 Zellen injiziert. 21 Tage später (d.h. 42 Tage nach Transplantation) werden die Milzen und die gewachsenen Tumore entnommen, aufgearbeitet und *ex vivo* induziert. Die induzierte bzw. nicht-induzierte HSP-abhängige Transgenexpression wird durchflusszytometrisch in den verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen (CD4⁺, CD8, CD11b⁺, CD11c⁺, B220⁺) gemessen und das geometrische Mittel bestimmt.

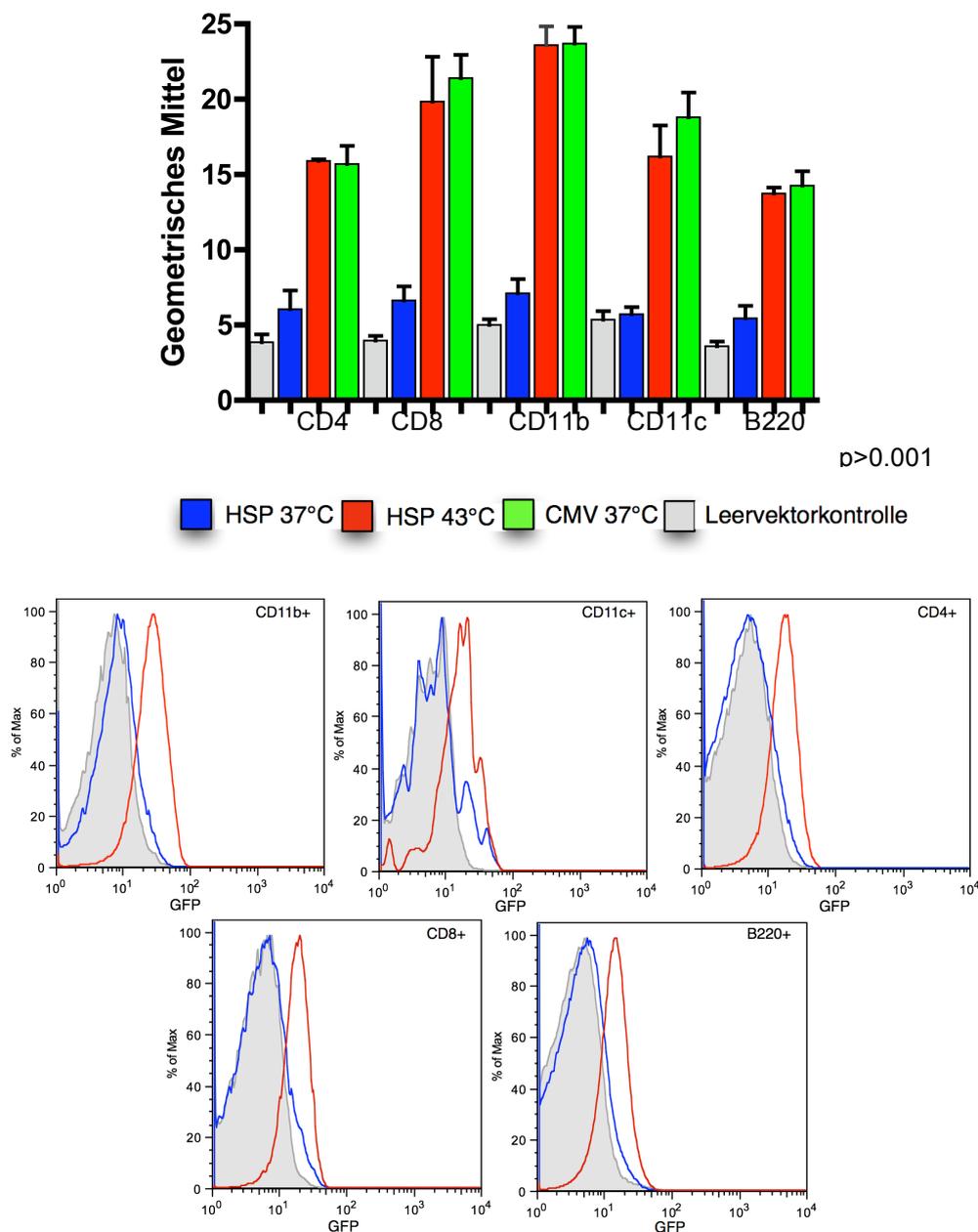


Abbildung 21: Geometrisches Mittel der nichtinduzierten (CD4+: 6,0±2,2, CD8+: 6,6±1,6, CD11b+: 7,1±1,6, CD11c+: 6,4±1,9, B220+: 5,5±1,4) und postinduzierten HSP70B-kontrollierten GFP-Expression (CD4+: 15,9±0,17, CD8+: 19,8±5,1, CD11b+: 23,6±2,2, CD11c+: 16,8±1,9, B220+: 14,9±1,4) in hämatopoetischen Zellen der Milz im Vergleich zu konstitutiver GFP-Expression (CD4+: 15,5±1,2, CD8+: 21,7±1,4, CD11b+: 23,9±2,1, CD11c+: 17,6±1,9, B220+: 13,9±0,9) und Leervektorkontrolle (CD4+: 3,9±0,9, CD8+: 4±0,6, CD11b+: 5±0,6, CD11c+: 5,3±1, B220+: 3,6±0,6). Unten: charakteristisches Histogramm der HSP-abhängigen GFP-Expression in CD11b⁺, CD11c⁺, CD4⁺, CD8⁺ und B220⁺-Zellen.

Analog zu den Daten der *in vitro* Charakterisierung der HSP-gesteuerten Transgenexpression kann *in vivo* ebenfalls eine lediglich geringe Basalexpression des nicht-induzierten HSP-Promotors festgestellt werden. Wie Abbildung 20 entnommen werden kann, sind die geometrischen Mittelwerte der Leervektorkontrollen in den einzelnen Zellpopulationen und des nicht-aktivierten HSP-Promotors vergleichbar. Ebenfalls bestätigt werden können die *in vitro* gewonnenen Daten: eine Hitzeapplikation

induziert die Transgenexpression in den untersuchten Zellen. Das geometrische Mittel der HSP70B-gesteuerten Transgenexpression ist nach Induktion, verglichen mit den Werten der jeweiligen nicht-induzierten GFP Expression, erhöht (CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, B220⁺-Zellen um das 3-Fache und CD11b⁺ um das 4-Fache). Diese Werte sind mit denen einer konstitutiven GFP Expressionen in den entsprechenden Populationen vergleichbar (CD4⁺, CD11c⁺, B220⁺-Zellen um das 4-Fache und CD8⁺, CD11b⁺ um das 4-Fache).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach erfolgter Rekonstitution der letal bestrahlten Tiere mit den lentiviral manipulierten hämatopoietischen Stammzellen die HSP-GFP-Promotor-Transgenkassette in den aus den Stammzellen hervorgehenden hämatopoietischen Zellen nachweisbar ist. Die HSP-abhängige Transgenexpression ist temperaturabhängig. Eine Induktion wird bei 43°C erreicht. Das basale Expressionsniveau des nicht-aktivierten Promotors ist minimal, während das geometrische Mittel der induzierten Transgenexpression gegen das des konstitutiven Promotors konvergiert.

Charakterisierung der HSP-gesteuerten Genexpression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen von rekonstituierten Tieren nach Stammzelltransplantation

Solide maligne Tumore bestehen zum einen aus neoplastischen Zellen und der sie umgebenden Extrazellulärmatrix und zum anderen aus einer Vielzahl nicht-neoplastischer Zellen, unter denen Fibroblasten, Endothelzellen, T-Lymphozyten und Makrophagen den größten Anteil ausmachen. So kann die Gesamtmasse eines soliden malignen Tumors bis zu 80 % aus Immunzellen bestehen, vor allem aus mononukleären Zellen (151). T-Lymphozyten, welche in den Tumor und in die Mikroumgebung des Tumors eindringen, werden als tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) (141), Makrophagen als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) (142) bezeichnet. B-Lymphozyten und NK-Zellen kommen nur in sehr geringem Umfang im Tumorinfiltrat vor (7, 143).

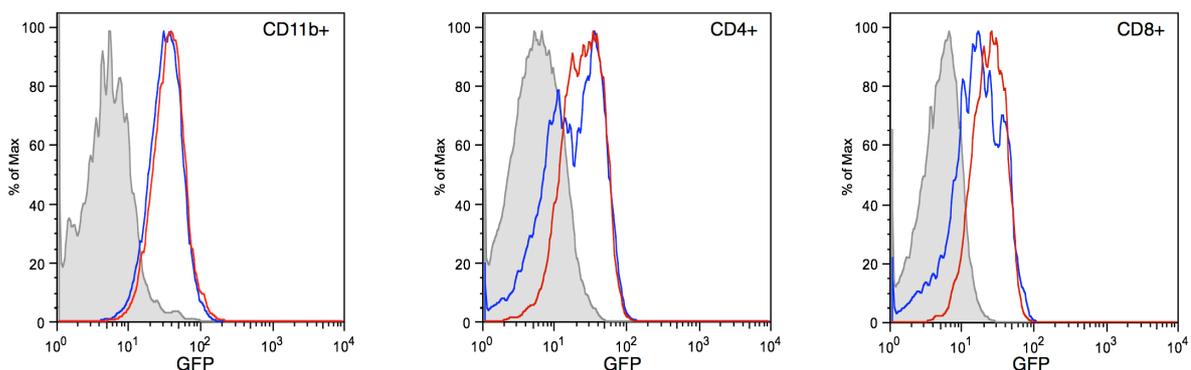
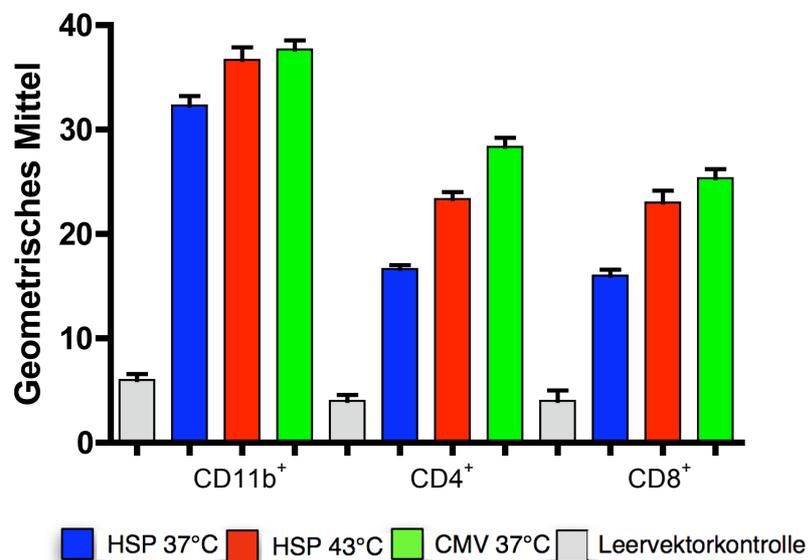


Abbildung 22: oben: Geometrisches Mittel der nichtinduzierten (CD4⁺: 16,7±0,6, CD8⁺: 16±1, CD11b⁺: 32,3±1) und der induzierten HSP70B-kontrollierten GFP-Expression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen (CD4⁺: 23,3±1,1, CD8⁺: 23±2, CD11b⁺: 36,7±2). Im Vergleich dazu: konstitutive GFP-Expression (CD4⁺: 28,33±1,5, CD8⁺: 25,33±1,5, CD11b⁺: 37,9±1,5) und Leervektorkontrolle (CD4⁺: 4±1, CD8⁺: 4±1, CD11b⁺: 6±1). Unten: charakteristisches Histogramm der HSP70B-kontrollierten GFP-Expression in CD11b⁺, CD4⁺ und CD8⁺-Zellen.

Ganz anders stellt sich, wie in die Abbildung 21 dargestellt, die HSP-gesteuerte Genexpression in den tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen dar. Während in den *in vitro* und in den zuvor dargestellten *in vivo* Versuchen die Basalexpression des nicht-induzierten Promotors mit dem Expressionsniveau der Leervektorkontrolle vergleichbar ist, zeigt die durchflusszytometrische Messung der Reportergenexpression in den verschiedenen untersuchten Populationen der tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen ein völlig anderes Bild. Die HSP70B-abhängige Transgenexpression der tumorinfiltrierenden Zellen weist jeweils im nicht-induzierten Zustand ein deutlich höheres geometrisches Mittel auf. Im Vergleich zu der Leervektorkontrolle steigt das geometrische Mittel der nicht-induzierten Transgenexpression in CD4⁺- und CD8⁺-Zellen um das vier-Fache, in den CD11b⁺-Zellen um das fünf-Fache. Nach der Hitzeapplikation kann zwar ein Anstieg in den entsprechenden hämatopoietischen Zellpopulationen (im Vergleich zu der Leervektorkontrolle) verzeichnet werden (CD4⁺-, CD8⁺- und CD11b⁺ jeweils um das sechs-fache), jedoch fällt dieser Anstieg, im Vergleich zu der nicht-induzierten GFP Expression, deutlich geringer aus als in den vorherigen Experimenten. Werden die geometrischen Mittel der konstitutiven GFP Expression mit denen der nicht-induzierten HSP70B gesteuerten Expression verglichen, zeigt sich, dass diese in allen drei untersuchten Zellfraktionen nur geringfügig höher sind. So dass diese gesammelten Daten den Schluß nahe legen, dass der HSP-Promotor im tumoralen Microenvironment bereits ohne äußere physikalische Stimuli aktiviert ist.

Charakterisierung einer induzierten Tumormunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant negativen Variante des TGF-β-Rezeptors

Amplifikation und Konstruktion der dominant negativen Variante des TGF-β-II-Rezeptors

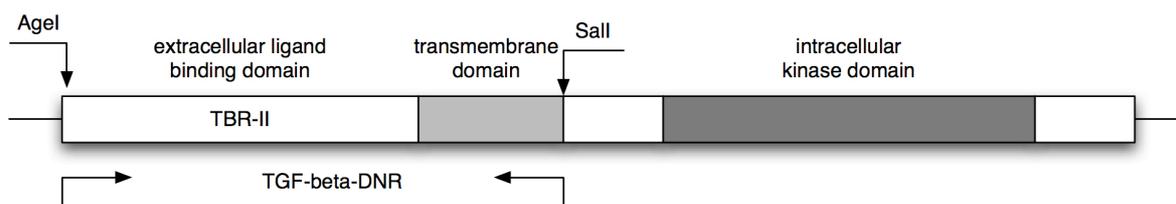


Abbildung 23: Darstellung der PCR-Strategie zur Amplifizierung der dominant negativen Variante des TGF-β-Rezeptors aus murinen Zellen der Milz.

Die Amplifikation der dominant negativen Variante des TGF-β-Rezeptors erfolgt per PCR aus murinen Milzzellen gemäß der in Abbildung 22 dargestellten PCR Strategie. Zu beachten ist hierbei, dass der Reverse-Primer am 3'-Ende der Transmembran Domäne ansetzt und infolgedessen die intrazelluläre Kinase Signaldomäne im Amplifikat nicht enthalten ist.

Somit entsteht ein TypII Rezeptor, der zur Bindung des freien TGF-β befähigt ist, dem durch die Deletion notwendige konstitutiv aktive Kinasedomäne jedoch fehlt. Hieraus resultiert, dass der Typ II Rezeptor die GS-Domäne des TypI Rezeptors nicht phosphorylieren kann und somit die Weiterleitung des Signales in das Zellinnere inhibiert wird und somit eine Dysfunktion des gesamten TGF-β/Smad

Signalweges initiiert wird.

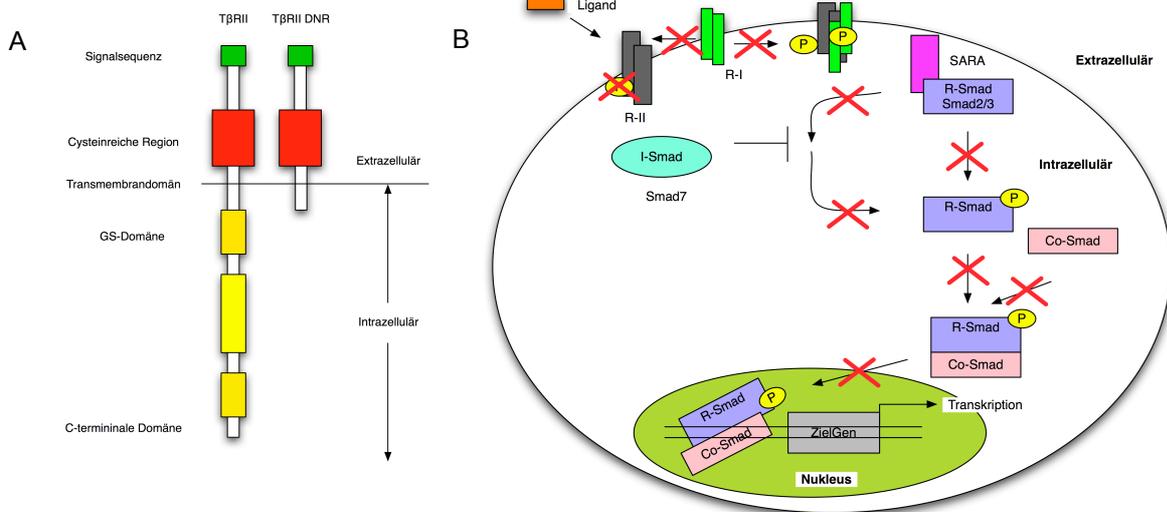


Abbildung 24: A: Schematische Darstellung der dominant negativen Variante des Typ I Rezeptors im Vergleich zu dem TβRI. Im Verlauf der Amplifikation per PCR werden ausschließlich die Signalsequenz, die cysteinreiche Region sowie die Transmembrandomän amplifiziert. Die konstitutiv aktive Kinasedomän wird deletiert, so dass diese die GS-Domäne des Typ I Rezeptors nicht mehr phosphorylieren kann und somit das von TGF-β initiierte Signal nicht weitergeleitet wird. B: Schematische Darstellung der Inhibition des TGF-β Signalkaskade durch Einsatz einer dominant negativen Variante des Typ II Rezeptors. Das Fehlen der aktiven Kinasedomän führt zu einem nicht-phosphorylierten Typ I Rezeptors. Somit wird die Smad abhängige Signaltransduktion und die Translokation in den Nukleus unterbunden. Dieses führt zu einer vollständigen Inhibition der Bindung zwischen den heterotrimeren Komplexen und den Promotoren von TGF-β Zielgenen.

Konstruktion des induzierbaren lentiviralen Systems zur kontrollierten Expression der dominant negativen Variante des TGF-β Rezeptors

Die in Abbildung 22 dargestellte verkürzt amplifizierte Sequenz des TGF-β-Rezeptors wird in den mit AgeI und Sall geöffneten pRRL.sin18.HSP Vektor kloniert. Die PGK-GFP-Kassette wird aus dem Vektor pRRL.HSP.GFP.PGK.Neo mit den Enzymen XhoI und Sall enzymatisch herausgeschnitten und in den pRRL.sin18.HSP.TGF-β-DNR ligiert. Im weiteren Verlauf wird dieses Konstrukt als pRRL.sin18.HSP.TGF-β-DNR.PGK.GFP bezeichnet.

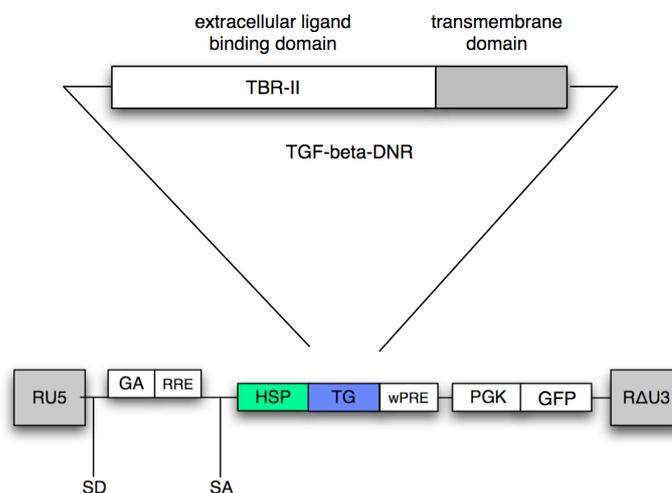


Abbildung 25: Modularer Aufbau des lentiviralen Vektors pRRL.sin18.HSP.TGF-β-DNR.PGK.GFP mit induzierbarer Expressionskapazität

Konstruktion des konstitutiv exprimierenden lentiviralen Systems zur Expression der dominant negativen Variante des TGF- β Rezeptors

Analog zu der vorherigen Strategie wird das TGF- β -DNR-Amplifikat in den mit *AgeI* und *Sall* geöffneten pRRL.sin18.CMV Vektor kloniert. Die Ligation der PGK.GFP-Kassette erfolgt ebenfalls über die *Sall*-Schnittstelle des Transfervektors, in den das *XhoI-Sall*-Fragment kloniert wird.

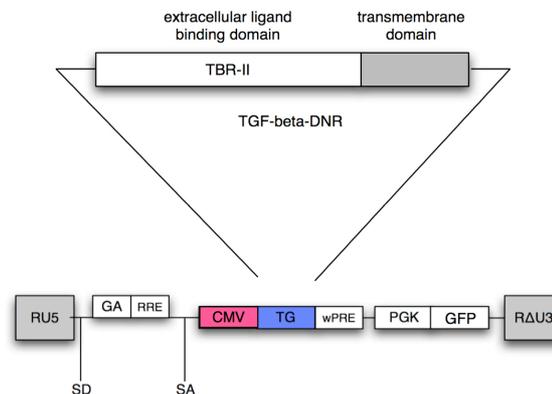


Abbildung 26: Modularer Aufbau des lentiviralen Vektors pRRL.sin18.CMV.TGF- β -DNR.PGK.GFP mit konstitutiver Expressionskapazität

Funktionelle Charakterisierung des TGF- β -DNR

Die funktionelle Charakterisierung des eingesetzten Transgens erfolgt anhand eines MTT-Proliferationsassays. In Anwesenheit von gelöstem TGF- β werden naive MV1LU-Zellen sowie MV1LU-Zellen, die die dominant negative Variante des TGF- β exprimieren, kultiviert. Gelöstes TGF- β arretiert naive MV1LU-Zellen in der G1-Phase. Infolge der Überexpression der dominant negativen Variante des TGF- β -II-Rezeptors erfolgt eine rezeptorvermittelte Inaktivierung des gelösten TGF- β . Dadurch wird die TGF- β initiierte Arrestierung der Zellen in der späten G1-Phase inhibiert.

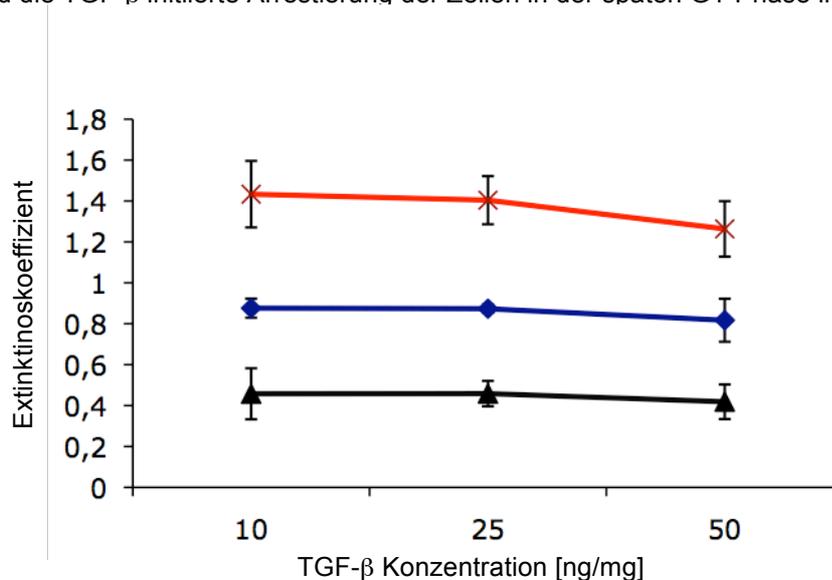


Abbildung 27: MTT Assay zur funktionellen Charakterisierung des klonierten TGF- β -DNR. Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in a) Mv1Lu-CMV-TGF- β -DNR bzw. b) Mv1Lu-Wildtypzellen nach Zugabe von löslichem TGF- β in den Konzentrationen 10, 25, 50ng/ml. a) 10ng/ml: 1,43±0,25, 25ng/ml: 1,40±0,14, 50ng/ml: 1,26±0,23. b) 10ng/ml: 0,88±0,08, 25ng/ml: 0,87±0,06, 50ng/ml: 0,81±0,12.

In Gegenwart verschiedener TGF- β Konzentrationen (10, 25 und 50 ng/ml) zeigt sich die proliferationshemmende Wirkung des Proteins auf naive Mu1LV-Zellen. Diese bleiben in der G1-Phase arretiert, während die transduzierten, den TGF- β -DNR exprimierenden Zellen, das freie TGF- β binden und von der proliferationshemmenden Wirkung des Zytokins aufgrund der dominant negativen Wirkung des Rezeptors unaffektiert bleiben.

Charakterisierung einer induzierbaren Tumormunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant negativen Variante des TGF- β -Rezeptors

Ausgehend von der beschränkten HSP70B-gesteuerten Transgenexpression im tumoralen Microenvironment wird die Möglichkeit einer induzierbaren antitumoralen Immunität infolge einer lokal begrenzten Expression der dominant negativen Variante des TGF- β -Rezeptors im Tiermodell charakterisiert. Hierzu werden letal bestrahlten Versuchstieren hämatopoietische Stammzellen transplantiert, die zuvor mit dem bereits beschriebenen HSP70B gesteuerten TGF- β -DNR-exprimierenden lentiviralen Vektor transduziert wurden. Die Kontrollgruppen werden zum einen von letal bestrahlten Versuchstieren gebildet, denen HSC transplantiert wurden, bei denen der TGF- β -DNR konstitutiv exprimiert wird sowie Versuchstieren die HSC transplantiert bekommen, die zuvor mit dem Leervektor transduziert wurden. Nach erfolgreicher Rekonstitution sämtlicher Versuchstiere erfolgt die s.c. Injektion der GL261-Zellen. Das Tumorstadium in den Tieren wird engmaschig beobachtet.

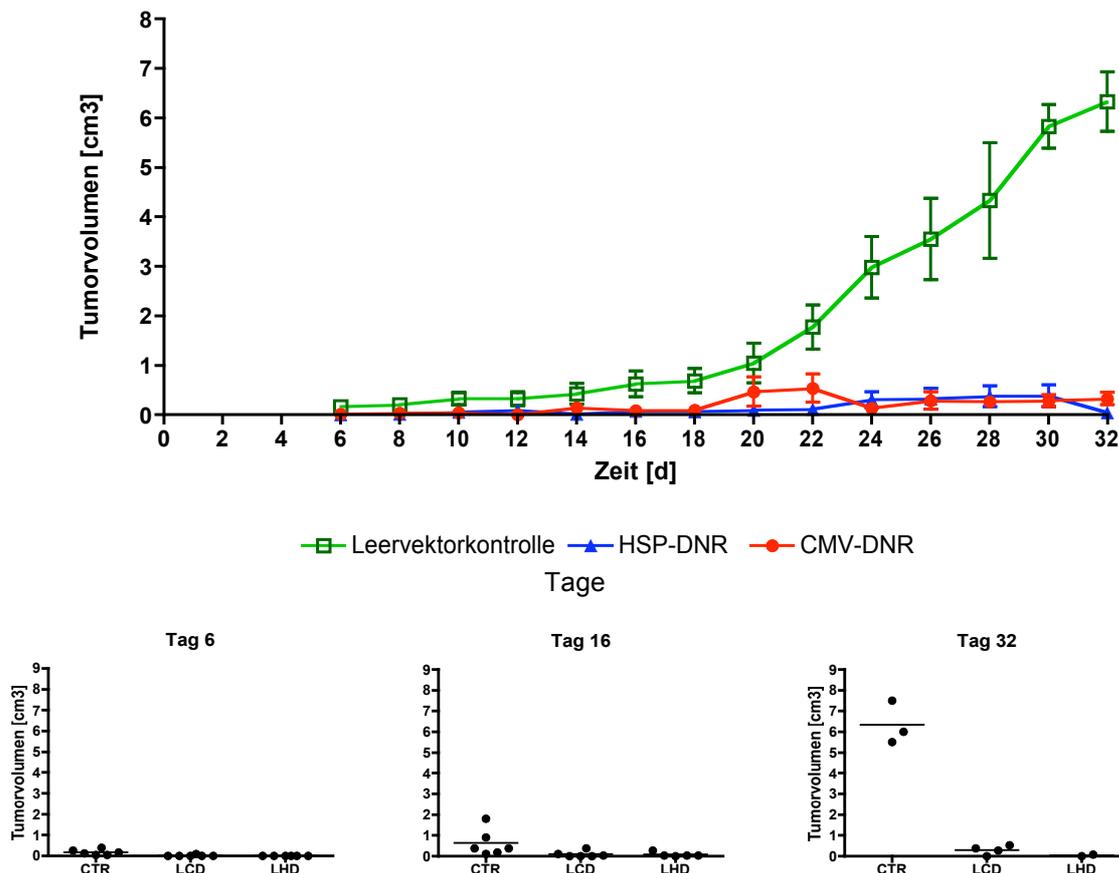


Abbildung 28: Oben: Grafische Darstellung des Verlaufs des Tumorstadiums in transplantierten Versuchstieren der jeweiligen Versuchsgruppe nach Injektion der GL261-Zellen. HSP-DNR: pRRL.sin18.HSP.TGF- β -DNR (Tag6: 0 cm³, Tag 16: 0,072 cm³, Tag 32: 0,05 cm³), CMV-DNR: pRRL.sin18.CMV.TGF- β -DNR (Tag 6: 0,015cm³, Tag 16: 0,085 cm³, Tag 32: 0,33 cm³) sowie der Leervektorkontrolle (Tag 6: 0,17cm³, Tag 16: 0,63 cm³, Tag 32: 6,33 cm³). Angeben sind Mittelwerte aus den einzelnen Messungen der entsprechenden Tage. Unten: Auszug aus der Darstellung der Tumorstadiumbestimmung an den Tagen 6, 16 und 32 nach Injektion der GL261-Zellen in die Maus. CTR: Leervektorkontrolle, LCD: konstitutive Expression von TGF- β -DNR, LHD: HSP-anhängige Expression von TGF- β -DNR.

An Tag 6 kann ein Tumolvolumen der Tiere der Leervektorkontrollgruppe im Mittel von $0,17 \text{ cm}^3$ bestimmt werden. Im Vergleich hierzu liegen die Werte der konstitutiv TGF- β -DNR exprimierenden Tiere bei $0,015 \text{ cm}^3$ und die der HSP70B gesteuerten TGF- β -DNR Gruppe bei 0 cm^3 . Das mittlere Tumolvolumen in der Kontrollgruppe nimmt im weiteren Verlauf stetig zu. An Tag 20 liegt dieser Wert bei 1 cm^3 und an Tag 32 bei $6,3 \text{ cm}^3$. Im Vergleich dazu beträgt das mittlere Tumolvolumen der konstitutiven Gruppe an Tag 20 bei $0,47 \text{ cm}^3$ und an Tag 32 bei $0,33 \text{ cm}^3$, das der HSP70B Gruppe an Tag 20 bei $0,09 \text{ cm}^3$ und an Tag 32 bei $0,05 \text{ cm}^3$.

Das Tumorstadium zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen belegen, dass das Tumolvolumen in Mäusen, die den Rezeptor unter der Kontrolle des induzierbaren HSP70B Promotors exprimieren mit dem Volumen aus der Versuchstiergruppe zu vergleichen ist, bei denen der Rezeptor konstitutiv exprimiert wird. In beiden Fällen wird das Wachstum des malignen Gewebes signifikant verlangsamt, während bei der Leervektorkontrolle das Tumorgewebe ungebremst wächst.

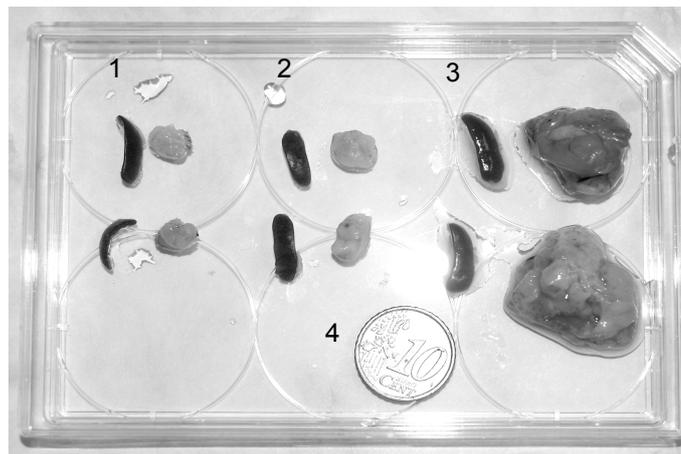


Abbildung 29: Charakteristische Darstellung der gewachsenen Tumore in den verschiedenen Tierversuchsgruppen. 1: konstitutive Expression von TGF- β -DNR, 2: HSP-abhängige Expression von TGF- β -DNR, 3: Leervektorkontrolle, 4: zum Größenvergleich: 10 Cent Stück.

Kapitel 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Etablierung eines transgenen Expressionssystems zur zeitlich und räumlich kontrollierten Expression eines viral eingebrachten Transgens im hämatopoietischen System. Durch den gezielten Einsatz eines therapeutischen Transgens soll die körpereigene Abwehr gegen Tumorzellen aktiviert bzw. unterstützt werden mit dem Ziel, durch die Funktion dieses Gens therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen.

Charakterisierung der Transduktionseffizienz des verwendeten retro- und lentiviralen Systems in murinen hämatopoietischen Stammzellen

Der beschriebene Gentransfer in den Zielzellen erfolgt mit retro- und lentiviralen Vektoren. Die Daten belegen, dass die lentivirale Transduktionseffizienz von hämatopoietischen Stammzellen um ein vielfaches höher ist als die des retroviralen Systems. Wie bereits beschrieben, verläuft der Eintritt und die DNA-Synthese bei Retro- und Lentiviren identisch. Der Unterschied in beiden Systemen liegt im dritten Schritt der Virusreplikation. Die retroviral eingebrachte DNA benötigt zur Integration in das Zielgenom eine zerstörte Kernmembran, welche unmittelbar vor der Zellteilung vorliegt. Hämatopoietische Stammzellen (HSC) sind ruhende Zellen mit einem Zellanteil von 5%, die sich in der S, G2 oder M Phase des Zellzyklus befinden (152-154). Im Gegensatz dazu wird die doppelsträngige lentivirale DNA, unabhängig von der Zellteilung, in den Nukleus transportiert, wo sie dann in das Zielgenom integrieren kann (155). Dieser Unterschied in der Insertionseffizienz der beiden verschiedenen viralen Systeme spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. Posttransduktionell ist das geometrische Mittel der GFP Expression bei gleicher MOI in lentiviral manipulierten murine Stammzellen um das vierfache höher als in den retroviral transduzierten Zellen. Trotz der Modifikation der retroviralen Vektoren durch Insertion eines wPRE-Fragmentes konnte die Transduktionseffizienz des lentiviralen Systems nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit der Gentransfer in die verschiedenen Zelllinien mit dem lentiviralen Vektor durchgeführt.

In vitro Charakterisierung des humanen HSP-Promotors in der Transgenexpression

Eines der grundlegenden Probleme in der Therapie bösartiger Tumore ist der geringe äußerliche Unterschied zwischen den normalen und den entarteten Zellen. Durch verschiedene Mechanismen entgehen diese abnormalen Zellen der körpereigenen Kontrolle. Die Folge ist ein nichtkontrollierbares Tumorwachstum. Das Immunsystem gegen Tumorzellen zu aktivieren, stellt eine Idealstrategie in der Krebsbekämpfung dar. Bei der Erforschung dieser Strategie stehen die hohe Spezifität immunologischer Prozesse und eine systemische, also körperweite Abwehr von Tumorzellen als Ziele im Mittelpunkt (93). Zytokine übernehmen in diesem Ansatz eine Schlüsselposition ein. Ihr Einsatz ist jedoch bislang mit geringer Wirksamkeit und hoher Toxizität verbunden (94, 156). Beispiele potenter tumoricidalen Agenzien mit immunmodulatorischen Eigenschaften sind u.a. IFN- γ , Fas/FasL, TNF- α .

Obwohl der Einsatz zu einer Tumorabstossung führt, ist der Ansatz einer systemischen körperweiten Abwehr durch die systemische Toxizität begrenzt (96, 97). Aus diesem Grund werden Strategien gesucht, um eine räumliche und zeitliche auf den Tumor eingegrenzte Anwendung der Zytokine zu erreichen. Lokale Applikationstechniken für rekombinante Proteine wie das Einkapseln in Trägermaterialien erlauben diese Eingrenzung (102). Es bleibt jedoch die kostspielige Herstellung und aufwändige Aktivitäts- und Stabilitätsprüfung. Umgehen lässt sich dieses durch den Einsatz verschiedener gentherapeutischer Verfahren. Die erste Möglichkeit besteht im Einbringen der genetischen Information für das Transgen durch lenti- oder retrovirale Transduktion der Tumorzellen. Das Ergebnis wäre die Expression des therapeutischen Transgens durch die Tumorzellen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (103). Durch den Einsatz der retro- bzw. lentiviralen Vektoren kann benachbartes gesundes Gewebe ebenso transduziert werden wie die Tumorzellen, da den Vektoren eine ausschliessliche Tumorspezifität fehlt. Um eine unkontrollierte Transgenexpression im gesunden Gewebe zu verhindern, ist es notwendig, diese durch z.B. biochemische oder physikalische Stimuli zu kontrollieren und somit lokal zu begrenzen. Die meisten Strategien zur kontrollierten Transgenexpression erfolgen durch biochemische Stimuli. Der Einsatz von zellspezifischen Promotoren wie der Prostata-spezifische-Antigen Promotor (104) oder die „disease-specific-gene activation“ (105) der selektiv in verschiedenen Tumorgeweben zur induziert wird, ermöglicht die verlangte Transgenexpressionskontrolle. Hypoxie- und Angiogenesegene sind in der Regel in Bereichen schnellwachsender Zellen, wie im Tumorgewebe, überexprimiert. Die insuffiziente Sauerstoffversorgung führt zur Aktivierung des humanen-alpha-feroprotein Promotors in hepatozellulären Karzinomen (106), so dass dieser Promotor ebenso zur kontrollierten Transgenexpression im tumoralen Gewebe genutzt werden kann. Eine weitere Strategie zur zwingend dirigierten Genexpression in Verbindung mit sauerstoffarmen Regionen besteht durch die Verwendung von bakteriellen Promotoren, die in der Regel unter anaeroben Bedingungen aktiviert werden (107). Eines der bekanntesten und am besten charakterisierten Systeme zur Expressionskontrolle ist das TET-ON/Tet-OFF-System (108), welches auf dem bakteriellen Tetrazyklin-Operon basiert. Die Verwendung des TET-Systems ermöglicht jedoch keine räumliche Eingrenzung der Genexpression.

Neben diesen biochemischen und metabolischen Ansätze zur temporär-lokalen Transgenexpressionskontrolle kann durch äußere physikalische Stimuli ebenso eine kontrollierte Genexpression erwirkt werden. Ionisierende Strahlung ermöglicht die zeitliche und räumliche Expression des TNF- α -Gens unter der Kontrolle des EGR-1 Promotors (109, 110). Weitere radiosensitive Promotoren sind der C-IAP2- und WAF1-Promotor und der Maus-Albumin-Promotor-Enhancer (111, 112). Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von einem der Heat-Shock-Protein-Promotoren HSP70. Hsp70-Systeme spielen bei den unterschiedlichsten zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Komponenten des Hsp70-Systems konnten bisher in allen untersuchten prokaryontischen und eukaryontischen Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten identifiziert werden. Wegen der erhöhten Expression der HSP70-Proteine unter Hitzestress werden diese auch als Hitzeschockproteine (HSP) klassifiziert, obwohl inzwischen auch konstitutiv exprimierte homologe Proteine (Hsc) bekannt sind. Die dirigierte Genexpression kann infolge von Hyperthermie bis zu dem 100-fachen über dem basalen Expressionsniveau liegen (115). Die Funktion der vom HSP70-

Promotor dirigierten Expression des HSP70-Proteins liegt u.a. in der Sicherstellung korrekter Proteinfaltungen unter Stressbedingungen, so dass HSP70 die Proteine gegen Hyperthermie, pH-Änderung und anderen Stressfaktoren schützt (115). Aber auch eine Hypoxie vermittelte Aktivierung des Promotors konnte gezeigt werden (116, 117). Durch diese Charakteristika der lokalen (durch Hyperthermie) und temporären Aktivierung des Promotors eignet sich dieser zur Anwendung in der kontrollierten Genexpression (118). Der erfolgreiche Einsatz des Promotors konnte sowohl *in vitro* (114, 119, 120) als auch *in vivo* (121) gezeigt werden.

In den durchgeführten *in vitro* Experimenten kann eine hohe Induzierbarkeit der HSP-vermittelten Transgenexpression in Abhängigkeit der Induktionstemperatur (Abb. 16) sowie der –dauer (Abb. 17) in humanen A549 und murinen GL261-Zellen gezeigt werden. Eine moderate Erhöhung der physiologischen Temperatur auf 43°C für 60 bis 90 Minuten führt zu einer maximalen Expression des von dem HSP70B gesteuerten Transgens und erreicht im Maximum die Werte einer konstitutiven gesteuerten Transgenexpression. Die Temperaturabhängigkeit der HSP70-abhängigen Transgenexpression konnte bereits in verschiedenen früheren Arbeiten erfolgreich demonstriert werden. Die beschriebenen Induktionstemperaturen lagen jeweils bei $T > 41^{\circ}\text{C}$ (157-159). Die Zunahme der induzierten Expression im Vergleich zu den Kontrollen variierte jedoch in allen Arbeiten. Schmidt *et al.*, 2004, zeigte eine 6-fache Zunahme der GFP-Expression, wohingegen Huang *et al.* (114), eine Zunahme um das 500 bis 1000-fache demonstrierte. Die Diskrepanz dieser Werte begründet sich wahrscheinlich aufgrund der unterschiedliche Methode zur Einbringung der DNA in die Zellen. Schmidt *et al.* (159) transfizierte FADU Zellen, wohingegen Huang *et al.* die DNA mittels adenoviraler Vektoren in 4T1-Wirtszellen eingebracht hat. Eine Adenovirus-vermittelte Transduktion ist deutlich effektiver zum Einbringen von DNA als eine herkömmliche Plasmid-Transfektionsmethode (160). Ferner ist die induzierte HSP-gesteuerte Transgenexpression stark zelltypabhängig (159), was die Ergebnisse in der postinduzierten Zunahme des Transgens erklärt. Im Verlauf der HSP70B gesteuerten postinduzierten Expressionskinetik (Abb. 18) kann die zeitliche Kontrolle der gesteuerten Transgenexpression bestätigt werden. Während in beiden generierten Zelllinien zwischen zwölf und 96 Stunden ein maximales Expressionsniveau erreicht wird, fällt dieses nach 144 Stunden auf Basalniveau wieder zurück. Eine Reinduktion dieser bereits induzierten Zellen zeigt einen ähnlichen Verlauf der gesteuerten Transgenexpression, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder Promotor noch Zellen von der Hitzeinduktion beeinflusst werden. Diese Eigenschaften bestätigen die Potenz des HSP70B Promotors für den Einsatz in einem gentherapeutischen Ansatz zur kontrollierten Expression von möglichen therapeutischen Transgenen.

Eine vergleichbare detaillierte Studie einer HSP70B kontrollierten Transgenexpression ist in der Literatur nicht verfügbar. Verschiedene weitere experimentelle Ansätze in Bezug auf die HSP70B kontrollierte Transgenexpression und deren Induzierbarkeit mit ähnlichem experimentellem Setting zeigen vergleichbare Ergebnisse (114).

Konstitutive und induzierte Expression im Vergleich

Eine Anforderung an kontrollierbare induzierbare Expressionssysteme ist neben der gewünschten zeitlichen und räumlichen Eingrenzung der Genexpression ein hohes Expressionsniveau des eingebrachten Transgens. In allen *in vitro* durchgeführten Experimenten wird neben der induzierten Transgenexpression als Kontrollgruppe ebenso die konstitutive Expression gemessen und mit der HSP70B-gesteuerten Expression verglichen. In den Kontrollgruppen zur Charakterisierung des induzierbaren HSP-Promotors wird der konstitutiv exprimierende Promoter des humanen Cytomegalovirus (CMV) eingesetzt und das jeweilige GFP Expressionsniveau ermittelt. In verschiedenen Arbeiten wurde der CMV-Promotor als mit einem der höchsten Expressionsniveaus charakterisiert (161, 162). Ferner wird dieser bereits in verschiedenen klinischen Studien angewendet (163, 164). Die Ergebnisse der HSP70B gesteuerten postinduzierten Expressionskinetik belegen die hohe Induzierbarkeit des Promotors. Im Zeitraum von zwölf bis 96 Stunden nach Hitzeschock wird das HSP70B gesteuerte Transgen maximal exprimiert, wobei das Expressionsniveau mit dem einer konstitutiv gesteuerten Transgenexpression zu vergleichen ist. Verschiedene Studien belegen diese hohe Induzierbarkeit. Luo *et al.* (165) berichten, dass das in deren Arbeit verwendete IL-2-Gen, unter der Kontrolle des HSP-Promotors sogar höher exprimiert wurde, als das unter dem CMV-Promotor stehende IL-2-Gen (165). Aber auch in weiteren Arbeiten konnte hohe induzierbare Expressionsniveaus einer HSP70B gesteuerten Genexpression bestätigt werden (114, 166). Eine weitere Anforderung an den benutzten induzierbaren Promotor ist die Fähigkeit der Regulierung im klinischen Ansatz. Dieses bedingt die Notwendigkeit einer geringen Basalexpression im nicht-induzierten Zustand. Es gibt zahlreiche regulierbare Transgenexpressionssysteme (167-170) von denen viele jedoch eine deutlich erhöhte Expression des Transgens in Abwesenheit des Stimulus aufweisen. Im Vergleich dazu konnte eine geringe Basalexpression des in dieser Arbeit genutzten HSP Promotors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, was auch in weiteren Studien belegt wird (114, 166, 171). Die basale Expression der HSP70B gesteuerten Transgenexpression steht allerdings in Korrelation mit der Kopienzahl, mit der die Promotor-Transgenkassette in das Zielgenom retroviral eingebracht wurde. Während bei einer niedrigen Kopienzahl ($MOI < 5$) das Basalniveau der Transgenexpression dem der naiven Zellen entspricht, kann ein Anstieg dieses Niveaus in Abhängigkeit von der Kopienzahl beobachtet werden. Bei einer verwendeten MOI von 300 ist die Induzierbarkeit des Promotors nicht mehr gegeben, da das Transgen von sämtlichen transduzierten Zellen, ohne externe Stimuli angetrieben zu werden, exprimiert wird (Abb. 19). Diese unkontrollierte Aktivierung der Genexpression kann auf mehreren Faktoren begründet sein.

Eine Virusreplikation bewirkt eine veränderte Zusammensetzung von Zellkomponenten:

- i) Einbau von viruskodierten Glycoproteinen in die Cytoplasmamembran
- ii) Präsentation neuer MHC-Antigen-Komplexe (MHC-Viruspeptide)
- iii) erhöhte Expression zellulärer Stressfaktoren (Chaperone wie HSP60, HSP70, HSP90)
- iv) erhöhte bzw. reduzierte Produktion von zellulären Differenzierungskomponenten.

All diese beschriebenen Punkte bedingen eine zelluläre Stressreaktion, bei der wie bereits beschrieben, der HSP70B Promotor aktiviert werden kann. Eine weitere Möglichkeit der unkontrollierten Transgenexpression infolge viraler Transduktion mit einer sehr hohen MOI besteht in der Kontrolle der GFP-Expression durch endogene Promotoren. Dieses kann zu einer unkontrollierbaren und vom HSP-Promotor abgekoppelten GFP Expression führen.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass der verwendete HSP70-Promotor die Anforderungen an ein induzierbares System erfüllt. Es kann gezeigt werden, dass die durch den HSP gesteuerte Transgenexpression durch moderate Hyperthermie kontrollierbar ist. Dieser Promotor zeigt postinduziert ein sehr hohes Expressionsniveau und erreicht im Maximum einer Expressionskinetik das des konstitutiv exprimierenden CMV-Promotors. Der Ursprung dieser effizienten dirigierten Genexpression liegt in der Struktur des HSP-Promotors begründet. Insgesamt vier Heat-Shock-Elements (HSEs) sowie eine untypische TATA-Sequenz sind für diesen induzierbaren Promotor charakteristisch (172). In verschiedenen Ansätzen konnte das hohe Expressionsniveau des durch den HSP-Promotor angetriebenen Gens, sowohl in Reporterexpressionssystemen (121, 172, 173) als auch in Verbindung mit der induzierten Transgenexpression eines therapeutischen Gens (115, 174) belegt werden. In den unterschiedlichen Transgenexpressionssystemen konnte ferner gezeigt werden, dass 24 Stunden Postinduktion das erreichte Expressionsniveau des HSP-dirigierten Gens mit dem eines durch den CMV-Promotor gesteuerten Transgens in Bezug auf die Expression vergleichbar ist (157, 166).

Charakterisierung der HSP-dirigierten Genexpression in rekonstituierten hämatopoietischen Zellen der Milz nach Stammzelltransplantation

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes zur Unterstützung des körpereigenen Immunsystems zur Abstoßung von Tumoren. Die Zielzellen dieser Anwendung stellen die tumorinfiltrierenden hämatopoietische Zellen dar. Es soll ein induzierbares System entwickelt werden, welches es ermöglicht, Transgene einer räumlichen Expressionskontrolle in diesen Zellen zu unterwerfen. Nachdem *in vitro* die Funktionalität des HSP-Promotors in humanen und murinen Zelllinien erfolgreich nachgewiesen werden kann, erfolgt *in vivo* die Charakterisierung des Promotors im Mausmodell; zunächst mit GFP als Reportergen. Wie beschrieben erfolgt die Induktion der HSP70B gesteuerten Genexpression in den hämatopoietischen Zellen der Milz *ex vivo* bei 43°C nach erfolgter Rekonstitution der Tiere posttransplant (Abb. 21). Nach 24 Stunden postinduktion kann eine Zunahme des geometrischen Mittels der GFP Expression im Mittel um das 3,5 bis 5-fache in den hämatopoietischen Zellen ermittelt werden. Dieser Erhöhung der induzierten Transgenexpression steht eine Zunahme ebenfalls um das 3,5 bis 5-fache bei einer konstitutiven GFP-Expression (Abb.20) in den entsprechenden Tiergruppen posttransplant gegenüber. Der Vergleich dieser Werte bestätigt die Eignung des Promotors einer kontrollierten Genexpression *in vivo*. Wie bereits *in vitro* gezeigt, bestätigen auch die *in vivo* Daten die hohe Induzierbarkeit des HSP70B Promotors; verglichen mit dem CMV-Promotor, sowie das geringe Basalexpressionsniveau im Vergleich mit den entsprechenden Kontrolltieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die untersuchten hämatopoietischen Zelllinien, die den murinen, lentiviral manipulierten Stammzellen entspringen, die HSP-GFP-Kassette im Genom tragen und die induzierte Transgenexpression durch den HSP70B Promotor gesteuert wird. Die *in vitro* bestimmten Eigenschaften des HSP-Promotors bleiben nach erfolgter Transplantation weiterhin bestehen. Die Hitzeinduzierbarkeit des Promotors sowie die hohe Induzierbarkeit, verglichen mit einem konstitutiven Expressionssystem, haben in den untersuchten Blutzelllinien genauso Bestand wie in den *in vitro* untersuchten Zelllinien. Aufgrund dieser Daten kann die Grundlage für den gentherapeutische Ansatz dieser Arbeit bestätigt werden. Der HSP-Promotor ermöglicht eine kontrollierte Expression von Transgenen mit einem geringen basalen Expressionsniveau im nicht-induzierten Zustand bei gleichzeitiger hoher Induzierbarkeit.

Charakterisierung der HSP-gesteuerten Genexpression in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen von rekonstituierten Tieren nach Stammzelltransplantation

Konventionelle Formen der Tumortherapie umfassen die operative Tumoresektion, die Chemotherapie oder die Strahlentherapie, die allerdings nur bei wenigen Tumorentitäten, wie z.B. kindliche Leukämien kurativ wirksam sind. Speziell Patienten mit soliden Tumoren zeigen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine hohe Mortalität auf. Zu dieser Gruppe gehören auch Patienten mit bösartigen Gliomen. Hirntumore betreffen Menschen aller Altersgruppen. Sie stellen die häufigsten soliden Tumore im Kindes- und Jugendalter und sind nach den Leukämien die zweithäufigste Krebserkrankung dieser Altersgruppe. 21% aller bösartigen Neubildungen werden auf diese soliden Tumore zurückgeführt (175). Gliome sind unempfindlich gegenüber den klassischen Tumortherapien, wie aggressive chirurgische Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie. Die diffusen, hoch-infiltrierenden Eigenschaften der Gliomzellen verhindern das vollständige Entfernen des Tumorgewebes, was letztlich zu einem Rezidiv führt (176).

Humane Hirnneoplasmen sowie Hirnmetastasen sind histologisch durch Infiltrate charakterisiert. Tumor infiltrierende Lymphozyten ($CD4^+$, $CD8^+$) sowie Tumor assoziierte Makrophagen akkumulieren im soliden Tumor (177-179). Diese infiltrierenden Elemente der zellulären Immunantwort können ebenso im Rattenmodell mit C6- bzw. CNS-1-Zellen (180, 181) als auch im Mausmodell mit GL261-Zellen (182) nachgewiesen werden. Svenning *et al.*, zeigt, dass der Anteil der infiltrierenden Elemente in Abhängigkeit zum jeweiligen Tumor steht (183). Ausgehend von Daten von insgesamt 17 soliden, bösartigen Tumoren wurde eine Quantifizierung durchgeführt, die zeigt, dass 0,5-5% (Mittel 2.0%) TILs und 1,0-28% (Mittel 7.4%) TAMs die Gesamtzellzahl des tumoralen Gewebes ausmachen. Die in den Tieren gewachsenen Gliome zeigen ebenso diese für solide Tumore charakterischen Infiltrate. Eine HSP70B gesteuerte Transgenexpression wurde in den verschiedenen hämatopoietischen Zellen der Milz und in den tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen posttransplant untersucht. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten einer HSP70B gesteuerten Transgenexpression mit einem sehr geringen Basalexpressionsniveau in Abwesenheit des Stimulus, zeigt sich, dass dieses Niveau in den infiltrierenden hämatopoietischen Zellen deutlich erhöht ist (Abb. 22). Mit einem Anstieg des geometrischen Mittels der HSP70B gesteuerten nicht-induzierten GFP-Expression (bis zum 5-fachen in infiltrierenden $CD11b^+$ Zellen, bis zum 3-fachen in $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen) im Vergleich zu den geometrischen Mitteln in den entsprechenden Zellpopulationen der Milz, zeigt sich, dass die HSP70B gesteuerte Expression ohne einen externen physikalischen Stimulus im tumoralen Microenvironment bereits induziert ist. Die *ex vivo* Induktion der infiltrierenden hämatopoietischen Zellen steigert das geometrische Mittel der GFP Expression nur geringfügig. Dieses belegt, dass die HSP70B gesteuerte Genexpression in den infiltrierenden Zellen bereits induziert ist. Die hohe Induzierbarkeit dieses Promotors in den infiltrierenden hämatopoietischen Zellen kann durch den Vergleich mit der konstitutiven CMV getriebenen Transgenexpression in den TILs, TAMs belegt werden (Abb. 22). Beide Expressionssysteme (HSP70B, CMV getriebene

Expression) zeigen in den untersuchten Zellfraktionen vergleichbar hohe Werte des geometrischen Mittels der Reportergenexpression. Der Vergleich der Basalexpression der CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺-Zellen aus der Milz, mit denen der tumorinfiltrierenden CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺-Zellen unterstreicht die Potenz des HSP70B-Promotors hinsichtlich eines Einsatzes zur lokal-kontrollierten Genexpression, da die im tumoralen Microenvironment beobachtete Autoinduktion ausschließlich in den tumorinfiltrierenden Zellpopulationen nachzuweisen ist. Außerhalb des malignen Gewebes ist eine GFP-Expression, die unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors steht, nicht nachweisbar. Interessanterweise ist die transkriptionelle Zunahme der HSP-Gene und die Tumorprogression eng miteinander verbunden. Diese Zunahme begründet sich auf einige onkogene Signalwege. Normalerweise wird die HSP-Regulation in normalen Zellen durch p53 und p63 gesteuert. Diese beiden Proteine reprimieren die Transkription der HSP-Gene durch Bindung an den Transkriptionsfaktor NF- κ B (184, 185). Infolge einer Mutation im Tumorsuppressor p53 kann diese HSP-Regulation entfallen. Durch die genetische Modifikation erfolgt ein Verlust der Repression des HSP70-Promotors (186-189). Zusätzlich zu der Reversion der HSP-Repression erfolgt durch die massive Induktion der HSPs in den Tumorzellen ein positiver Effekt auf die Transkription, hervorgerufen durch den „heat-shock response pathway“ (190). Es konnte auch gezeigt werden, dass nekrotische Zellen das HSP70-Protein sezernieren, welches dann entweder in den extrazellulären Zwischenraum eintritt bzw. evtl. im Blutkreislauf zirkuliert (191, 192). Inwiefern nun die Möglichkeit besteht, dass dieses sezernierte HSP70 der nekrotischen Zellen des Tumors den HSP-Promotor in den tumorinfiltrierenden Zellen aktivieren kann, ist nicht bekannt. Möglicherweise kann aber der Promotor sich selbst im Rahmen von zellulärem Stress, hervorgerufen durch das tumorale Microenvironment, induzieren. Dieses ist charakterisiert durch:

- i) Hypoxie, die durch die mangelnde Durchblutung des massiv proliferierenden Tumors entsteht (193).
- ii) Einem intra- und extrazellulärem niedrigen pH-Wert (194).
- iii) Nährstoffmangel (194).

Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Tumorprogression mit genetischer Instabilität einhergeht (195) und somit die Tumorgenese als ein mutator Phänotyp anzusehen ist (196). Von all diesen Punkten nimmt die Hypoxie eine Schlüsselposition im tumoralen Microenvironment ein. Sie führt zur Bildung genetischer Instabilität, verbunden mit einem hohen Level an DNA-Schäden sowie zu einer Erhöhung der Mutageneserate. Ferner liegen in der Tumor-Hypoxie die geringen Heilungsaussichten eines soliden Tumors begründet. Die Tumor-Hypoxie stellt einen wesentlichen Faktor der tumoreigenen Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie dar (197, 198). Die sauerstoffarmen Bedingungen im tumoralen Mikroenvironment beschleunigen die maligne Progression des Zellgewebes sowie die Metastasierung (199). Wie bereits beschrieben, besteht die zelluläre Antwort auf verschiedene metabolische und physikalische Stressfaktoren in der Expression des HSP70-Proteins, die durch den HSP-Promotor vermittelt wird (200-204). Die bisherigen auf dem HSP-Promotor basierenden Genexpressionssysteme nutzen die Hitzeinduzierbarkeit des HSP-Promotors zur lokal-temporären Expression eines Transgens (166). Die Induktion einer Transgenexpression im sauerstoffarmen Milieu konnte erfolgreich anhand des hypoxia-inducible-

factor-1 (HIF-1) gezeigt werden (193). Aber auch die hypoxieinduzierte Aktivierung des HSP-Promotors - mit der entsprechenden Transgenexpression - wurde wiederholt belegt (116, 117). Fasst man die gegebenen Punkte, die den zellulären Stress im tumoralen Microenvironment initiieren zusammen, kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass all diese beschriebenen Faktoren zu einer Induktion der HSP70B gesteuerten Transgenexpression führen. Ferner, unter Berücksichtigung der Daten von Lee *et al.* liegt der Schluß nahe, dass gerade die Aktivierung des Promotors durch den in schlecht durchbluteten Arealen hypoxischen Stress getrieben wird und die weiteren Stressfaktoren potenzierend wirken (193). Vergleiche der geometrischen Mittelwerte der HSP-abhängigen Transgenexpression sowie der unter dem Einfluss des konstitutiven Promotors stehenden Genprodukte in den infiltrierenden hämatopoietischen Zellen deuten darauf hin, dass der hypoxische Stimulus, ebenso wie die Hyperthermie, zu einer hohen Induzierbarkeit des Promotors führen und die Expressionsraten beider promotorgetriebener Genexpressionen miteinander zu vergleichen sind.

Charakterisierung einer induzierten Tumormunität durch die kontrollierte Genexpression einer dominant-negativen Variante des TGF- β -Rezeptors

Die Therapie von Tumorpatienten erfolgt gegenwärtig überwiegend mit den klassischen Methoden der operativen Resektion, der Strahlentherapie und der Chemotherapie. Neben diesen traditionellen Ansätzen kommen immer mehr auch die neu entwickelten oben genannten Immuntherapien zum Einsatz. Eine insuffiziente antitumorale Immunantwort ist nicht allein durch eine immunologische Ignoranz bedingt. Sie wird vielmehr durch aktive immunsuppressive Mechanismen gesteuert, die die Funktion von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beeinträchtigen. Untersuchungen in murinen Modellsystemen solider Tumoren haben gezeigt, dass TGF- β eine Schlüsselrolle bei immunregulatorischen Prozessen zukommt, die die Immunogenität von Tumoren verhindern (205-207).

TGF- β ist der häufigste Faktor, der von Tumorzellen sezerniert wird und eine Immunsuppression bewirkt. Dieses pleiotrope Zytokin inhibiert die T-Zell-Proliferation, die Differenzierung in zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und Helfer-T-Lymphozyten sowie die durch Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) ausgelöste T-Zellstimulation (208). Durch diese immunsupprimierenden Eigenschaften des sezernierten TGF- β können Tumore der anti-tumoralen T-Zell-Antwort entgehen. Weiterhin induziert das sezernierte TGF- β das Wachstum der FOXP3-exprimierenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die einen direkten negativen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung haben (207) und die Tumorgenese unterstützen (209). Diese Wirkmechanismen sind gegenwärtig noch wenig verstanden. Durch eine spezifische Blockierung dieser Signalwege kann eine Immunogenität im Tumormodell erhöht werden. Im Mausmodell sterben jedoch TGF- β -knock-out Mäuse in den ersten Lebenswochen an einer überschießenden multifokalen inflammatorischen Reaktion (210, 211), so dass es lange Zeit unklar blieb, ob diese systemische Blockierung mit dem Leben vereinbar ist. Entscheidend zur Beantwortung dieser Frage tragen Experimente an einer dominant-negativen Variante des TGF- β -

Rezeptors II bei, bei der es zur rezeptorvermittelten Inaktivierung des freien TGF- β kommt. Im beschriebenen Mausmodell führt dieser erfolgreiche Ansatz zu einer Suppression der Tumormetastasierung (100). Jedoch zeigt sich, dass eine konstitutive Expression dieses Rezeptors in den hämatopoietischen Zellen zu einer abnormalen Zunahme der myeloiden Zellen sowie einer Zunahme von Entzündungsreaktionen führt (101); einhergehend mit einer drastisch erhöhten Morbidität und Mortalität. Diese Ergebnisse belegen die bestehenden Probleme, die auf einer konstitutiven Genexpression basierten Tumorthherapie zugrunde liegen. Verheissungsvolle Ansätze mit konstitutiv exprimierten therapeutischen Transgenen, die zu einer Tumorsuppression bzw. -abstoßung im Körper führen, gehen in der Regel mit einer hohen Zytotoxizität des gesunden Gewebes einher.

Der HSP70B Promotor wird im Hinblick auf die Fragestellung einer gesteuerten lokal kontrollierbaren Genexpression hin untersucht. In den Experimenten mit GFP als Reportergen kann die erfolgreiche Eingrenzung der gesteuerten GFP-Expression in den tumorinfiltrierenden Zellen belegt werden. Im weiteren Ansatz wird im Rahmen dieser Studie eine lokal kontrollierbare Expression des TGF- β -DNR innerhalb des malignen Gewebes posttransplant charakterisiert. Eine erfolgreiche Inaktivierung von gelöstem TGF- β durch die Expression der dominant negativen Variante des TGF- β -Rezeptors-II kann in der funktionellen Charakterisierung dieses Rezeptors in transduzierten Mv1Lu Zellen belegt werden (Abb. 27). Zellen die diesen Rezeptor konstitutiv exprimieren, entgehen der für diese Zellen charakteristischen TGF- β induzierten Arrestierung in der G1-Phase.

Die HSP70B dirigierte Expression des dominant-negativen TGF- β -Rezeptors-II in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen führt hierbei zu einer deutlichen Verlangsamung des Tumorwachstums. Die Volumenzunahme des malignen Gewebes in den genterapierten Mäusen ist bis zu 140-fach geringer als in den Kontrolltieren (Abb.28, 29). Diese drastische Tumorregression kann ebenfalls in Tieren beobachtet werden, bei denen der Rezeptor konstitutiv in den tumorinfiltrierenden Zellen exprimiert wird (Abb. 28, 29). Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, führt diese vergleichbare Tumorregression, die in beiden Versuchsansätzen beobachtet wird, zu dem Schluss, dass, wie bereits die HSP70B gesteuerte GFP Expression, die HSP70B getriebene TGF- β -DNR-II in den untersuchten Zellpopulationen ohne äußeren physikalischen Stimulus exprimiert wird. Das induzierte Expressionsniveau dieses Oberflächenrezeptors mit dem eines konstitutiven Expressionssystems vergleichbar. Obwohl der TGF- β Signaltransduktionspfad bislang nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte gezeigt werden, dass die antitumorale Wirkung einer spezifischen Blockade des TGF- β -Signalling verschiedene Ursprünge hat. TGF- β hat einen weit reichenden Effekt auf das Immunsystem, indem es einen Großteil der Immunzellen und deren Funktion im Körper negativ beeinflusst (212, 213). TGF- β kontrolliert die T-Zell Homöostase, indem es direkt die T-Zellproliferation und -aktivierung durch eine signifikante Inhibierung der IL-2 Expression unterdrückt (214). Ferner wird die Antigenpräsentation auf den APCs verhindert (212). Bislang ist nur wenig über den molekularen Mechanismus der TGF- β initiierten Suppression der Antitumoraktivität der T-Zellen bekannt. Aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL), die überwiegend für die antigenspezifische Beseitigung von Tumorzellen verantwortlich sind, nutzen zwei Signalwege, um Zielzellen zu

eliminieren (215). Der erste ist der sogenannte Granule-Exocytosis-Pathway. Erkennt eine aktivierte CTL eine Tumorzelle, induziert sie das *Membrane-Pore-Forming-Protein* Perforin und den Transport der apoptoseinduzierenden Proteasen Granzym A (GzmA) und/oder GranzymB (GzmB) in die Zielzelle (216, 217). Der zweite ist der Fas-Fas ligand (FasL) Signalweg, bei dem die Apoptose in der Zielzelle durch die Freigabe von CytochromC und der Aktivierung von Caspasen initiiert wird (215). Zusätzlich werden lösliche Mediatoren wie TNF- α und IFN- γ ausgeschüttet, die in der Zielzelle eine zytotoxische Reaktion hervorrufen. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Expression der Immunmediatoren Perforin, GzmA, GzmB, IFN- γ und FasL gezielt inhibiert (83) bzw. so beeinflusst, dass diese potenten Moleküle für eine erfolgreiche CTL initiierte zytotoxische Reaktion bzw. eine CTL initiierte Anti-Tumorreaktion in der Immunantwort fehlen.

Zusammengefasst stellt TGF- β eine Hürde in der T-Zell initiierten anti-Tumorantwort dar. Durch die beschriebenen molekularen Mechanismen kann der Tumor höchstwahrscheinlich der Immunantwort entgehen. Wie entscheidend die extensive immunsupprimierende Wirkung des sezernierten TGF- β auf das Immunsystem durch die negative Beeinflussung vieler Immunzelltypen und deren Funktion ist, bestätigen Teile dieser Arbeit. Die Durchführung einer immunmodulatorischen Behandlung mit einer Suppression des Tumorwachstums kann mit Hilfe von TGF- β insensitiven hämatopoietischen Leukozyten (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen) durch Expression des TGF- β -DNR in den tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen ermöglicht werden. Im Mausmodell konnte bereits erfolgreich die Suppression des malignen Gewebes gezeigt werden. Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle der gentherapeutisch veränderten hämatopoietischen Zellen in der Tumorabwehr. Aktivierte CTL sind ihrer Funktion nach zuständig für eine Tumor initiierte Immunantwort. Diese Immunantwort kann durch TGF- β infolge des negativen Einflusses auf die T-Zell Homoeostase und der daraus resultierenden Inhibierung der T-Zellproliferation, und -aktivierung sowie durch die Inhibierung der Präsentation von Antigenen auf den Antigen-Präsentierenden-Zellen (212) supprimiert werden. Durch die rezeptorvermittelte Unterbrechung des TGF- β -Signalweges infolge der Expression des TGF- β -DNR kann dieser inhibitorische Effekt von TGF- β auf die CTLs verringert werden. Offensichtlich verringert die Expression des dominant-negativen Rezeptors die TGF- β vermittelte negative Regulierung der zytolytischen Proteine, so dass die zuvor insensitiven Leukozyten eine effektive Immunantwort des adaptiven Immunsystems initiieren können.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein induzierbares lentivirales Genexpressionssystem entwickelt und charakterisiert, welches eine räumlich kontrollierte Expression von Transgenen ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine räumliche Expression des eingesetzten therapeutischen Transgens im tumoralen Microenvironment eine effektive Unterstützung des adaptiven Immunsystems erfolgt, die zu einer Regression des malignen Gewebes führt. Diese Eigenschaften einer erfolgreichen Behandlung bei gleichzeitiger Verminderung der Zytotoxizität eröffnen neue Wege in der gegenwärtigen Tumortherapie.

Kapitel 5 Ausblick

Der Einsatz des hier beschriebenen induzierbaren HSP70B-Promotors eröffnet neue Wege in der Therapie von malignem Gewebe. Die Limitationen eines Einsatzes von tumoricidalen Agenzien im Rahmen einer möglichen gentherapeutischen Anwendung können durch die Möglichkeit der streng lokalen Expressionskontrolle umgangen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine erfolgreiche Anwendung einer kontrollierten Expression einer dominant negativen Variante des TGF- β -II Rezeptors in tumorinfiltrierenden hämatopoietischen Zellen im Tiermodell gezeigt. Ebenso könnten die Potenz anderer möglicher therapeutischer Transgene mit dem hier gezeigten System evaluiert werden. Derzeit ist z.B. eine systemische Applikation des Tumor-Nekrose-Faktors, ein hoch potentes Zytokin mit beachtlicher anti-Tumor-Aktivität, aufgrund der starken systemischen Nebenwirkungen nicht möglich.

Obgleich *in vitro* eine Temperatur von $>42^{\circ}\text{C}$ zur Induktion des HSP70B Promotors benötigt wird, sollte in fortführenden Experimenten der Einfluss von Fieber auf das Expressionsverhalten einer HSP70B gesteuerten Genexpression evaluiert werden. Fieberinduzierende Medikamente könnten den Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe verabreicht werden, um so den Einfluss der erhöhten Temperatur *in vivo* auf die systemische Expression des Transgens zu bestimmen.

Hitzeschock-Proteine werden ebenfalls als Stressproteine bezeichnet. Sie werden u.a. durch allgemeine zelluläre Stressreaktionen, wie z.B. erhöhte Temperatur oder andere Faktoren induziert. Es handelt sich hierbei um unspezifische Reaktionen des Körpers, die durch ein spezifisches Syndrom (Blutdrucksteigerung, Hormonausschüttung, Tachypnoe, erhöhten Muskeltonus, Schweißsekretion und erhöhte Herzaktivität) gekennzeichnet sind. Stress wird u.a. durch verschiedenartige unspezifische Reize (z.B. physikalische, geistige oder emotionale) verursacht, die das Gleichgewicht des Organismus stören. Die Aufgabe der HSP besteht somit in der Erhöhung der thermische Toleranz und im Ausüben einer molekularen Schutzfunktion. Es muss jedoch untersucht werden, ob die Aktivierung der HSP-Reaktion (und somit die Initiierung des HSP-Promotors) in Abhängigkeit zum Stresspegel steht. Eine Induktion bereits bei niedrigem Stresspegel würde den Einsatz dieses induzierbaren Systems limitieren, da es dadurch zu einer ungewollten systemischen Expression käme. Um dieses zu überprüfen müssten die Versuchstiere verschiedenen Arten physikalischer Stresssituationen ausgesetzt werden. Auch eine künstliche Erhöhung des Blutdrucks sowie der Herzfrequenz sollte als Versuchsansatz in Erwägung gezogen werden, da diese Parameter in einem späteren möglichen Einsatz im Menschen von sehr hoher Bedeutung sein werden.

Ein weiterer Ansatz besteht in der Fokussierung auf den Mechanismus, der die Tumorsuppression in den gentherapierten Tieren initiiert. In den vorliegenden Experimenten wurde ausführlich gezeigt, dass der in der Maus gewachsene solide Tumor durch infiltrierende hämatopoietische Zellen charakterisiert werden kann. Durch die Integration des TGF- β -II-DNRs in das Genom der hämatopoietischen Zellen und seine anschließende Expression erfolgt eine Stimulation des Immunsystems, die zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt. Es bleibt zu klären, inwieweit diese Expression des

dominant negativen Rezeptors die funktionellen Eigenschaften der infiltrierenden Zellen, im Besonderen der Leukozyten, beeinflusst. Ein Ansatz zur Evaluierung der möglicherweise veränderten Eigenschaften wäre der Vergleich des Zytokinsekretionsprofil von T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Hierzu könnte zunächst das Sekretionsprofil von transduzierten T-Zellen *in vitro* hinsichtlich IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-10 bestimmt und mit der Sekretion von naiven Wildtyp-T-Zellen verglichen werden. Aus diesen Ergebnissen können Rückschlüsse auf die aktivierende Wirkung der manipulierten T-Zellen auf das adaptive bzw. angeborene Immunsystem gezogen werden.

Es ist bekannt, dass TGF- β einen inhibitorischen und immunmodulatorische Effekt auf das Immunsystem ausübt. Um den molekularen Mechanismus des dominant negativen Rezeptors zu entschlüsseln, könnten zunächst *in vitro* Versuche zum Expressionsverhalten von naiven und lentiviral manipulierten T-Zellen im Hinblick auf die Expression von Perforin, GranzymA, GranzymB, IFN- γ und FasLigand in Gegenwart und in Abwesenheit von löslichem TGF- β durchgeführt werden. Wie oben beschrieben, definieren diese Moleküle das zytotoxische „Gen-Programm“ von T-Lymphozyten. Falls die TGF- β initiierte Inhibierung der genannten Moleküle in den naiven T-Zellen nicht in den TGF- β -DNR exprimierende T-Zellen nachweisbar ist, ist dieses ein Hinweis auf die dominant negative rezeptorvermittelte Inaktivierung des gelösten TGF- β . Diese Daten können mit den *in vivo* Analysen aus T-Zellen nach Transplantation verglichen werden. Hierzu müssen T-Zellen aus der Milz und dem Tumor der verschiedenen Tiergruppen gewonnen und ebenfalls in Gegenwart und Abwesenheit von gelöstem TGF- β *ex vivo* kultiviert werden. Anhand einer FACS-Analyse kann anschließend eine TGF- β initiierte Inhibierung der Expression von Perforin, GranzymA, GranzymB, Interferon- γ und FasLigand evaluiert werden.

Diese Daten ermöglichen Rückschlüsse auf den molekularen Wirkmechanismus des eingebrachten dominant negativen TGF- β -Rezeptors-II.

Kapitel 6 Literatur

1. Becker N., W.J. 2001. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland (1997, jährliche Aktualisierung der Daten im Internet). Springer Verlag.
2. Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
3. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar, and A.C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.
4. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293-299.
5. Schnurr, M., C. Scholz, S. Rothenfusser, P. Galambos, M. Dauer, J. Robe, S. Endres, and A. Eigler. 2002. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res* 62:2347-2352.
6. Foley, E.J. 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13:835-837.
7. Whiteside, T.L. 1994. Tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Ser* 61:137-148.
8. Qin, Z., and T. Blankenstein. 1995. Tumor growth inhibition mediated by lymphotoxin: evidence of B lymphocyte involvement in the antitumor response. *Cancer Res* 55:4747-4751.
9. Blattman, J.N., R. Antia, D.J. Sourdive, X. Wang, S.M. Kaech, K. Murali-Krishna, J.D. Altman, and R. Ahmed. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195:657-664.
10. Tuttle, T.M., C.W. McCrady, T.H. Inge, M. Salour, and H.D. Bear. 1993. gamma-Interferon plays a key role in T-cell-induced tumor regression. *Cancer Res* 53:833-839.
11. Qin, Z., and T. Blankenstein. 2000. CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12:677-686.
12. Barth, R.J., Jr., J.J. Mule, P.J. Spiess, and S.A. Rosenberg. 1991. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 173:647-658.
13. Qin, Z., G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao, and T. Blankenstein. 1998. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 4:627-630.
14. Kreitman, R.J. 1999. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578.
15. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97:192-197.
16. Rosenberg, S.A., and M.T. Lotze. 1986. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 4:681-709.
17. van den Broek, M.F., D. Kagi, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1995. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol* 25:3514-3516.
18. Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber.

2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
19. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
 20. Feinman, R., D. Henriksen-DeStefano, M. Tsujimoto, and J. Vilcek. 1987. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol* 138:635-640.
 21. Fisch, P., E. Meuer, D. Pende, S. Rothenfusser, O. Viale, S. Kock, S. Ferrone, D. Fradelizi, G. Klein, L. Moretta, H.G. Rammensee, T. Boon, P. Coulie, and P. van der Bruggen. 1997. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human V γ 9/V δ 2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol* 27:3368-3379.
 22. Penninger, J.M., T. Wen, E. Timms, J. Potter, V.A. Wallace, T. Matsuyama, D. Ferrick, B. Sydora, M. Kronenberg, and T.W. Mak. 1995. Spontaneous resistance to acute T-cell leukaemias in TCRV γ 1.1J γ 4C γ 4 transgenic mice. *Nature* 375:241-244.
 23. Cox, C.A., G. Shi, H. Yin, B.P. Vistica, E.F. Wawrousek, C.C. Chan, and I. Gery. 2008. Both Th1 and th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. *J Immunol* 180:7414-7422.
 24. O'Garra, A., L. Steinman, and K. Gijbels. 1997. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 9:872-883.
 25. Ansel, K.M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24:607-656.
 26. Mosmann, T.R., L. Li, and S. Sad. 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 9:87-92.
 27. Coussens, L.M., and Z. Werb. 2001. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* 193:F23-26.
 28. Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58:3491-3494.
 29. Zou, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5:263-274.
 30. Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-213.
 31. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
 32. Brigati, C., D.M. Noonan, A. Albini, and R. Benelli. 2002. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* 19:247-258.

33. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-1647.
34. Dalerba, P., A. Ricci, V. Russo, D. Rigatti, M.R. Nicotra, M. Mottolese, C. Bordignon, P.G. Natali, and C. Traversari. 1998. High homogeneity of MAGE, BAGE, GAGE, tyrosinase and Melan-A/MART-1 gene expression in clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma: implications for protocol design of therapeutic antigen-specific vaccination strategies. *Int J Cancer* 77:200-204.
35. Gjerstorff, M.F., and H.J. Ditzel. 2008. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens* 71:187-192.
36. Logsdon, C.D., M.K. Fuentes, E.H. Huang, and T. Arumugam. 2007. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 7:777-789.
37. Colella, T.A., T.N. Bullock, L.B. Russell, D.W. Mullins, W.W. Overwijk, C.J. Luckey, R.A. Pierce, N.P. Restifo, and V.H. Engelhard. 2000. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med* 191:1221-1232.
38. Pittet, M.J., D. Valmori, P.R. Dunbar, D.E. Speiser, D. Lienard, F. Lejeune, K. Fleischhauer, V. Cerundolo, J.C. Cerottini, and P. Romero. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* 190:705-715.
39. Overwijk, W.W., A. Tsung, K.R. Irvine, M.R. Parkhurst, T.J. Goletz, K. Tsung, M.W. Carroll, C. Liu, B. Moss, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo. 1998. gp100/pm17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med* 188:277-286.
40. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and D. Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281-1284.
41. Robbins, P.F., M. El-Gamil, Y.F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S.A. Rosenberg. 1996. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183:1185-1192.
42. Epping, M.T., and R. Bernards. 2006. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 66:10639-10642.
43. Reilly, R.T., M.B. Gottlieb, A.M. Ercolini, J.P. Machiels, C.E. Kane, F.I. Okoye, W.J. Muller, K.H. Dixon, and E.M. Jaffee. 2000. HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 60:3569-3576.

44. Wolf, D., and V. Rotter. 1985. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:790-794.
45. Vonderheide, R.H. 2002. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* 21:674-679.
46. Altieri, D.C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3:46-54.
47. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10:4129-4135.
48. Frazer, I.H., R. De Kluyver, G.R. Leggatt, H.Y. Guo, L. Dunn, O. White, C. Harris, A. Liem, and P. Lambert. 2001. Tolerance or immunity to a tumor antigen expressed in somatic cells can be determined by systemic proinflammatory signals at the time of first antigen exposure. *J Immunol* 167:6180-6187.
49. Turner, M.S., P.A. Cohen, and O.J. Finn. 2007. Lack of effective MUC1 tumor antigen-specific immunity in MUC1-transgenic mice results from a Th/T regulatory cell imbalance that can be corrected by adoptive transfer of wild-type Th cells. *J Immunol* 178:2787-2793.
50. Ranges, G.E., I.S. Figari, T. Espevik, and M.A. Palladino, Jr. 1987. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166:991-998.
51. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
52. Markowitz, S.D., and A.B. Roberts. 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:93-102.
53. Attisano, L., and J.L. Wrana. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12:235-243.
54. Kingsley, D.M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146.
55. Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
56. Wrana, J.L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura, and J. Massague. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.
57. De Larco, J.E., U.R. Rapp, and G.J. Todaro. 1978. Cell surface receptors for ecotropic MuLV: detection and tissue distributions of free receptors in vivo. *Int J Cancer* 21:356-360.
58. Roberts, A.B., U.I. Heine, K.C. Flanders, and M.B. Sporn. 1990. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 580:225-232.
59. Tucker, M.R., W.B. Guilford, and C.W. Howard. 1984. Coronoid process hyperplasia causing restricted opening and facial asymmetry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58:130-132.
60. Padgett, R.W., R.D. St Johnston, and W.M. Gelbart. 1987. A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 325:81-84.
61. Hu, P.P., M.B. Datto, and X.F. Wang. 1998. Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr Rev* 19:349-363.

62. Bassing, C.H., J.M. Yingling, D.J. Howe, T. Wang, W.W. He, M.L. Gustafson, P. Shah, P.K. Donahoe, and X.F. Wang. 1994. A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 263:87-89.
63. Feng, X.H., and R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693.
64. Lebrin, F., M.J. Goumans, L. Jonker, R.L. Carvalho, G. Valdimarsdottir, M. Thorikay, C. Mummery, H.M. Arthur, and P. ten Dijke. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23:4018-4028.
65. Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584.
66. Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
67. Carcamo, J., A. Zentella, and J. Massague. 1995. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol* 15:1573-1581.
68. Abdollah, S., M. Macias-Silva, T. Tsukazaki, H. Hayashi, L. Attisano, and J.L. Wrana. 1997. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272:27678-27685.
69. Macias-Silva, M., S. Abdollah, P.A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano, and J.L. Wrana. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224.
70. Kretschmar, M., F. Liu, A. Hata, J. Doody, and J. Massague. 1997. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11:984-995.
71. Chai, J., J.W. Wu, N. Yan, J. Massague, N.P. Pavletich, and Y. Shi. 2003. Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *J Biol Chem* 278:20327-20331.
72. Shi, Y., A. Hata, R.S. Lo, J. Massague, and N.P. Pavletich. 1997. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388:87-93.
73. Shi, Y., Y.F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massague, and N.P. Pavletich. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94:585-594.
74. Zawel, L., J.L. Dai, P. Buckhaults, S. Zhou, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and S.E. Kern. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1:611-617.
75. Kurisaki, A., S. Kose, Y. Yoneda, C.H. Heldin, and A. Moustakas. 2001. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* 12:1079-1091.
76. Xiao, Z., X. Liu, and H.F. Lodish. 2000. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275:23425-23428.
77. Chen, H.B., J.G. Rud, K. Lin, and L. Xu. 2005. Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J Biol Chem* 280:21329-21336.

78. Lagna, G., A. Hata, A. Hemmati-Brivanlou, and J. Massague. 1996. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383:832-836.
79. Inman, G.J., and C.S. Hill. 2002. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem* 277:51008-51016.
80. Pulaski, L., M. Landstrom, C.H. Heldin, and S. Souchelnytskyi. 2001. Phosphorylation of Smad7 at Ser-249 does not interfere with its inhibitory role in transforming growth factor-beta-dependent signaling but affects Smad7-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* 276:14344-14349.
81. Tsukazaki, T., T.A. Chiang, A.F. Davison, L. Attisano, and J.L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95:779-791.
82. Akhurst, R.J., and A. Balmain. 1999. Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. *J Pathol* 187:82-90.
83. Thomas, D.A., and J. Massague. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8:369-380.
84. Jong, H.S., H.S. Lee, T.Y. Kim, Y.H. Im, J.W. Park, N.K. Kim, and Y.J. Bang. 2002. Attenuation of transforming growth factor beta-induced growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell lines by cyclin D1 overexpression. *Biochem Biophys Res Commun* 292:383-389.
85. Abbott, A. 2002. On the offensive. *Nature* 416:470-474.
86. Chokri, M., M. Freudenberg, C. Galanos, P. Pointron, and J. Bartholeyns. 1989. Antitumoral effects of lipopolysaccharides, tumor necrosis factor, interferon and activated macrophages: synergism and tissue distribution. *Anticancer Res* 9:1185-1190.
87. Davis, I.D. 2000. An overview of cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 78:179-195.
88. Ciupitu, A.M., M. Petersson, C.L. O'Donnell, K. Williams, S. Jindal, R. Kiessling, and R.M. Welsh. 1998. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 187:685-691.
89. Hanson, H.L., D.L. Donermeyer, H. Ikeda, J.M. White, V. Shankaran, L.J. Old, H. Shiku, R.D. Schreiber, and P.M. Allen. 2000. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 13:265-276.
90. Qasim, W., H.B. Gaspar, and A.J. Thrasher. 2005. T cell suicide gene therapy to aid haematopoietic stem cell transplantation. *Curr Gene Ther* 5:121-132.
91. Chyczewska, E., and R.M. Mroz. 1997. Cytokines in lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 42 Suppl 1:8-22.
92. Parmiani, G., L. Rivoltini, G. Andreola, and M. Carrabba. 2000. Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett* 74:41-44.

93. Butterfield, L.H. 2004. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127:S232-241.
94. Leonard, J.P., M.L. Sherman, G.L. Fisher, L.J. Buchanan, G. Larsen, M.B. Atkins, J.A. Sosman, J.P. Dutcher, N.J. Vogelzang, and J.L. Ryan. 1997. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90:2541-2548.
95. Li, C.Y., Q. Huang, and H.F. Kung. 2005. Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol* 2:81-91.
96. Siegel, J.P., and R.K. Puri. 1991. Interleukin-2 toxicity. *J Clin Oncol* 9:694-704.
97. Ryffel, B., F. Di Padova, M.H. Schreier, M. Le Hir, H.P. Eugster, and V.F. Quesniaux. 1997. Lack of type 2 T cell-independent B cell responses and defect in isotype switching in TNF-lymphotoxin alpha-deficient mice. *J Immunol* 158:2126-2133.
98. Ignatova, T.N., V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O.N. Suslov, F.D. Vrionis, and D.A. Steindler. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39:193-206.
99. Shah, A.H., and C. Lee. 2000. TGF-beta-based immunotherapy for cancer: breaching the tumor firewall. *Prostate* 45:167-172.
100. Shah, A.H., W.B. Tabayoyong, S.Y. Kimm, S.J. Kim, L. Van Parijs, and C. Lee. 2002. Reconstitution of lethally irradiated adult mice with dominant negative TGF-beta type II receptor-transduced bone marrow leads to myeloid expansion and inflammatory disease. *J Immunol* 169:3485-3491.
101. Shah, A.H., W.B. Tabayoyong, S.D. Kundu, S.J. Kim, L. Van Parijs, V.C. Liu, E. Kwon, N.M. Greenberg, and C. Lee. 2002. Suppression of tumor metastasis by blockade of transforming growth factor beta signaling in bone marrow cells through a retroviral-mediated gene therapy in mice. *Cancer Res* 62:7135-7138.
102. Hill, H.C., T.F. Conway, Jr., M.S. Sabel, Y.S. Jong, E. Mathiowitz, R.B. Bankert, and N.K. Egilmez. 2002. Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptive antitumor immunity and cure of disseminated disease. *Cancer Res* 62:7254-7263.
103. Block, A., F. Puls, J. Muller, D. Milasinovic, D. Igelmann, P. Schafer, N. Kupfermann, A. Schmoltdt, D. Ameis, and H. Greten. 2003. Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system. *J Gene Med* 5:190-200.
104. Yu, D., D. Chen, C. Chiu, B. Razmazma, Y.H. Chow, and S. Pang. 2001. Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors. *Cancer Gene Ther* 8:628-635.
105. Raben, D., D.J. Buchsbaum, M.B. Khazaeli, M.E. Rosenfeld, G.Y. Gillespie, W.E. Grizzle, T. Liu, and D.T. Curiel. 1996. Enhancement of radiolabeled antibody binding and tumor localization through adenoviral transduction of the human carcinoembryonic antigen gene. *Gene Ther* 3:567-580.
106. Ido, A., H. Uto, A. Moriuchi, K. Nagata, Y. Onaga, M. Onaga, T. Hori, S. Hirono, K. Hayashi, T.

- Tamaoki, and H. Tsubouchi. 2001. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 61:3016-3021.
107. Nuyts, S., L. Van Mellaert, J. Theys, W. Landuyt, P. Lambin, and J. Anne. 2001. The use of radiation-induced bacterial promoters in anaerobic conditions: a means to control gene expression in clostridium-mediated therapy for cancer. *Radiat Res* 155:716-723.
108. Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
109. Hallahan, D.E., A.Y. Chen, M. Teng, and A.J. Cmelak. 1999. Drug-radiation interactions in tumor blood vessels. *Oncology (Williston Park)* 13:71-77.
110. Takahashi, M., T. Kawabe, K. Ogura, S. Maeda, Y. Mikami, N. Kaneko, A. Terano, and M. Omata. 1997. Expression of vascular endothelial growth factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. *Biochem Biophys Res Commun* 234:493-498.
111. Ueda, T., N. Akiyama, H. Sai, N. Oya, M. Noda, M. Hiraoka, and S. Kizaka-Kondoh. 2001. c-IAP2 is induced by ionizing radiation through NF-kappaB binding sites. *FEBS Lett* 491:40-44.
112. Worthington, J., T. Robson, M. Murray, M. O'Rourke, G. Keilty, and D.G. Hirst. 2000. Modification of vascular tone using iNOS under the control of a radiation-inducible promoter. *Gene Ther* 7:1126-1131.
113. Joki, T., M. Nakamura, and T. Ohno. 1995. Activation of the radiosensitive EGR-1 promoter induces expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and sensitivity of human glioma cells to ganciclovir. *Hum Gene Ther* 6:1507-1513.
114. Huang, Q., J.K. Hu, F. Lohr, L. Zhang, R. Braun, J. Lanzen, J.B. Little, M.W. Dewhirst, and C.Y. Li. 2000. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res* 60:3435-3439.
115. Dreano, M., J. Brochot, A. Myers, C. Cheng-Meyer, D. Rungger, R. Voellmy, and P. Bromley. 1986. High-level, heat-regulated synthesis of proteins in eukaryotic cells. *Gene* 49:1-8.
116. Mestril, R., S.H. Chi, M.R. Sayen, and W.H. Dillmann. 1994. Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem J* 298 Pt 3:561-569.
117. Benjamin, I.J., B. Kroger, and R.S. Williams. 1990. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6263-6267.
118. Madio, D.P., P. van Gelderen, D. DesPres, A.W. Olson, J.A. de Zwart, T.W. Fawcett, N.J. Holbrook, M. Mandel, and C.T. Moonen. 1998. On the feasibility of MRI-guided focused ultrasound for local induction of gene expression. *J Magn Reson Imaging* 8:101-104.
119. Blackburn, R.V., S.S. Galoforo, P.M. Corry, and Y.J. Lee. 1998. Adenoviral-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene into prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 58:1358-1362.
120. Arai, Y., T. Kubo, K. Kobayashi, T. Ikeda, K. Takahashi, M. Takigawa, J. Imanishi, and Y. Hirasawa. 1999. Control of delivered gene expression in chondrocytes using heat shock protein 70B promoter. *J Rheumatol* 26:1769-1774.

121. Smith, R.C., M. Machluf, P. Bromley, A. Atala, and K. Walsh. 2002. Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter in vivo. *Hum Gene Ther* 13:697-706.
122. Mulligan, L.M., E. Gardner, B.A. Smith, C.G. Mathew, and B.A. Ponder. 1993. Genetic events in tumour initiation and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosomes Cancer* 6:166-177.
123. Baum C., O.W. 1996. Somatischer Gentransfer in der Onkologie. In: Onkologie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. In.
124. Dachs, G.U., G.J. Dougherty, I.J. Stratford, and D.J. Chaplin. 1997. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 9:313-325.
125. Tuting, T., W.J. Storkus, and M.T. Lotze. 1997. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 75:478-491.
126. Licht, T., F. Herrmann, M.M. Gottesman, and I. Pastan. 1997. In vivo drug-selectable genes: a new concept in gene therapy. *Stem Cells* 15:104-111.
127. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4:346-358.
128. Coffin, J.M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. . 1997. Retroviruses. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press
129. Anderson, W.F. 2000. Gene therapy scores against cancer. *Nat Med* 6:862-863.
130. Munk, C., J. Lohler, V. Prassolov, U. Just, M. Stockschlader, and C. Stocking. 1997. Amphotropic murine leukemia viruses induce spongiform encephalomyelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5837-5842.
131. Finer, M.H., T.J. Dull, L. Qin, D. Farson, and M.R. Roberts. 1994. kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* 83:43-50.
132. Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M.E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery, and F. Kashanchi. 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 9:2388-2413.
133. Bukrinsky, M.I., S. Haggerty, M.P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666-669.
134. Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9825-9830.
135. Kafri, T., U. Blomer, D.A. Peterson, F.H. Gage, and I.M. Verma. 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 17:314-317.
136. Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.

137. Takahashi, M., H. Miyoshi, I.M. Verma, and F.H. Gage. 1999. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol* 73:7812-7816.
138. Adhya, S. 1989. Multipartite genetic control elements: communication by DNA loop. *Annu Rev Genet* 23:227-250.
139. Serfling, E., A. Lubbe, K. Dorsch-Hasler, and W. Schaffner. 1985. Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. *Embo J* 4:3851-3859.
140. Svennevig, J.L., O. Closs, M. Harboe, and H. Svaar. 1978. Characterization of lymphocytes isolated from non-lymphoid human malignant tumours. *Scand J Immunol* 7:487-493.
141. Vose, B.M., and M. Moore. 1985. Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. *Semin Hematol* 22:27-40.
142. Bottazzi, B., N. Polentarutti, A. Balsari, D. Boraschi, P. Ghezzi, M. Salmona, and A. Mantovani. 1983. Chemotactic activity for mononuclear phagocytes of culture supernatants from murine and human tumor cells: evidence for a role in the regulation of the macrophage content of neoplastic tissues. *Int J Cancer* 31:55-63.
143. Shimokawara, I., M. Imamura, N. Yamanaka, Y. Ishii, and K. Kikuchi. 1982. Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer* 49:1456-1464.
144. Cohen, S.N., A.C. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2110-2114.
145. Chen, C., and H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752.
146. Klein, C., H. Bueler, and R.C. Mulligan. 2000. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 191:1699-1708.
147. Weber, E., W.F. Anderson, and N. Kasahara. 2001. Recent advances in retrovirus vector-mediated gene therapy: teaching an old vector new tricks. *Curr Opin Mol Ther* 3:439-453.
148. Donello, J.E., J.E. Loeb, and T.J. Hope. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-5092.
149. Huang, Y., K.M. Wimler, and G.G. Carmichael. 1999. Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *Embo J* 18:1642-1652.
150. Zufferey, R., J.E. Donello, D. Trono, and T.J. Hope. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
151. Svennevig, J.L., and H. Svaar. 1979. Content and distribution of macrophages and lymphocytes in solid malignant human tumours. *Int J Cancer* 24:754-758.
152. Reddy, G.P., C.Y. Tiarks, L. Pang, J. Wu, C.C. Hsieh, and P.J. Quesenberry. 1997. Cell cycle analysis and synchronization of pluripotent hematopoietic progenitor stem cells. *Blood* 90:2293-2299.

153. Spangrude, G.J., and D.M. Brooks. 1993. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood* 82:3327-3332.
154. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58-62.
155. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11:3053-3058.
156. Atkins, M.B., M. Regan, and D. McDermott. 2004. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:6342S-6346S.
157. Borrelli, M.J., D.M. Schoenherr, A. Wong, L.J. Bernock, and P.M. Corry. 2001. Heat-activated transgene expression from adenovirus vectors infected into human prostate cancer cells. *Cancer Res* 61:1113-1121.
158. Guilhon, E., P. Voisin, J.A. de Zwart, B. Quesson, R. Salomir, C. Maurange, V. Bouchaud, P. Smirnov, H. de Verneuil, A. Vekris, P. Canioni, and C.T. Moonen. 2003. Spatial and temporal control of transgene expression in vivo using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. *J Gene Med* 5:333-342.
159. Schmidt, M., T. Heimberger, P. Gruensfelder, G. Schler, and F. Hoppe. 2004. Inducible promoters for gene therapy of head and neck cancer: an in vitro study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261:208-215.
160. Boulaiz, H., J.A. Marchal, J. Prados, C. Melguizo, and A. Aranega. 2005. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51:3-22.
161. Marshall, E. 1995. Gene therapy's growing pains. *Science* 269:1050, 1052-1055.
162. Verma, I.M., and N. Somia. 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
163. Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Hasler, B. Fleckenstein, and W. Schaffner. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-530.
164. Doll, R.F., J.E. Crandall, C.A. Dyer, J.M. Aucoin, and F.I. Smith. 1996. Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther* 3:437-447.
165. Luo, P., X. He, T.C. Tsang, and D.T. Harris. 2004. A novel inducible amplifier expression vector for high and controlled gene expression. *Int J Mol Med* 13:319-325.
166. Gerner, E.W., E.M. Hersh, M. Pennington, T.C. Tsang, D. Harris, F. Vasanwala, and J. Brailey. 2000. Heat-inducible vectors for use in gene therapy. *Int J Hyperthermia* 16:171-181.
167. Brown, E.J., M.W. Albers, T.B. Shin, K. Ichikawa, C.T. Keith, W.S. Lane, and S.L. Schreiber. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756-758.
168. Gossen, M., and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
169. No, D., T.P. Yao, and R.M. Evans. 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3346-3351.

170. Wang, Y., B.W. O'Malley, Jr., S.Y. Tsai, and B.W. O'Malley. 1994. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8180-8184.
171. Luna, M.C., A. Ferrario, S. Wong, A.M. Fisher, and C.J. Gomer. 2000. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter. *Cancer Res* 60:1637-1644.
172. Weber, J.A., D.J. Taxman, Q. Lu, and D.S. Gilmour. 1997. Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region. *Mol Cell Biol* 17:3799-3808.
173. Vekris, A., C. Maurange, C. Moonen, F. Mazurier, H. De Verneuil, P. Canioni, and P. Voisin. 2000. Control of transgene expression using local hyperthermia in combination with a heat-sensitive promoter. *J Gene Med* 2:89-96.
174. Braiden, V., A. Ohtsuru, Y. Kawashita, F. Miki, T. Sawada, M. Ito, Y. Cao, Y. Kaneda, T. Koji, and S. Yamashita. 2000. Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter. *Hum Gene Ther* 11:2453-2463.
175. Robert-Koch-Institut, editor. 2008. Krebs in Deutschland, 6. überarbeitete Auflage.
176. Lawler, S.E., P.P. Peruzzi, and E.A. Chiocca. 2006. Genetic strategies for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* 13:225-233.
177. Kuppner, M.C., M.F. Hamou, and N. de Tribolet. 1988. Immunohistological and functional analyses of lymphoid infiltrates in human glioblastomas. *Cancer Res* 48:6926-6932.
178. Miescher, S., T.L. Whiteside, N. de Tribolet, and V. von Flidner. 1988. In situ characterization, clonogenic potential, and antitumor cytolytic activity of T lymphocytes infiltrating human brain cancers. *J Neurosurg* 68:438-448.
179. Schackert, G., R.D. Simmons, T.M. Buzbee, D.A. Hume, and I.J. Fidler. 1988. Macrophage infiltration into experimental brain metastases: occurrence through an intact blood-brain barrier. *J Natl Cancer Inst* 80:1027-1034.
180. Badie, B., M.H. Kramar, R. Lau, D.A. Boothman, J.S. Economou, and K.L. Black. 1998. Adenovirus-mediated p53 gene delivery potentiates the radiation-induced growth inhibition of experimental brain tumors. *J Neurooncol* 37:217-222.
181. Dewey, R.A., G. Morrissey, C.M. Cowsill, D. Stone, F. Bolognani, N.J. Dodd, T.D. Southgate, D. Klatzmann, H. Lassmann, M.G. Castro, and P.R. Lowenstein. 1999. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med* 5:1256-1263.
182. Kjaergaard, J., J. Tanaka, J.A. Kim, K. Rothchild, A. Weinberg, and S. Shu. 2000. Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res* 60:5514-5521.
183. Svennevig, J.L., M. Lovik, and H. Svaar. 1979. Isolation and characterization of lymphocytes and macrophages from solid, malignant human tumours. *Int J Cancer* 23:626-631.

184. Taira, T., M. Sawai, M. Ikeda, K. Tamai, S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 1999. Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* 274:24270-24279.
185. Wu, G., M. Osada, Z. Guo, A. Fomenkov, S. Begum, M. Zhao, S. Upadhyay, M. Xing, F. Wu, C. Moon, W.H. Westra, W.M. Koch, R. Mantovani, J.A. Califano, E. Ratovitski, D. Sidransky, and B. Trink. 2005. DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res* 65:758-766.
186. Agoff, S.N., J. Hou, D.I. Linzer, and B. Wu. 1993. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 259:84-87.
187. Ghioni, P., F. Bolognese, P.H. Duijf, H. Van Bokhoven, R. Mantovani, and L. Guerrini. 2002. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol* 22:8659-8668.
188. Madden, S.L., E.A. Galella, J. Zhu, A.H. Bertelsen, and G.A. Beaudry. 1997. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. *Oncogene* 15:1079-1085.
189. Tsutsumi-Ishii, Y., K. Tadokoro, F. Hanaoka, and N. Tsuchida. 1995. Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ* 6:1-8.
190. Khaleque, M.A., A. Bharti, D. Sawyer, J. Gong, I.J. Benjamin, M.A. Stevenson, and S.K. Calderwood. 2005. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* 24:6564-6573.
191. Asea, A., S.K. Kraeft, E.A. Kurt-Jones, M.A. Stevenson, L.B. Chen, R.W. Finberg, G.C. Koo, and S.K. Calderwood. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6:435-442.
192. Calderwood, S.K., J.R. Theriault, and J. Gong. 2005. Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 35:2518-2527.
193. Lee, C.H., C.L. Wu, and A.L. Shiau. 2007. Hypoxia-induced cytosine deaminase gene expression for cancer therapy. *Hum Gene Ther* 18:27-38.
194. Williams, K.J., R.L. Cowen, and I.J. Stratford. 2001. Hypoxia and oxidative stress. Tumour hypoxia--therapeutic considerations. *Breast Cancer Res* 3:328-331.
195. Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
196. Loeb, L.A. 2001. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61:3230-3239.
197. Brown, J.M., and A.J. Giaccia. 1998. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58:1408-1416.
198. Frederiksen, L.J., D.R. Siemens, J.P. Heaton, L.R. Maxwell, M.A. Adams, and C.H. Graham. 2003. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol* 170:1003-1007.
199. Graeber, T.G., C. Osmanian, T. Jacks, D.E. Housman, C.J. Koch, S.W. Lowe, and A.J. Giaccia. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.
200. Hammond, G.L., Y.K. Lai, and C.L. Markert. 1982. Diverse forms of stress lead to new

- patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3485-3488.
201. Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191.
 202. Mosser, D.D., N.G. Theodorakis, and R.I. Morimoto. 1988. Coordinate changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells. *Mol Cell Biol* 8:4736-4744.
 203. Theodorakis, N.G., D.J. Zand, P.T. Kotzbauer, G.T. Williams, and R.I. Morimoto. 1989. Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. *Mol Cell Biol* 9:3166-3173.
 204. Wu, B.J., R.E. Kingston, and R.I. Morimoto. 1986. Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:629-633.
 205. Bierie, B., and H.L. Moses. 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6:506-520.
 206. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29:117-129.
 207. Li, M.O., Y.Y. Wan, S. Sanjabi, A.K. Robertson, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
 208. Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7:1118-1122.
 209. Nishikawa, H., T. Kato, I. Tawara, T. Takemitsu, K. Saito, L. Wang, Y. Ikarashi, H. Wakasugi, T. Nakayama, M. Taniguchi, K. Kuribayashi, L.J. Old, and H. Shiku. 2005. Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9253-9257.
 210. Kulkarni, A.B., C.G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.M. Ward, and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.
 211. Shull, M.M., I. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
 212. Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2002. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2:46-53.
 213. Letterio, J.J. 2000. Murine models define the role of TGF-beta as a master regulator of immune cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:81-87.
 214. McKarns, S.C., R.H. Schwartz, and N.E. Kaminski. 2004. Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol* 172:4275-4284.
 215. Russell, J.H., and T.J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323-370.
 216. Lieberman, J., and Z. Fan. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15:553-559.

217. Trapani, J.A., and M.J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747.

Anhang

Geräte

AutoMACS-Gerät	AutoMACS Separator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Brutschränke:	Steri-Cycle CO ₂ Incubator, ThermoLifeSciences, Egelsbach
Dokumentationssysteme:	SigmaPlot 2001 for Windows Version 7.101 Microsoft® Word 2000
Elektrophoresekammern:	Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System, BIO-RAD, München
FACS-Gerät:	FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Geldokumentationssystem:	GelPrint 2000i, BioPhotonics Corp., Ann Arbor, MI, USA
Glaswaren:	Schott, Mainz
Heizblock:	Thermomixer comfort, 1,5 ml, eppendorf, Hamburg
Mikroskop:	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrowelle:	Privileg/Quelle, Fürth
PCR-Thermocycler:	<i>Mastercycler gradient</i> , eppendorf, Hamburg
Pipetten:	Research® (variabel), 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe:	pipetus®-akku, Hirschmann®Laborgeräte, Eberstadt
Spannungsquellen:	POWER PAC 300, BIO-RAD, München
Sterilwerkbanken:	S1/S2: HERAsafe HS, Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Photometer:	BioPhotometer, eppendorf, Hamburg
Schüttler:	CERTOMAT®HK, B.Braun, Biotech International, Melsungen
Transilluminator:	302 nm, Bachofer, Reutlingen
<i>Vortex</i> :	REAX control, Heidolph, Schwabach
Waagen:	Elektronische Präzisionswaage BP 3100S, Sartorius, Göttingen
Wasserbad:	GFL, Burgwedel
Zählkammer:	Neubauer Zählkammer, BRAND, GmbH+Co KG, Wertheim
Zellsorter:	MoFlo™, Dako, Glostrup, Dänemark
Zentrifugen:	Centrifuge 5415D für 1,5/2 ml Gefäße, eppendorf, Hamburg Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

Verbrauchsmaterialien

Einmalinjektionskanüle	0,4 mm, Sterican®, Braun, Melsungen
Einwegpipetten	2, 5, 10 und 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht
HiBind®-DNA-Säulen	2 ml Sammel-Tubes
E.Z.N.A.®	Tissue DNA Mini Kit, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nylongaze	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Pasteurpipetten	BRAND, GmbH+Co KG
PCR-Gefäße	<i>Multiply®-PCR-Gefäße</i> , 0,5ml, Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
Plastikküvetten	UVette®, eppendorf, Hamburg
Prefilter Spin Cups	Absolutely RNA® Miniprep Kit
<i>2 ml receptacle tubes</i>	STRATAGENE, La Jolla, CA, USA
Reaktionsgefäße	1,5 ml easy cap und 0,5 ml Microtubes, Sarstedt, Nümbrecht
Röhre für Durchflußzytometer FACScan	5 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	1 ml, Terumo Europe, Leuven, Belgien
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ² , Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	<i>6- und 24-Well-Platten</i> , Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhren	15, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht

Zytokine

rh-Flt3L	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-GM-CSF	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL3	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL4	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-IL6	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
rm-SCF	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
h-TGF- β -I	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA

Primer

HSP_Fwd: 5'- gcccgctgctgcctcagggat -3'
HSP_Rev: 5'- aagcttctgtcggatgatgg -3'

TGF- β -DNR_Fwd: 5'- accggtatgggtcgggggctg -3'
TGF- β -DNR_Rev: 5'- gtcgactcagtagcagtcgaa -3'

Sequenzierungsprimer für *pGemT-Vector System* Klonierungsvektor

M13_Universal_Primer_Fwd: 5'- gtaaacgacggccagt -3'
M13_Universal_Primer_Rev: 5'- ggaaacagctatgacctg -3'

Lebenslauf

Fatih Noyan

Adresse: Manteuffelstrasse 6
30163 Hannover

Geburtsdatum: 04. November 1972

Nationalität: türkisch

Familienstand: ledig

Kinder: 3

Sprachkenntnisse: Deutsch, Englisch, Türkisch, Französisch

Schulbildung: August 1984 bis Juni 1991
Goethe-Gymnasium Hildesheim, Abschluß: Abitur

Studium: Universität Hannover
Wintersemester 1991 bis Sommersemester 1992
Studiengang: Bauingenieurwesen (Dipl.)
Wintersemester 1992 bis Sommersemester 1996
Studiengang: Physik (Dipl.)
Wintersemester 1996 bis Sommersemester 2002
Studiengang: Biologie (Dipl.)

Diplomarbeit: Januar 2001 bis März 2002
Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover

„Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung der Chitinase *chi92* aus *Streptomyces* sp. ATCC 11238“

Promotion: seit August 2002
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover
„Kontrollierte Genexpression zur Induktion einer antitumoralen Immunität gegen solide Tumore durch Transplantation genetisch modifizierter hämatopoietischer Stammzellen“

Berufliche Tätigkeiten: 1991 bis 2000 Deutsche Messe AG
1993 bis 1996 Betreuung des medizinischen Anfängerpraktikums an der Medizinische Hochschule Hannover
1998 bis 2001 Betreuung des Mikrobiologischen Grundkurses am Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ricardo A. Dewey sowie Prof. Dr. Christoph Klein für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Prof. Dr. Christoph Klein danke ich zudem, für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt arbeiten zu dürfen. „Never stop thinking!“

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klein bedanken.

Lieber Axel, Dein offenes Ohr, Deine wissenschaftlichen Ratschläge – wo wäre ich nur ohne sie?

Lieber Martin, ich danke Dir für all Deine Hilfe bei meinen Mausexperimenten. Die arbeitsreichen und lustigen Momente in der Zellkultur werde ich noch lange in Erinnerung behalten.

Lieber Matthias, Dir danke ich für all die immunologischen Diskussionen, Deiner Geduld beim Lesen und korrigieren dieser Arbeit und den aufmunternden Worten zur rechten Zeit. Du warst immer zur richtigen Zeit am richtigen Ort...

Lieber Jens, es hat richtig Spaß gemacht, mit Dir zu Fachsimpeln. Danke für all die Diskussionen und Deiner grossen Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Lieber „Mr. Rent-An-Office“ Matthias. Dein Asyl in der schwierigen Zeit war Gold wert. Nur brauchen wir dringend eine neue Kaffeemaschine!

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Elisabeth, meinen Schwiegereltern Dorethea und Reimer Zilch und meinen Kindern Kaya, Malte und Jaspar. Liebe Elisabeth, Dir danke ich für das „Rücken-Frei-Halten“ in den stressigen Zeiten und für all Deine Geduld und Unterstützung, die mir im Verlauf der letzten Jahre sehr geholfen haben. Liebe Dorethea, lieber Reimer, wenn Not am Mann war: Ihr ward da – ohne „Wenn“ und „Aber“. Lieber Kaya, lieber Malte, lieber Jaspar, sei ein Tag noch so schlecht gewesen, Euer Lachen hat immer alles weggewischt und die Sonne an den wolkenverhangenen Himmel gezaubert.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern Benal und Kaya Noyan, meiner Schwester und meinem Schwager Figen und İlhami Günay. Ihr habt mich von klein auf unterstützt. Egal ob Schule oder Studium – bei allen Problemen und Schwierigkeiten habt Ihr mir einen Weg gezeigt und an mich geglaubt. Danke für all die Unterstützung seit ich denken kann. Ohne Euch wäre ich heute nicht hier.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Kontrollierte Genexpression zur Induktion einer antitumoralen Immunität gegen solide Tumore durch Transplantation genetisch modifizierter hämatopoietischer Stammzellen“ selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden.

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

Hannover, 16.06.2008

Fatih Noyan