

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Technische Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher

Als gemeinsames Projekt mit
Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger
I. Medizinische Tierklinik
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Wilfried Kraft

Angefertigt unter der Leitung von
Dr. med. vet. Thomas Brill

**Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze
Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Marei Müller-Heidelberg
aus
Hannover

München 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

**Allen tierischen und menschlichen
Krebspatienten gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum	4
2.1	Adenoviren.....	4
2.1.1	Adenoviren in der Humanmedizin	5
2.1.2	Adenoviren in der Tiermedizin	6
2.1.3	Adenoviren bei Katzen und anderen Felidae	6
2.1.4	Adenoviren in der Gentherapie	8
2.1.5	Nachweis von Adenoviren	10
2.1.6	Streuung und Persistenz von Adenoviren in-vivo.....	11
2.2	Antiadenovirale Immunantwort.....	13
2.2.1	Lokale Entzündungsreaktion.....	14
2.2.2	Messbare Parameter der humoralen und zellulären Immunantwort.....	17
2.2.3	Verlauf der antiadenoviralen Immunantwort	18
2.2.4	Einfluss verschiedener Applikationsarten	19
2.2.5	Präexistierende Immunität.....	20
2.2.6	Immunitätsdauer	22
2.2.7	Strategien zur Beeinflussung der Immunantwort.....	22
2.2.7.1	Medikamentöse Immunsuppression.....	23
2.2.7.2	Toleranzinduktion	24
2.2.7.3	Toleranz bei Neugeborenen	26
2.2.7.4	Serotypswitch.....	27
2.2.7.5	Einsatz speziessfremder Adenoviren.....	27
2.2.7.6	Blockade bestimmter Zellpopulationen	28
2.3	Interleukin 2 (IL 2)	30
2.3.1	Eigenschaften und Wirkungen	30
2.3.2	Einheiten, Dosis und Pharmakokinetik	32
2.3.3	Speziesspezifität	33
2.3.4	Einfluss verschiedener Applikationsarten	35
2.3.5	Entzündlicher Kontext.....	35
2.3.6	Zytokinkinetik bei der adenoviralen Gentherapie	36
2.3.7	Messen der Zytokinkonzentration, lokaler und systemischer Auswirkungen.....	38
2.4	Interferon γ (IFN γ).....	39
2.4.1	Eigenschaften und Wirkungen	39
2.4.2	Einfluss auf den Gentransfer	41
2.4.3	Nachweis	42
2.5	Reaktionen des Organismus auf Transgen und transduzierte Zellen.....	43
2.5.1	Immunantwort gegen das Transgen	43
2.5.2	Beeinflussung der Transgenexpression durch den Immunstatus	44
2.5.3	Transduktion von Zellen	45
2.5.4	Der Bystander-Effekt	46
2.5.5	Reaktionen auf transduzierte Zellen.....	47

INHALTSVERZEICHNIS

2.6	Tumorimmunologie	49
2.6.1	Antitumorimmunität	49
2.6.2	Das Tumormilieu	51
2.6.3	Messen der Antitumorimmunität	51
2.7	Immunstimulation in der Tiermedizin	53
2.7.1	Bakterielle Immunstimulatoren	54
2.7.2	Paramunitätsinducer aus Pockenviren	55
2.7.3	Rekombinantes felines Interferon ω (Virbagen® Omega)	56
2.7.4	Immunstimulierende Tumorthherapie	58
2.7.5	Immunmodulation beim felinen Fibrosarkom	59
3	Eigene Untersuchungen	60
3.1	Material und Methoden	60
3.1.1	Studiendesign	60
3.1.2	Gewinnung, Transport und Lagerung der untersuchten Proben	62
3.1.3	TRANSGENE SA	63
3.1.4	Interleukin 2-Konzentration	64
3.1.4.1	Material	64
3.1.4.2	Methode	64
3.1.5	Antikörper gegen Interleukin 2	67
3.1.5.1	Material	67
3.1.5.2	Methode	68
3.1.6	Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper	70
3.1.6.1	Material	70
3.1.6.2	Methode	71
3.1.7	Neutralisierende antiadenovirale Antikörper	72
3.1.7.1	Material	72
3.1.7.2	Methode	74
3.1.7.3	Anpassung des Versuchsprotokolls	77
3.1.8	In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen	77
3.1.8.1	Material	77
3.1.8.2	Methode	78
3.1.9	Abweichungen vom Protokoll	79
3.1.10	Statistische Auswertung	79
3.2	Ergebnisse	81
3.2.1	Interleukin 2-Konzentration	81
3.2.2	Antikörper gegen Interleukin 2	89
3.2.3	Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper	97
3.2.4	Neutralisierende antiadenovirale Antikörper	104
3.2.5	Vergleich der beiden Applikationswege	110
3.2.5.1	Interleukin 2-Konzentration	110
3.2.5.2	Neutralisierende antiadenovirale Antikörper	112
3.2.6	In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen	113
3.2.7	Statistische Auswertung	116

INHALTSVERZEICHNIS

4	<i>Diskussion</i>	120
4.1	Adenoviren	122
4.2	Statistische Auswertung	124
4.3	Interleukin 2-Konzentration	126
4.3.1	Dosis.....	126
4.3.2	Weitere Betrachtungen.....	127
4.4	Immunantwort gegen das Transgen	129
4.4.1	Kreuzreaktion und Autoimmunität.....	129
4.5	Immunantwort gegen den Vektor	131
4.6	Vergleich der beiden Applikationswege	133
4.7	In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen	134
4.8	Interferon γ	135
4.9	Gefahren der zytokinvermittelten Immunstimulation	137
4.10	Immunität und Weiterführung der Therapie	138
4.11	Schlussbetrachtung und Ausblick	140
5	<i>Zusammenfassung</i>	141
6	<i>Summary</i>	143
7	<i>Résumé</i>	145
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	147
9	<i>Tabellenverzeichnis</i>	168
10	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	169
11	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	171
12	<i>Anhang</i>	174
12.1	Allgemeine Angaben zu Material und Reagenzien	174
12.2	Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Serum	176
12.3	Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline G	177
12.4	Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline M	179
12.5	Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline G .	181
12.6	Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline M .	183
12.7	Versuchsprotokoll Neutralisationstest	185
12.8	Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Zellkulturüberstand	187
13	<i>Danksagung</i>	188
14	<i>Remerciements</i>	189
15	<i>Lebenslauf</i>	190

1 EINLEITUNG

Erst allmählich werden in den letzten Jahren die Geheimnisse des Immunsystems entschlüsselt. Dieses hochkomplexe System ist einerseits unerlässlich für ein Überleben des Organismus während der ständigen Angriffe durch Erreger und Fremdstoffe und andererseits eine große Gefahr für das Individuum selbst, sobald die Kontrolle verloren geht und Abwehrmechanismen gegen den eigenen Körper gerichtet werden. Während die traditionelle Immunologie Antikörper als die zentralen Abwehrvermittler sieht, versteht die moderne Lehre das Abwehrsystem als ein Netzwerk verschiedenartiger Zellen, die mittels löslicher Mediatoren und mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen interagieren. Neben der Selbstkontrolle des Systems unterliegt es aber auch externen Einflüssen wie den neuroendokrinen Regulationsmechanismen (116).

Jede Tumorerkrankung muss immer als systemische Erkrankung gesehen werden, genauso wie die dadurch vorhandene Immunsuppression den ganzen Organismus betrifft und eine Therapie auch bei lokaler Anwendung das Ziel haben muss, die Gesamteinstellung des Immunsystems mit Hinblick auf diesen Tumor zu verändern (65). Dieses ist das Ziel der immunmodulierenden Gentherapie.

Das Fibrosarkom ist nach den Neoplasien des hämolymphatischen Systems der am häufigsten auftretende Tumor der Katze. Durch die auch in den öffentlichen Medien geführten Diskussionen über Impfungen und andere Entzündungen als Ursache dieses Malignoms und die oft charakteristische Lokalisation im Nackenbereich oder an der seitlichen Brustwand der Tiere sind viele Tierbesitzer sensibilisiert für die auftretende Problematik.

Ein weit im gesunden Gewebe operierender Chirurg, der auch vor Wirbelfortsatz- oder Brustwandresektionen nicht zurückschreckt, kann im Vergleich mit einem nur auf den palpierbaren Anteil des Tumors begrenzt operierenden Tierarzt die rezidivfreie Zeit ca. vervierfachen (274 Tage im Vergleich zu 66 Tagen tumorfreies Intervall) (98). Doch auch wenn die Radikalität der Operationsmethode entscheidend ist für die mögliche Heilung der Katze oder einen zumindest deutlich verlängerten rezidivfreien Zeitraum, ist das Ziel doch die Befreiung des Tieres von der Tumormasse, die möglicherweise durch eine Langzeitimmunität des Körpers gegen die Tumorzellen erreicht werden kann. Dies kann erreicht werden, indem Tumorzellen und umgebende körpereigene Zellen zu einer zytokinproduzierenden Quelle geformt werden, um zur Bekämpfung entarteter Gewebezellen beizutragen.

Bisher vorliegende Daten müssen von verschiedenen Spezies zusammengetragen werden, manche Erfahrungen stammen von Mäusen, Ratten und Affen aus Tierversuchen, einige von klinischen Versuchen am Menschen. Immer wieder stellt sich die Frage der speziesübergreifenden Übertragbarkeit, zu der noch viele Zusammenhänge unerforscht bleiben.

In der in München seit Mai 1999 angebotenen Gentherapie wird Katzen, die zum ersten oder auch schon zum wiederholten Mal ein Fibrosarkom entwickelt haben, vor oder nach der chirurgischen Intervention eine Lösung mit Adenoviren injiziert, die zytokinkodierende Gene transportieren. Es kommen Interleukin 2 (IL 2) und Interferon γ (IFN γ) zum Einsatz. Nach Infektion und Transduktion von Zellen werden diese Zytokine exprimiert und tragen durch eine Aktivierung verschiedener Anteile des Abwehrsystems zur besseren Erkennung und Bekämpfung der tumorösen Zellen durch die Katze selbst bei. T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen müssen an den Ort der möglicherweise herabgesetzten Immunabwehr gebracht werden. Diese sollen aktiviert werden, um tumorspezifische Antigene erkennen und bekämpfen zu können. Eine zeitlich möglichst weitreichende Immunität muss erreicht werden, um nach einer Operation verbleibende Resttumorzellen zu eliminieren und ein Rezidivieren des Malignoms zu verhindern (57).

Beim Fibrosarkom der Maus konnte eine komplette Tumorregression inkl. Langzeitimmunität mit einem adenoviralen IL 2-Transfer erreicht werden (229). Die Tiere waren nach erfolgreicher Vernichtung des Primärtumors in der Lage, eine systemische Immunität aufzubauen und zu erhalten, um einer Herausforderung durch Injektion frischer Tumorzellen zu trotzen (216).

Die Überlegung der Kombination zweier Zytokine begründet sich in ihrem additiven Effekt. Beide üben eine aktivierende Wirkung auf T-Helfer-Zellen aus, doch durch unterschiedliche Angriffspunkte in der Immunkaskade konkurrieren sie nicht, sondern ergänzen sich. Gleichzeitig werden hierbei der afferente und der efferente Arm des Immunsystems angesprochen. IFN γ verstärkt die Immunogenität der zu bekämpfenden Zielzellen, IL 2 sorgt für das notwendige kostimulatorische Signal für die aktiv werdenden zytotoxischen T-Lymphozyten und wirkt somit auf der Ebene der Effektorzellen (203). Schwierig bleibt es aber, die Wechselwirkungen abzuschätzen. In dem komplexen Geflecht sich gegenseitig hemmender und induzierender Zytokine, die nicht in dem Maße ihre Wirkung verändern, wie sich ihre Konzentration ändert, ist die Übertragbarkeit von In-vitro-Ergebnissen auf den Organismus nur sehr begrenzt möglich. Zu vielfältig sind die kombinatorischen Möglichkeiten von Einflussfaktoren.

EINLEITUNG

Während in der vorangegangenen Studie mit zytokinsezernierenden Verozellen bei Katzen und Hunden aus Praktikabilitätsgründen keine immunologischen Analysen durchgeführt wurden, soll dies jetzt an einem großen Tierkollektiv durchgeführt werden (198, 202).

Ziele der hier vorgelegten Laboruntersuchungen:

- Die Zytokinkinetik des in den transfizierten Zellen hergestellten humanen IL 2 ist wichtig sowohl für den Aspekt der Immunstimulation als auch aus Gründen der systemischen Toxizität. Es besteht das Problem, dass nur die Konzentration des Lymphokins im Serum untersucht werden kann, der lokale IL 2-Spiegel bleibt auf direktem Weg unzugänglich.
- Nach dem Gentransfer eines speziesfremden Gens und der Produktion des kodierten körperfremden Proteins erfolgt die Eliminierung des Genprodukts durch den Organismus. Die Frage, ob dadurch Risiken entstehen, muss beleuchtet werden.
- Die humorale Antwort des Immunsystems auf den Vektor ist besonders im Hinblick auf die Elimination der Adenoviren und auch der von ihnen transduzierten Zellen wichtig. Weiterhin stellt sich die Frage der Möglichkeit einer erneuten Applikation trotz präexistierender antiadenoviraler Immunität.
- Da die Applikationsart entscheidend ist für den Zugriff der körpereigenen Abwehr, müssen Unterschiede im Bezug auf die Injektionsstelle und den Therapiezeitpunkt untersucht werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Adenoviren

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einer linearen Doppelstrang-DNA und einer Genomgröße von 36 kb. Das erste Mal konnten sie 1953 von Rowe aus menschlichem Drüsengewebe isoliert werden. Sie werden in zwei Gattungen unterteilt: die Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind. Man unterscheidet mehr als 100 serologische Formen (Serotypen). Ein typisches Adenovirus hat einen Durchmesser von 60 - 90 nm, Fibern und einen ikosaedrischen Aufbau. Es kann sich teilende, ruhende wie auch bereits ausdifferenzierte Zellen, zum Beispiel Neuronen oder Hepatozyten, infizieren (179, 133, 141, 205).

Das Kapsid besteht aus 240 Hexonkomplexen mit jeweils drei Polypeptidmolekülen und zwölf Pentons. Diese wiederum sind zusammengesetzt aus einer pentavalenten Untereinheit von 400 kD („penton base“) aus fünf Arginin-Glycin-Asparagin-Sequenzen und einer Fiber aus erneut drei Polypeptiden und sind für die Internalisierung des Virus nötig (siehe auch Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Adenovirus). Diese Umhüllung schützt die virale DNA (74, 242, 191).

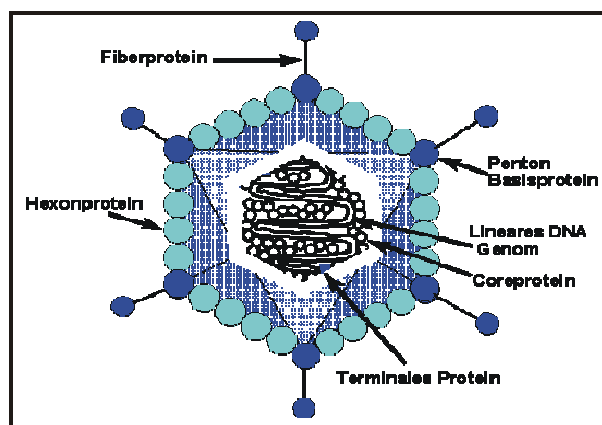


Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Adenovirus

Adenoviren benötigen 32 - 36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Bei der Bindung des Virus an die Zielzelle spielt die Wechselwirkung der viralen Fiberproteine mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle. Nach der Anlagerung des Viruspartikels kommt es zu einer weiteren Interaktion, diesmal zwischen den Pentonbasisproteinen und den zellulären Integrinen. Danach wird das Viruspartikel über Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt. Die Ansäuerung in diesen Endosomen führt zu einer Konformationsänderung der viralen Kapsidproteine, wodurch das „Uncoating“ und somit die Freisetzung des Virus in das Zytoplasma erfolgt. Nach Anlagerung an Poren des Nukleus wird die adenovirale DNA mit den assoziierten viralen Coreproteinen in den Zellkern transportiert, wo sie als Episom bestehen bleibt (46, 213).

Die Genexpression unterteilt man bei den Adenoviren in mehrere Phasen. Jede Phase umfasst die aufeinanderfolgende Expression viraler Gene, von denen einige für Transkriptionsregulatoren kodieren. Diese viralen Transkriptionsfaktoren regeln den korrekten Ablauf des Replikationszyklus der Adenoviren.

Das erste adenovirale Gen, das exprimiert wird, ist das E1-Gen. Dieser erste Schritt der Virusreplikation heißt sehr frühe („immediate early“) Genexpression. Beteiligt sind die Transkriptionseinheiten E1, E2, E3 und E4, die vor allem für Regulationsproteine kodieren. Daran schließen sich die verzögerte frühe („delayed early“, Transkriptionseinheiten IX und IVa2) und die späte („late“, Transkriptionseinheiten L1, L2, L3, L4, L5) Expression an, deren Gene für strukturbildende Eiweiße stehen (212, 141, 248, 191).

2.1.1 Adenoviren in der Humanmedizin

Es gibt 51 adenovirale Serotypen, die in sechs Gruppen (A - F) eingeteilt Humanpathogene darstellen. Im allgemeinen befallen Adenoviren vor allem das Epithel der Atemwege. Sie verursachen etwa 5 % - 15 % aller Erkältungskrankheiten (akute febrile Pharyngitis). Obwohl sie hauptsächlich harmlose Erkrankungen auslösen, treten sie auch als Erreger von gravierenderen Krankheiten wie Keratokonjunktivitis, Gastroenteritis, Pneumonie, Bronchitis und Hepatitis auf. Viren der Gruppe C werden am häufigsten isoliert und persistieren oft in den Tonsillen. In sehr seltenen Fällen können Adenovirusinfektionen auch zum Tode führen. Dies ist möglich, wenn die Viren immunsupprimierte Patienten oder Organe und Gewebe, die

außerhalb des normalen Wirtsspektrums liegen, befallen. Es tritt keine Aktivierung von Onkogenen auf (9, 221, 191).

2.1.2 Adenoviren in der Tiermedizin

In der Tiermedizin sind neben Atemwegserkrankungen bei Jungtieren von Rindern, Schafen und Puten vor allem drei schwere generalisierte Erkrankungen bekannt, die durch eine Virämie von Adenoviren hervorgerufen werden: Die Einschlusskörperchenhepatitis des Vogels ebenso wie die equine Adenovirus 1-Infektion bei Araberfohlen mit primärer, schwerer, kombinierter Immundefizienz haben häufig einen tödlichen Ausgang. Das canine Adenovirus 1 (CAV 1) verursacht die ansteckende Leberentzündung des Hundes mit möglichem perakutem Tod, wobei eine massive Lebernekrose charakteristisch ist. Durch eine hohe Rate geimpfter Tiere ist diese Erkrankung heute selten. CAV 1 kann auch für eine Immunkomplexerkrankung verantwortlich gemacht werden, bei der sich die Antikörper-Antigen-Komplexe in die Wände von Blutgefäßen mit schmalen Durchmesser einlagern. Ein klinisches Symptom ist das „blue eye“, Ausdruck eines Korneaödems. Auch beim Hund gibt es wie beim Menschen adenovirale Infektionen der oberen Atemwege mit milder Symptomatik (infektiöse Laryngotracheitis) (141, 221).

2.1.3 Adenoviren bei Katzen und anderen Felidae

Auch wenn bei einigen Spezies im Bereich unserer Haustiere klinische Erkrankungen durch Adenoviren und auch subklinische Infektionen gut bekannt sind, wurden für die Katze bisher nur zwei Fälle beschrieben. Beim ersten handelt es sich um eine Hauskatze mit generalisierter Adenovirose, die bewusstlos und mit Petechien auf den Schleimhäuten vorgestellt wurde und alsbald verstarb. Bei der Sektion wurden Perikard- und Abdominalergüsse festgestellt, Organschwellungen, Läsionen kleinerer Gefäße in Myokard und Darmwand, Ödeme und Petechien. Untersuchungen auf Schwermetalle, Antikoaganzien und weitere Toxine blieben negativ. Den Hinweis auf Adenoviren gaben kernständige Einschlusskörperchen in Endothelzellen des Gastrointestinaltraktes. In abgelösten Zellen fanden sich Zusammenschlüsse viraler Partikel in angedeuteter kristalliner Struktur, die als typisch für adenovirale Ansammlungen

gelten. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Darminhaltes wurde ein Adenoviruspartikel gefunden (125).

Häufig gehen klinisch in Erscheinung tretende Adenovirus-Erkrankungen auf einen kongenitalen oder erworbenen Zustand der Immundefizienz zurück. Die erwähnte Katze war in einer Probe des Abdominalergusses positiv auf das FeLV-Antigen p27 (Felines Leukosevirus) getestet worden, weshalb möglicherweise eine Immunsuppression vorgelegen haben mag, wofür auch die Leukopenie sowie eine Depletion der Lymphfollikel in der Milz und der Gesamtheit der Lymphknoten sprechen. Die Infektionsquelle bleibt aber im Verborgenen, und der Beweis, dass Adenoviren nicht nur vorhanden, sondern die Ursache des plötzlichen Todes waren, fehlt weiterhin (125).

Der zweite Fall betrifft eine ungarische, zweijährige Katze mit persistierender Adenovirusinfektion und auch Erregerausscheidung. Der Grund für eine Untersuchung lag in einem akuten Leberversagen begründet. Daraufhin wurden Rachen- und Enddarmabstriche durchgeführt, wobei per PCR (polymerase chain reaction) nach Amplifizierung in der Probe aus dem Rektum Adenovirus-DNA-Sequenzen gefunden wurden, was durch Klonieren und Sequenzieren bestätigt werden konnte. Die beiden ein Jahr später entnommenen Proben waren beide positiv. Die Infektion von Zellkulturen mit dem Isolat führte zu charakteristischen zytopathischen Effekten (ZPE). Bei Adenovirusinfektionen sind dies abgerundete, geschwollene Zellen in einer traubenförmigen Zusammenballung. Weiterhin wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die spezifisch das Hexon humaner Adenoviren erkennen. Das Ergebnis bestand in einer deutlichen zytoplasmatischen Fluoreszenz. Die Elektronenmikroskopie brachte typisch ikosaedrische Kapseln von 88 nm Durchmesser zum Vorschein. Auch serologisch blieb diese Katze über den gesamten Untersuchungszeitraum von 18 Monaten im indirekten ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) positiv auf antiadenovirale Antikörper. Hier könnte das erste Isolat eines felines Serotyps vorliegen, es kann sich aber sehr wohl auch um einen angepassten Serotyp humaner Adenoviren handeln (136, 181).

Aus dem Jahr 1978 stammt ein Fallbericht von Hepatitis bei einem schwarzen Panther in Indien, der als einziges klinisches Symptom eine 22-tägige Anorexie zeigte. Bei der Sektion fielen vor allem basophile Einschlusskörperchen im Zellkern der Hepatozyten auf, die den Befunden bei der ansteckenden Leberentzündung des Hundes stark ähneln (83). Hieraus

folgern Kennedy und Lakatos das Vorliegen einer Adenovirusinfektion, es fand jedoch keine Virusisolierung statt (125, 135). Unstrittig scheint nur die virale Genese dieser Erkrankung (83).

1999 zeigte ein antiadenovirales Antikörperscreening in Ungarn an 470 Katzen im ELISA ca. 15 % seropositive Tiere mit unterschiedlichen Verteilungen bei verschiedenen Rassezugehörigkeiten. Von 162 Katzen aus den Vereinigten Staaten waren 26 % positiv. In einem Tierversuchslabor in Italien wurden FIV-positive und -negative Katzen (Felines Immundefizienzvirus) in bezug auf antiadenovirale Antikörper verglichen. Die mit dem Immundefizienzvirus infizierten Tiere waren in 80 % der Fälle seropositiv, wohingegen nur 20 % der gesunden Tiere gegen Adenoviren gerichtete Immunglobuline zeigten. Die Gruppengröße lag jedoch jeweils bei nur fünf Tieren. Als Antigen zur Beschichtung der ELISA-Platten wurde ein humanes Adenovirus vom Typ 1 verwendet, die Kontrollseren mit vorhandenen antiadenoviralen Immunglobulinen stammten von absichtlich mit Adenoviren infizierten Versuchstieren. Katzen können also auf natürlichem Weg eine Infektion mit Adenoviren durchmachen, auch wenn diese vielleicht nur selten zu einer klinischen Erkrankung führt (134, 135).

2.1.4 Adenoviren in der Gentherapie

Schon seit über zehn Jahren werden Adenoviren in der Gentherapie eingesetzt. Ihre Vorteile liegen vor allem in der effizienten Infektion der meisten ausdifferenzierten Zellen, ohne dass eine Zellteilung Voraussetzung wäre (32), ihrer speziesübergreifenden Infektiosität im Sinne des Gentransfers (nicht aber der Replikation) (243), der einfachen Herstellung hochkonzentrierter Lösungen (10^{12} p.f.u. / ml) und einer Kapazität zur Aufnahme von bis zu 11 kb heterologer genetischer Information bei Vektoren mit E1- und E3-Deletion (19). Weiterhin ist nur eine geringe Pathogenität vorhanden, die in den meisten Fällen nicht speziesübergreifend wirkt (209) und durch die transiente Expression sowie die Nicht-Integration der Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle wird die Gefahr von Langzeitnebenwirkungen begrenzt (26, 191). Die genetische Information bleibt epichromosomal, eine Veränderung des zellulären Genotyps unterbleibt. So ist das Adenovirus ein guter Kandidat für den Transport von Genen, die vorübergehend exprimiert werden und ihre Wirkung entfalten sollen (46, 205). Anderer-

seits kann die nur vorübergehende Expression je nach Indikation auch als Nachteil gesehen werden (209). Toxizität und Immunogenität mit Blick auf die Reapplikation sind weitere Mankos.

Durch die Etablierung einer Zelllinie aus humanen, embryonalen Zellen der Niere (293-Zellen), die das E1-Gen des Adenovirus vom Typ 5 exprimieren, wurde der Weg zur Entwicklung nicht-replikationsfähiger Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie geebnet (191). Die Deletion des regulatorischen E1-Gens aus dem viralen Genom verhindert die Virusvermehrung und reduziert auch die Expression weiterer viraler Gene (168). Hierdurch wird die Immunantwort herabgesetzt. Sie ist aber weiterhin vorhanden, was wiederum sowohl Nachteile in der verkürzten Persistenz und den Schwierigkeiten bei der Reapplikation beinhaltet als auch Vorteile im Bezug auf die bessere lokale Limitierung des Vektors mit geringerer systemischer Streuung (siehe auch Kapitel 2.1.6 Streuung und Persistenz von Adenoviren in-vivo).

In einer 293-Zellkultur jedoch können E1-defiziente Viren unter Einbeziehung der in Chromosom 19 der Zellen integrierten Teile des Virusgenoms vermehrt werden. Sie stellen so ein infektiöses, aber durch die Unfähigkeit, sich in nicht-rekombinanten Zellen zu vervielfältigen auch sehr sicheres System des Gentransfers dar (191).

Eine Gefahr beim Einsatz nicht-replikationsfähiger Adenoviren besteht in der Möglichkeit, dass sich während der Produktion rekombinanter Adenoviren für den klinischen Einsatz durch Rekombination replikationsfähige Adenoviren bilden. Diese sog. replication-competent adenoviruses (RCA) entstehen durch Verknüpfung von Sequenzen des adenoviralen Vektors mit homologen Sequenzen in der Helferzelle, sodass der Vektor die E1-Region wiedererlangt. Dies kann bei Verwendung von 911-Zellen oder 293-Zellen geschehen. Durch Produktion der Viren auf PER.C6®-Zellen (humane embryonale Retinazellen), die keine Überlappungen mit viralen Sequenzen haben, kann dieses Problem ausgeschlossen werden, die Gefahr unkontrollierter Vermehrung und Verbreitung des Vektors wird gebannt (61).

Eine weitere Möglichkeit der Risikominimierung besteht darin, eine zusätzliche, essentielle Region des Virusgenoms zu entfernen (E2 oder E4). Dies sind sog. adenovirale Vektoren der zweiten Generation. So werden zwei voneinander unabhängige Rekombinationen nötig, um ein replikationskompetentes Genom herzustellen. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist verschwindend gering. Auch die Toxizität der Applikation sowie die entstehende entzündliche Wirkung werden dadurch minimiert, dass E4-kodierte Proteine wegfallen, die die Toxizität sowie die Stärke der inflammatorischen Reaktion bedingen (205, 191).

Als Variante wurden die „helper-dependent“ Adenoviren entwickelt, Vektoren der dritten Generation. Sie tragen keinerlei proteinkodierende Sequenzen, nur die Endsequenzen der Virionen-DNA, die sog. „inverted terminal repeats“ (ITR) stammen vom ursprünglichen Adenovirus, alle anderen Komponenten kommen von einem Helfervirus. Durch verminderte Zelltoxizität viraler Proteine und eine herabgesetzte Immunantwort des Patienten kann hierdurch eine langanhaltende Genexpression auf hohem Level erreicht werden, Probleme treten aber durch eine Instabilität des Vektors auf (207, 188, 205, 191).

Für die antivirale Immunantwort spielt es allerdings nicht die wichtigste Rolle, wie viele Anteile des Vektorgenoms entfernt wurden. Die progressive Deletion adenoviraler Genregionen erhöht nicht die Dauer des Verbleibs transduzierter Zellen und reduziert kaum die gegen den Vektor gerichtete Abwehr (148, 90). Diese ist stärker von der Immunogenität des Transgenproduktes abhängig (siehe auch Kapitel 2.5.5 Reaktionen auf transduzierte Zellen).

Die Vermeidung der RCA-Bildung, die Risikominimierung durch E4-Deletion im Hinblick auf das onkogene Potential der Viren und die E3-Deletion, um Platz zu schaffen für große Transgene rechtfertigen trotzdem eine Deletion weiterer Genomanteile (148).

Nicht-replikationsfähige Adenoviren vom Typ 5 konnten in-vivo schon beweisen, dass ein effektiver Gentransfer bei Katzen möglich ist (76).

2.1.5 Nachweis von Adenoviren

Der Nachweis von Virus im Gewebe kann einerseits durch eine Immunfluoreszenz im Gewebeschnitt erfolgen. Weiterhin ist der Erreger vermehrbar in Zellkultur, sodass damit verbundene zytopathogene Effekte nachgewiesen werden können. Alle Mastadenoviren besitzen ein gemeinsames Antigen, das sie von den Aviadenoviren unterscheidet. Dies kann in der Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden. Viele Mastadenoviren besitzen auch eine zum Nachweis geeignete hämagglutinierende Aktivität und werden inzwischen auch mittels molekularbiologischer Methoden genotypisiert. Der Serotyp kann mittels ELISA festgestellt werden (99).

2.1.6 Streuung und Persistenz von Adenoviren in-vivo

Das Abwandern von viralen Vektoren vom gewählten Applikationsort in weiter entfernt liegende Organe ist in den meisten Fällen unerwünscht und kann bei Immuntherapien durch starke systemische Toxizität einiger Zytokine gefährlich sein. Besonders beunruhigend allerdings wird die unkontrollierte Transduktion von Zellen bei Therapien, in denen diese für Medikamente sensibilisiert werden sollen („drug-activating therapies“) (26). Hier erfolgt dann nach Medikamentengabe eine Zellzerstörung, die nicht lokal auf den gewünschten Bereich begrenzt bleibt, sondern Organe betrifft, in die stark gestreut wurde, was in erster Linie auf die Leber zutrifft.

Nach Injektion in den Muskel konnte in der Leber eine hohe Enzymaktivität des Transgens nachgewiesen werden, die ungefähr um den Faktor 100 unter der intramuskulären lag. Dies zeigt das Abschwemmen des Vektors über die Blutbahn und die Transduktion weiterer Gewebe (32). Die weitgehendste Streuung in alle getesteten Gewebe fand Kass-Eisler nach der Injektion in den Herzmuskel (123), diese Streuung ist dosisabhängig. Nach intratumoraler Injektion überwiegt die Streuung in die Leber und das den Tumor umgebende Fettgewebe. Auch Milz, Lunge und Niere weisen aber transfizierte Zellen auf. Nach 72 h ist die Aktivität des Markergens in der Leber ebenso hoch wie im injizierten Tumorgewebe. Die extratumorale Genexpression steigt von 1 % der gesamten im Körper des Individuums gemessenen Expression nach 24 h auf 50 % nach 72 h (229, 26, 256).

Nach Injektion in im Kopf- oder Nackenbereich sitzende solide Tumoren beim Menschen konnte nach 30 bis 90 min eine Vektorverteilung in der Blutbahn nachgewiesen werden. Bei Injektion hoher Vektordosen wurde hier auch eine Ausscheidung über Urin und Speichel beobachtet (218). Auch bei Katzen wurde einmal im Rahmen einer Gentherapie mit adeno-assoziierten Viren zum Transfer feline Erythropoetins die Bioverteilung des Vektorgenoms untersucht. Dabei wiesen Leber, Milz und zum Injektionsgebiet gehörende Lymphknoten deutliche Level auf (15). Im Rahmen der intratumoralen Adenovirusinjektion in subkutane Fibrosarkome bei der Maus verblieben zwischen 66 % und 99 % des viralen Vektors im Tumorgebiet, aber offensichtliche Expressionsanstiege erfolgten vor allem in der Leber, aber auch im Gastrointestinaltrakt, in der Niere und im Gehirn. Die Dosis lag hier bei 2×10^9 p.f.u. pro Tumor mit 0,8 cm Durchmesser (229).

Es zeigt sich aber die klare Abhängigkeit der Streuung vom gewählten Applikationsweg. Nach Durchführung der Therapie über die Atemwege konnten virale Anteile in keinem der untersuchten Organe (Gonaden, Milz, Leber, Niere, Muskulatur, Gehirn, Knochenmark und Herz) durch PCR entdeckt werden (29).

Durch vorhandene Antikörper oder eine vorhergehende Immunisierung gegen Adenoviren ist es möglich, die Streuung zu unterdrücken oder wenigstens zu vermindern. Abgeschwemmte Vektoren werden abgefangen und neutralisiert, sodass hierdurch sogar eine stärker begrenzte und zielgerichtete Therapie möglich wird und sich die Sicherheit viraler Gentherapie erhöht (32). Bei mit Adenoviren immunisierten Tieren verringerte sich die Zahl der in der Leber infizierten Zellen auf ein Tausendstel, auch Milz, Lunge und Niere waren deutlich weniger betroffen.

Eine nur lokale Verabreichung ist allerdings in keinem Fall möglich, mit einer gewissen systemischen Dissemination muss immer gerechnet werden. Selbst geringe Mengen Virusüberstand, die vorsichtig in große, subkutane Tumoren injiziert wurden, führten zur Detektion systemischer Abschwemmung (229, 26).

In manchen Fällen kann diese allerdings auch erwünscht sein. Mit dem Ziel, eine möglichst große Streuung in jegliche Muskulatur zu erreichen, um die Muskeldystrophie behandeln zu können, untersuchte Huard systematisch die Transduktionsraten vieler Gewebe nach Applikation einer viralen Suspension über verschiedene Wege: Sowohl intramuskuläre, intravenöse und intraarterielle Injektionen wie auch intraperitoneale, bukkale, gastrische und nasale Applikationsformen wurden verglichen. Besonders zeigte sich die Abhängigkeit der Streuung von der Durchblutung und der Aufnahmefähigkeit der Zielgewebe. Nach intramuskulärer Injektion verblieb der größte Teil des Vektors an Ort und Stelle, eine intravenöse Applikation zeigte hauptsächlich eine Transduktion von Hepatozyten. Nach nasaler Gentherapie fanden sich besonders viele transfizierte Zellen in der Lunge. Alle anderen Applikationsarten zeigten ein breites Spektrum transduzierter Gewebe über den Gesamtorganismus verteilt (105).

2.2 Antiadenovirale Immunantwort

Ein großes Hindernis für die Effizienz viraler (Langzeit-)Gentherapie ist die antivirale Immunantwort des Patienten. Hier sind spezifische und unspezifische humorale und zelluläre Mechanismen verantwortlich für das Auftreten einer Entzündungsreaktion und den Abbau von vektorhaltigen Zellen. Insbesondere die Mehrfachapplikation führt zu einer verstärkten Aktivierung der Mechanismen des Immunsystems (120, 18). Auch z. B. durch ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) inaktivierte Adenoviren rufen eine spezifische, zelluläre Immunantwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten hervor, da schon durch die Bindung und Internalisierung des Erregers eine Immunreaktion ausgelöst wird (118, 100).

Die Reaktion des Körpers auf Adenoviren erfolgt in drei sich überlappenden Phasen:

- Während der ersten Stunden nach einer Infektion bewirken adenovirale Proteine eine akute Antwort des Immunsystems des Wirtes mit der Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere IL 6 und IL 8, und der Rekrutierung einer unspezifischen zellulären Abwehr. Hierzu können auch basophile Granulozyten und Mastzellen gehören.
- Während der ersten vier Tage der Abwehr sind der wichtigste Angriffspunkt die von den Wirtszellen synthetisierten Virusproteine, die dem Zusammenbau der Erregerhülle dienen. Durch virale Faserproteine können zelluläre Endosomen zerstört werden. Die zugehörige Zelle stirbt, was als vektorassoziierte Toxizität betrachtet werden muss.
- In der Spätphase erkennt das Immunsystem adenovirale Peptide auf infizierten Zellen und zerstört diese durch spezifische zytotoxische T-Zellen oder NK-Zellen (Natural killer-Zellen). So kann es zu einer Hypertrophie und Fibrose des betroffenen Gewebes (meistens der Leber) kommen (59, 49, 120, 27).

Die zelluläre Abwehr der T-Zellen ist vermittelt sowohl durch zytotoxische Zellen als auch durch Helferzellen. Nach MHC-vermittelter (major histocompatibility complex) Erkennung viraler Antigene auf der Zelloberfläche infizierter Zellen wird über Perforin von CD 8⁺-T-Zellen (CD – cluster of differentiation) eine Zelllyse induziert, CD 4⁺-Lymphozyten führen zu einer spezifischen proliferativen Antwort und stimulieren gleichzeitig die Freisetzung von Immunglobulinen aus B-Zellen (69, 205). Für die Bekämpfung durch T-Lymphozyten ist die Erkennung von Kapsidkomponenten ausreichend, eine virale Gentranskription ist nicht erforderlich (174).

Die auf der humoralen Seite sezernierten Antikörper sind in erster Linie gegen Epitope des Kapsids (Fiber und Penton-Basenprotein) gerichtet, es entstehen aber auch hexonspezifische Immunglobuline. Die Quantität entstehender neutralisierender Antikörper ist nicht dosisabhängig (69, 90, 92, 205). Immunglobuline gegen jede der drei Komponenten des Virions tragen zur Neutralisation der Infektionsfähigkeit in-vitro und der Transduktionsfähigkeit in-vivo bei, auch wenn fiberspezifische Antikörper den größten Anteil ausmachen (199).

Viele Studien zur Virusimmunität basieren auf einem Gentransfer in Leber oder Lunge. Bei diesen Organen mit direkter Anbindung an den Blutkreislauf und evtl. mukosaler Oberfläche ist die Reaktion des Immunsystems jedoch selbstverständlich anders als bei einem soliden Tumor, der in vielen Fällen schlecht vaskularisiert und von der systemischen Blutgefäßversorgung abgegrenzt ist (26).

Wenn auch bei nicht-replikationsfähigen Adenoviren die Applikationsart stark die Antwort auf die Fragen beeinflusst, ob sich Antikörper bilden und ob diese eine Reapplikation stören, so ist bei vermehrungsfähigen Viren klar, dass der Anstieg der Immunglobuline offensichtlich stärker ausfällt und eine systemische Neuapplikation in ihrer therapeutischen Wirksamkeit beeinflussen kann (34) (siehe auch Kapitel 2.2.4 Einfluss verschiedener Applikationsarten).

Die Immunogenität der Viren kann aber auch von Vorteil sein, wenn eine limitierte Dauer der Genexpression gewünscht ist, auch um Langzeitnebenwirkungen zu vermeiden. Weiterhin ist der adjuvante Immunstimulus lokal und zum Zeitpunkt der Therapie günstig und vielleicht sogar nötig (siehe auch Kapitel 2.7.4 Immunstimulierende Tumorthherapie), wenn auch die langfristige antiadenovirale Immunität unerwünscht bleibt (191).

2.2.1 Lokale Entzündungsreaktion

Eine Adenovirusinfektion ruft am Ort des Geschehens eine komplexe Interaktion zwischen Zytokinen, chemoattraktiven Stoffen und einer veränderten Ausprägung von Zelladhäsionsmolekülen hervor. Diese Infektion entwickelt sich unterschiedlich je nach Replikationsfähigkeit und Immunogenität des verwendeten Serotyps und abhängig vom Ausmaß der Deletion viraler Proteine (194) und ist grundsätzlich erwünscht, kann aber nicht-tolerable Ausmaße annehmen. Diese lokal am Ort der Vektorapplikation hervorgerufene entzündliche Reaktion ist charakterisiert durch mononukleäre Entzündungszellen und eine perivaskuläre Lymphozy-

ten- und Histozyteninfiltration, wobei in der ersten Phase neutrophile Granulozyten und Makrophagen dominieren, während später die Invasion der Lymphozyten überwiegt. Diese steigert sich dosisabhängig. Hinzu kommt die Sekretion von IL 1, IL 6, IL 8 und TNF α (Tumornekrosefaktor) schon im ersten Moment des Vektorkontaktes. IL 6 wird in so großen Mengen produziert, dass es sich innerhalb des ersten Tages auch im Serum nachweisen lässt. Hier liegt keine Dosis-Wirkungs-Beziehung vor, eine 100fache Virusmenge z. B. führt nur zu einer 2,5fachen Steigerung in der IL 6-Produktion (73, 215, 29, 4, 72, 17, 18, 100).

Die Entzündungsintensität steigt innerhalb der ersten 72 h an und geht in den darauffolgenden zwei bis drei Tagen zurück. Mit mehrfacher Injektion fällt sie kontinuierlich geringer aus (218). Die Infiltration zytotoxischer T-Lymphozyten stellt die Hauptkomponente der Aufrechterhaltung der Entzündung dar (73).

Nach der systemischen Gabe von Adenoviren z. B. durch intravenöse Injektion entwickelt sich immer eine vektorinduzierte Leberdystrophie (siehe auch Kapitel 2.1.6 Streuung und Persistenz von Adenoviren in-vivo), die sich auch in ansteigenden Serumkonzentrationen der Transaminasen zeigt (35). Diese mit Nekrosen und Apoptosen einhergehende Hepatitis ist hauptsächlich der Infiltration durch neutrophile Granulozyten zuzuschreiben und zeigt dosisabhängige hepatozelluläre Schäden, die auch im Lichtmikroskop deutlich zu sehen sind (178, 210). Die vektorassoziierte Hepatitis entwickelt sich als Ergebnis der antigenspezifischen zellulären Immunantwort (247). Diese Reaktion zytotoxischer T-Lymphozyten richtet sich gegen in geringem Maße synthetisierte virale Antigene in transduziertem Gewebe (168), lässt sich aber auch durch inaktivierte Viren mit defekter Transkription auslösen. Sie ist also virusspezifisch, aber unabhängig von einer de novo-Synthese viraler Proteine oder Transgene.

Kapsidproteine werden durch antigenpräsentierende Zellen prozessiert, was über MHC II-Moleküle zur Aktivierung von B-Zellen und CD 4⁺-Lymphozyten führt, wohingegen normale Körperzellen die CD 8⁺-Lymphozyten über MHC I aktivieren. Diese unterschiedlichen Zelltypen üben gemeinsam die Zytotoxizität auf transduzierte Hepatozyten aus (118, 178, 210). Durch eine Deletion der Regionen E1, E3 und E4 konnte die Vektortoxizität reduziert werden, diese führte aber leider auch zu einer Verminderung der Transgenexpression (148, 35). Auch wenn IL 1 sehr früh in der vektorinduzierten Entzündungsreaktion als proinflammatorisches Zytokin auftritt, so kann doch eine Blockade des IL 1-Rezeptors keine Verbesserung im Sinne einer Abschwächung der inflammatorischen Situation bewirken (166). Eine Inhibition der Entzündungsreaktion mit einer verminderten adenoviral induzierten Zytotoxizität wurde bei transgenen Mäusen erzielt, die das adenovirale Protein E3-14,7K selektiv im

respiratorischen Epithel exprimieren. Gleichzeitig konnte die Reporterexpression verlängert werden (88). Eine Deletion des E3-Gens erhöht also die Lymphozyteninvasion, da die Funktion der Blockade der Antigenpräsentation durch Interaktion des von E3 kodierten Glykoproteins mit MHC I-Molekülen entfällt (43, 16). Eine erneute Einfügung der immunmodulierenden E3-Region in den Vektor vermindert die antivirale Abwehr des Patienten aus inflammatorischer, humoraler und zytotoxischer Sicht, schmälert die Toxizität und verbessert die Persistenz der Expression und die Erfolge einer Reapplikation (110, 191).

Die Frage, inwieweit die inflammatorische Abwehr die induzierte Genexpression negativ beeinflusst, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Die Immunreaktion ist abhängig von präexistierenden Antikörpern und der immunologischen Situation des injizierten Gewebes (siehe auch Kapitel 2.5.5 Reaktionen auf transduzierte Zellen). Thomas stellte nach zweiwöchiger Entzündung im Hirngewebe naiver Tiere keine Beeinflussung der Elimination der Transgenexpression fest, wohingegen z. B. Byrnes bei Individuen mit präexistierenden Antikörpern die Entwicklung einer chronischen Entzündung mit negativem Einfluss auf die Expression zeigen konnte (30, 224). Es wurden Versuche unternommen, durch den Einsatz von Glukokortikoiden die unspezifische Entzündung zu hemmen, um die Genexpression zu fördern. Otake konnte nach Einsatz von Dexamethason eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Parameter sowohl histologisch feststellen als auch in der Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine messen, die sich in einer erhöhten Transgenaktivität wieder spiegeln. Dieser Effekt ist nicht auf eine direkt expressionssteigernde Wirkung des Steroids zurückzuführen, sondern begründet sich über eine entzündungshemmende Wirkung besonders in der verminderten Makrophagen-Funktionsfähigkeit. Diese werden direkt in ihrer Aktivierung gehemmt und noch weitergehend durch eine Minderung der vom Körper selbst eingeleiteten IFN γ -Produktion im Entzündungskontext nicht fortschreitend gefördert (62, 38, 10, 182).

Eine lokale Entzündungsreaktion kann, insbesondere auf Schleimhäuten wie im Atmungs-trakt, natürlich auch eine lokale Immunität, z. B. durch Immunglobulin A (Ig A), hervorrufen (47).

2.2.2 Messbare Parameter der humoralen und zellulären Immunantwort

Die Zytokine, die zur Abwehr des Vektors vom Patienten gebildet werden, lassen sich durch Gewebeentnahmen vom Ort der Applikation oder in Serumproben bestimmen. Für eine vorhergehende Abschätzung, welche Zytokine in welchem Verhältnis gebildet werden, können auch isolierte PBMC (peripheral blood mononuclear cells) im Labor in Kontakt mit dem Erreger gebracht werden, und eine Reihenuntersuchung der induzierten inflammatorischen Reaktion gibt Aufschluss (100). Im ELISPOT (enzyme-linked immunospot) werden auf einer mit Anti-Zytokin-Antikörpern beschichteten Platte z. B. Lymphozyten durch Antigenkontakt zur Lymphokinproduktion angeregt, welches sich dann sofort auf der Platte bindet. Nach Zugabe eines zweiten markierten Antikörpers kann dieses detektiert werden, da sich farbige Flecken („spots“) zeigen, wo die enzymatische Farbreaktion der gekoppelten Antikörper stattfindet.

Im ELISA lassen sich Serumantikörper gegen jedes Antigen feststellen, mit dem sich eine ELISA-Platte coatet lässt: von Proteinen wie z. B. Zytokinen bis zu Erregern wie z. B. verschiedenen Serotypen von Viren. Durch Antikörper einer anderen Tierart gegen bestimmte Gruppen von Immunglobulinen der untersuchten Tierart wiederum lassen sich diese voneinander unterscheiden. So werden z. B. Ziegen mit felines Immunglobulinen vom Typ A, E, G oder M immunisiert, sodass diese dann im ELISA nachgewiesen und charakterisiert werden können.

In-vitro kann die Neutralisationskinetik beurteilt werden z. B. unter der Fragestellung, wie viele Antikörper bei bestimmten Bedingungen nötig sind, um ein Virus zu neutralisieren. Auch die Mechanismen, die zur Neutralisation führen sind relevant. Bei Adenoviren werden zwei Wege vermutet: Die gegen Fasern des Hexons gerichteten Antikörper führen zu einer extrazellulären Aggregation der Virionen und Anti-Penton-Antikörper verhindern das Entkommen des Virus aus Endosomen in das Zytoplasma im intrazellulären Bereich (245).

Rahman konnte zeigen, dass die Neutralisationskapazität antiadenoviraler Antikörper in-vitro der genaueste Parameter war um anzugeben, wie stark die Transduktion von Leberzellen nach intravenöser Virusinjektion gehemmt wurde (199). Dies lässt also den Rückschluss von gemessenen Werten auf den immunologischen Status des Individuums zu.

Bei gewonnenem Sekret von Schleimhäuten wie bei der broncho-alveolären Lavage ist auch der Nachweis von Ig A-Antikörpern und ihrer Neutralisationskapazität möglich (120).

2.2.3 Verlauf der antiadenoviralen Immunantwort

Sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort entwickeln eine eindeutige Aktivität nach dem Kontakt mit Adenoviren. Nach intramuskulärer Injektion wurde der höchste Level neutralisierender antiadenoviraler Antikörper nach 14 bis 21 Tagen erreicht (32). Gilgenkrantz beobachtete nach intraperitonealer Injektion schon nach sieben Tagen die maximale Inhibition der viralen Infektiosität im Neutralisationstest (72), wohingegen bei genterapeutisch behandelten Ratten schon nach drei Tagen sehr hohe Titer neutralisierender Immunglobuline nachgewiesen wurden (256). Bei der adenoviralen Genterapie der Katze liegen Erfahrungen vor, die ab Tag 7 antigenspezifische, neutralisierende Antikörper zeigen. Bis Tag 14 steigt der Titer kontinuierlich an und bleibt bis zum Ende der Studie nach einem Monat konstant (144). Untersuchungen aus dem Jahr 1966 an durch Aerosol mit Adenoviren vom Typ 4 infizierten Menschen zeigen ein Ansteigen des Titers erst ab Tag 35 (42), nach intradermaler Injektion wurde der Antikörperpeak nach drei Wochen detektiert (90).

Der maximale Titer antiadenoviraler Antikörper konnte bei Affen nach der fünften Applikation durch erneuten Vektorkontakt nicht mehr gesteigert werden (120). Bei Ratten, die fünf aufeinanderfolgende Injektionen des humanen Adenovirus vom Typ 5 im ersten Zyklus erhalten hatten, konnte bei den nächsten fünf Injektionen einen Monat später noch eine Vervielfachung des Titers ausgelöst werden. Die virusspezifische Proliferation der Lymphozyten nimmt mit wiederholter Adenovirusapplikation ab (243).

Der Antikörperanstieg kann unterschiedlich stark sein. Es wird nach intratumoraler Applikation von vierfachen, aber auch von 341fachen Anstiegen berichtet. Diese sind abhängig von der injizierten Dosis (218, 216).

In einem retrospektiven Resümee von Ergebnissen von 90 humanmedizinischen Patienten, die in den letzten zehn Jahren insgesamt 140 Dosen rekombinanter Adenoviren mit drei verschiedenen Transgenen auf sechs verschiedene Applikationsarten verteilt erhalten haben, konnten teilweise Angaben über Titer antiadenoviraler, neutralisierender Antikörper zusammengetragen werden. Daten zu der Entwicklung von Titern nach ein- oder mehrmaliger Applikation liegen vor allem für eine bronchiale Anwendung vor. Interessanterweise zeigten zwölf Menschen nach zwei- bis viermaliger Therapie keinen Anstieg der zirkulierenden, neutralisierenden Antikörper (ein Patient mit Abfall des Titers). Nur vier Individuen reagierten mit moderaten Anstiegen. Dies trifft sowohl für die Untersuchung der Serumproben vom

Zeitpunkt ca. einen Monat nach Vektorkontakt als auch für die erst über 200 Tage nach der Therapie untersuchten Patienten zu. Diese etwas unerwarteten Ergebnisse können durch den bronchialen Applikationsweg erklärt werden, der eher in einer starken lokalen Reaktion und Immunität resultiert, wie es auch Brody an Affen und Nagern gezeigt hat, die über einen Zeitraum von drei Wochen nach Kontakt der oberen Atemwege mit rekombinanten Adenoviren keine steigenden Spiegel neutralisierender Antikörper entwickelten (29, 91).

In einer Untersuchung an Rhesusaffen fielen die Antikörperspiegel in den acht auf die Genterapie folgenden Wochen deutlich ab, unterschritten aber nicht das Vierfache der Titer, die vor dem Erregerkontakt bestanden (254).

2.2.4 Einfluss verschiedener Applikationsarten

Abhängig vom Applikationsweg führen die Verteilung des viralen Vektors im Körper sowie die möglichen wirksamen Mechanismen des Immunsystems mit lokal unterschiedlicher Verteilung der dann vorhandenen Antikörper oder zellulären antiadenoviralen Komponenten zu klaren Unterschieden bei der primären antivectoriellen Abwehr und dem Verlauf der Immunreaktion nach der erneuten Applikation von Adenoviren. Nach intravenöser (11), intraperitonealer oder intratrachealer (247) Anwendung genauso wie nach Injektion in das Pankreas (164) entwickeln sich neutralisierende Antikörper in großem Ausmaß, die durch ihr systemisches Vorhandensein eine erneute adenovirale Genterapie blockieren (47). Nach intramuskulärer, intravenöser und intraperitonealer Injektion von nicht-replikationsfähigen Adenoviren mit Markergen im Mausmodell wurde die Induktion lysierender T-Zellen für alle Applikationswege gleichermaßen bewiesen (118). Andere Studien zeigen nach inhalativer Applikation nur die Aktivierung lokaler Immunmechanismen, es wurden keine zirkulierenden Antikörper nachgewiesen (47). Jedoch konnte nach intramuskulärer Injektion zwar ein Anstieg der neutralisierenden Antikörper beobachtet werden, der jedoch keinen Einfluss auf die Transgenexpression nach einer erneuten intramuskulären Applikation hatte. Hier ist trotz präexistierender Immunität eine wiederholte Therapie möglich. Interessanterweise wurde zwar die lokale Aktivität des Transgens nicht beeinflusst, die Transduktion von Zellen anderer Organe nach Abschwemmung aber (untersuchtes Organ: Leber) unterblieb vollständig. Zirkulierende Antikörper waren also für das Abfangen des Vektors verantwortlich (32).

Worgall zeigte, dass nach intravenöser Virusinjektion schon nach 24 Stunden 90 % des rekombinanten viralen Genoms eliminiert waren (246).

Nach intratumoraler Injektion bleibt die humorale Antwort deutlich geringer, was entweder auf die Abgeschirmtheit des Tumors nach außen und die relative Undurchlässigkeit der ihn umgebenden extrazellulären Matrix zurückzuführen ist oder aber auf die hinreichende Inhibition der Immunantwort durch den Tumor selbst (32). Die Bildung von reaktiven T-Lymphozyten gegen tumorales Antigen wird bei intratumoraler Injektion durch eine vorhandene systemische Immunität nicht unterdrückt. Die Transgenexpression bleibt erhalten, wird allerdings um den Faktor 2,4 vermindert (26). Auch nach intratumoraler Adenovirusapplikation beim Prostatakarzinom blieb der Antikörperanstieg bei den meisten menschlichen Patienten moderat und kletterte in den zwei Wochen nach Therapiebeginn nur um zwei Verdünnungsstufen nach oben. Eine wiederholte intratumorale Gentherapie war hier möglich und zeigte den klinisch relevanten Effekt des Abfalls des Tumormarkers (171). Die größte vergleichende Studie beim Menschen führte Harvey durch. Er verglich die Reaktionen des Immunsystems nach Aufsprühen auf die Atemschleimhaut, Injektion in Lebertumoren, intradermale und myokardiale Applikation. Während auch er im Atmungstrakt im biologischen Test auf der Suche nach neutralisierenden Immunglobulinen kaum Antikörperbildung feststellen konnte, wurde bei intratumoraler Injektion in der Leber eine starke humorale Abwehr in Gang gesetzt. Nach Vektorkontakt mit dem Organismus über die Haut oder den Herzmuskel waren die Ergebnisse von Patient zu Patient stark variabel (90).

Durch eine Verminderung der Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle kann die Virusmenge, die dem Immunsystem korrekt präsentiert wird, deutlich reduziert werden, die Abwehr mit der Bildung von Immunglobulinen wird dadurch stark verringert (110).

2.2.5 Präexistierende Immunität

Eine schon vor der gentherapeutischen Erstanwendung vorhandene Immunität gegen Adenoviren entstammt entweder einer natürlichen Infektion oder einer bereits vorausgegangenen iatrogenen Immunisierung. Ca. 50 % aller Menschen haben im Serum neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren vom Typ 5 (33). Dies bestätigte kürzlich Harvey in einer retrospektiven Studie, in der 40 von 83 untersuchten Patienten präexistierende, wenn auch geringe Spiegel antiadenoviraler Antikörper aufwiesen (91).

Bei Katzen wurden zwischen 15 % und 26 % der Tiere positiv auf antiadenovirale Antikörper getestet, die noch keinen iatrogenen Kontakt mit diesem gentherapeutischen Vektor hatten (siehe auch Kapitel 2.1.3 Adenoviren bei Katzen und anderen Felidae) (134, 135).

Es besteht eine Korrelation zwischen präexistierenden Immunglobulinen und dem Antikörperanstieg nach erneutem Adenoviruskontakt (Boostereffekt) sowie zwischen präexistierenden Immunglobulinen und der Transduktionseffizienz und auch der Transgenexpression (90).

Nach intraperitonealer Präimmunisierung mit Adenoviren zeigen Mäuse bei der nachfolgenden Gentherapie eine stark verkürzte und herabgesetzte Transgenexpression im Vergleich mit naiven Tieren. Dies scheint ein Beweis der Rolle der antivektorialen Abwehr bei der Frage nach der nur vorübergehenden Genexpression zu sein (72). Die Frage jedoch, ob eine präexistierende Immunität eine erneute effiziente Gentherapie verhindert, lässt sich nur abhängig von der gewählten Applikationsart sowohl bei Erstkontakt als auch bei wiederholter Therapie beantworten. Bramson induzierte durch intranasale Immunisierung eine hohe Zahl neutralisierender Antikörper bei Mäusen. Davon wurde die intratumorale, adenovirale Gentherapie aber keineswegs beeinflusst: Die Tumoren in der nicht-immunisierten Kontrollgruppe sprachen in gleicher Art und Weise auf die Zytokintherapie an (26). Ähnliches geht auch aus den Versuchen von Thomas hervor, der eine Applikation ins Gehirn unbeeinflusst davon sieht, ob eine humorale Antwort vorhergehend stattgefunden hat oder nicht, obwohl die Stärke der induzierten Entzündung davon abhängig ist, ob eine Präimmunisierung bestand. Die Transgenexpression ist in diesem Zusammenhang auf 56 % des Levels nicht-immunisierter Tiere reduziert, die Dauer der Expression bleibt stabil (225). Ein Vergleich der Effizienz bei der Tumorregression nach intravenöser Immunisierung und intratumoraler Therapie zeigt in der Versuchsreihe von Thomas massive Unterschiede von acht bis 29 % Erfolg nach Präimmunisierung im Vergleich zu 52 % Regression bei naiven Tieren. Ob diese unerklärlichen Unterschiede zur Studie von Bramson mit nasalem Erstkontakt mit dem Virus nur in der Art der Immunisierung begründet sind, bleibt unklar (216). Die systemisch verabreichten Viren allerdings werden durch zirkulierende, neutralisierende Antikörper sehr schnell und erfolgreich abgefangen und eliminiert. Es kann bei bestehender Präimmunisierung keine Transduktion von Hepatozyten bei Nagern festgestellt werden (199) (siehe auch Kapitel 2.1.6 Streuung und Persistenz von Adenoviren in-vivo).

2.2.6 Immunitätsdauer

Eine Reapplikation von Adenoviren zeigte sich bei immunkompetenten Mäusen 30 Tage nach der Erstbehandlung nicht wirksam, da zirkulierende, neutralisierende Antikörper den injizierten Erreger sofort einfangen. Chen beobachtete ein deutliches Abfallen der Titer neutralisierender antiadenoviraler Antikörper im Serum von Mäusen ab Tag 56 nach dem Erstkontakt (32). Doch selbst nach dem kontinuierlichen Abbau der Immunglobuline im Serum, wenn kein erneuter Antigenkontakt erfolgt, verbleiben natürlich die Gedächtniszellen. Eine erneute Virusapplikation wird also möglich, die Booster-Antwort führt aber zu einem noch höheren Ansteigen der Antikörpertiter und einer verstärkten Abwehr der T-Lymphozyten, sodass ein schnelles Entfernen des Virus aus dem Körper die Folge ist und der Effekt der Transgenexpression nicht ausreichend genutzt werden kann (49, 249, 108).

Diese theoretischen Überlegungen konnte Miles bei der intratumoralen, adenoviralen Genterapie des Prostatakarzinoms nicht bestätigen. Bei zehn von elf Patienten war der antiadenovirale Titer nach der Zweitbehandlung niedriger als nach der Erstbehandlung, und es konnte ein klinisch relevanter Effekt erzielt werden (siehe auch Kapitel 2.2.4 Einfluss verschiedener Applikationsarten) (171).

2.2.7 Strategien zur Beeinflussung der Immunantwort

Um die gegen den Vektor gerichtete Abwehr zu vermindern, ist grundsätzlich eine antiinflammatorische und/oder immunsupprimierende Behandlung möglich. Erwünscht wäre aber eine Strategie, die selektiv antiadenovirale Mechanismen hemmt als Voraussetzung für eine verlängerte Transgenexpression und für die Möglichkeit einer Mehrfachapplikation. Weiterhin kann der Vektor modifiziert werden, indem Epitope, die hauptsächlich bei der Viruserkennung eine Rolle spielen, entfernt oder maskiert werden. So kann das Eindringen in die Zelle z. B. auch durch das Penton-Basisprotein vermittelt werden, wenn die Fiber entfernt und so die Viruserkennung erschwert werden konnte (120, 205). Hierzu wurden auch „minimal vectors“ entwickelt, bei denen die gegen sie gerichtete zelluläre Immunantwort minimiert wird durch das Entfernen des viralen Genoms. Auch alle zytotoxischen Effekte, deren Ursache Virusproteine sind, werden so umgangen (200). Bei Pavianen konnte die Transgenexpression von einem Zeitraum von drei Monaten mit einem Vektor der ersten Generation

auf über ein Jahr gesteigert werden (175). Allerdings führt das Entfernen zusätzlicher Anteile des viralen Genoms nicht zwangsläufig zu einer verminderten Immunogenität, sondern kann auch zu ihrer Steigerung beitragen (siehe auch Kapitel 2.2.1 Lokale Entzündungsreaktion) (110).

Wenn die antivirale Immunantwort des Patienten umgangen oder verhindert werden kann, ist ein stabiles virales Genom in episomaler Form für Zeiträume über ein Jahr aufrechtzuerhalten und nachzuweisen (124).

Viele Ansätze wurden bei immunologisch naiven Tieren ausprobiert, was nicht der Realität bei Gentherapiepatienten in der Human- oder Tiermedizin entspricht. Einige Strategien befassen sich aber auch mit schon zu Beginn vorhandenen Antikörpern.

2.2.7.1 Medikamentöse Immunsuppression

Die Applikation eines gentragenden, adenoviralen Vektors an immunsupprimierte oder -defiziente Mäuse resultiert in einer über lange Zeiträume stabilen Genexpression und stark verminderten lokalen und systemischen antiadenoviralen Immunmechanismen (49, 53, 168). Dies führt zu der Frage nach einer möglichst gut verträglichen pharmakologischen Unterdrückung der unerwünschten Antwort.

Grimm konnte 1985 eine selektive Immunsuppression beobachten: Die Gabe von Cyclosporin wirkte sich auf die zytotoxischen T-Lymphozyten aus, während Hydrocortison nur die Aktivität durch IL 2 stimulierter lymphokin-aktivierter Killerzellen (LAK) hemmte (81). Eine Blockade der T-Lymphozyten-Proliferation durch Cyclosporin führt zumindest in den Geweben von Herz und Lunge zu einer ausdrücklich verlängerten Transgenexpression (123), und auch die zwingend entstehende Entzündungsreaktion, die von mononukleären Zellen beherrscht wird, wird signifikant unterdrückt (72). Nach kurzzeitig pharmakologisch reduzierter Abwehrreaktion, fällt auch die Langzeit-Immunantwort in bezug auf den adenoviralen Vektor signifikant geringer aus (17, 88). Jooss konnte bei Versuchen mit Mäusen durch die Gabe von Cyclophosphamid die Mobilisierung von CD 4⁺- und CD 8⁺-Zellen verhindern, die Transgenexpression verlängern und die Entzündungsreaktion vermindern. Bei hohen Dosen wurde sogar der Effekt auf die B-Zellen sichtbar: Es konnten keine neutralisierenden Antikörper vom Individuum gebildet werden (114).

Leider wird durch Glukokortikoide auch die RNA-Synthese und die Produktion bestimmter Zytokine beeinflusst. IL 2 und auch IFN γ entstehen in stark verringertem Maße. Dies ist neben den erwünschten Effekten der Entzündungshemmung und Immunsuppression die unerwünschte Nebenwirkung einer Modulation der Genexpression (5, 24, 172).

2.2.7.2 Toleranzinduktion

Durch eine Vorbehandlung mit adenoviral infizierten, antigenpräsentierenden Zellen, die Fas-Liganden exprimieren, kann eine spezifische T-Zell-Toleranz induziert werden. Im Gegensatz zu Kontrolltieren reagieren diese Mäuse nicht mit einer Proliferation von CD 3⁺-Zellen in der Milz als Antwort auf einen adenoviralen Gentransfer. So kann die T-Zell-vermittelte Immunantwort, die zur schnellen Elimination der benötigten Viren führt, unterdrückt werden (255).

Die Induktion oraler Toleranz führt zu einer peripheren Tolerierung externer und interner Antigene und kann bei allergischen Krankheiten oder anderen Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden. Schon 1911 fütterte Wells Hühner mit Proteinen, auf die sie bei einer späteren Injektion nicht wie die unbehandelten Vergleichstiere mit einer anaphylaktischen Reaktion reagierten. Auch Chase konnte 35 Jahre später Ähnliches bei Meerschweinchen beobachten, als er kontaktsensibilisierende Agenzien oral verabreichte und nachher eine offensichtlich verminderte Hautreaktivität im Bezug auf diese feststellen konnte (107, 238, 108). Der Einsatz bei rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus, Thyreoiditis oder multipler Sklerose ist beschrieben (239).

Diese Methode des Herunterregulierens der Abwehr über die orale Gabe des Antigens wird auch für die Langzeitgentherapie mit Adenoviren eingesetzt. Selbst vorherbestehende Immunität kann durch Füttern der aus dem Virus extrahierten Proteine überwunden werden. Um die Immunantwort bei adenoviraler Genterapie zu umgehen, wurden Ratten über drei Wochen mit Eiweißextrakten aus Adenoviren gefüttert. Die Kontrolltiere erhielten Serumalbumin vom Rind. Nach adenoviraler Genterapie blieb die Expression in der Kontrollgruppe transient, eine zweite Applikation zeigte keinen Erfolg. Die Tiere mit induzierter Toleranz jedoch zeigten über zwei Monate eine stabile therapeutische Wirkung, eine Zweitinjektion konnte mit gutem Ergebnis durchgeführt werden. Es konnten bei der Mehrzahl der Tiere keine, bei den anderen nur sehr geringe antiadenovirale Immunglobuline nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe zeigte jedes Individuum hohe Spiegel neutralisierender

Antikörper. Selbst bei präexistierender antiadenoviraler Immunität konnte Ilan zeigen, dass es möglich ist, die vorhandenen Antikörper zu vermindern und den Boostereffekt nach Injektion auszuschalten, wenn er zwischen zehn und 40 Tagen die antigenen Proteine oral verabreicht (111, 108).

Antigene, die Epithelzellen des Darmes oder intraepithelial gelegenen Lymphozyten präsentiert werden, führen durch Prozessierung und Absorption zu einer Umerziehung des Immunsystems. Sowohl eine passive Toleranz wird induziert, die zur Ignoranz des Antigens und zur klonalen Deletion entsprechender Lymphozyten führt, als auch ein dominanter Toleranztyp, der die Produktion von hemmenden Zellen beinhaltet. So werden sowohl die zelluläre als auch die humorale Schiene des Immunsystems beeinflusst. Induzierte Suppressor-Lymphozyten bewirken einen Wechsel von proinflammatorischen T_H1 -Zellen (T-Helfer-Zellen Typ 1) zu anti-inflammatorischen T_H2 -Zellen. Durch Vermittlung von T-Lymphozyten wird die Antwort gegen das potentielle Antigen unterdrückt. Die dieses Antigen erkennenden Effektorzellen werden anergisch. So dient das gut entwickelte Netzwerk des GALT (gut-associated lymphoid tissue) als Mittler der Antigenpräsentation und -prozessierung und schult somit regulatorische Zellen des immunologischen Toleranzgedächtnisses in der Milz und den zugehörigen Lymphorganen durch immunologische Paralyse, um vor überschießenden, immunologischen Reaktionen auf Fremdproteine im Verdauungstrakt zu schützen. Diese induzierte zelluläre Toleranz trifft vor allem auf die T-Zell-Reaktion zu, B-Zellen werden deutlich weniger beeinflusst. In manchen Studien zeigen sich sogar erhöhte Immunglobulintiter.

Bei gewebeorientierten Abstoßungsreaktionen muss nicht unbedingt das auslösende Antigen oral verabreicht werden, auch ein Zielorgan-zugehöriges Fremdanigen kann ausreichend sein („bystander suppression“) (236, 67, 107, 238, 108). Die orale Gabe eines Antigens beinhaltet aber immer auch die Gefahr der Ausbildung einer epitopspezifischen Immunität und somit des Gegenteils des erwünschten Ziels (22).

2.2.7.3 Toleranz bei Neugeborenen

Obwohl Immuntoleranz normalerweise bereits während der Embryogenese entsteht, kann sie zumindest bei Mäusen auch noch unmittelbar nach der Geburt induziert werden, wobei das murine Immunsystem im Vergleich zu dem des Menschen zu diesem Zeitpunkt noch unreifer ist (236).

Die durch Prozesse des Immunsystems zeitlich limitierte Transgenexpression kann bei der Behandlung Neugeborener nicht beobachtet werden (123). Nach intravenöser Gabe rekombinanter Adenoviren an Neonaten konnte die Transgenexpression auch 12 Monate später noch nachgewiesen werden (220). Diese scheinen das Virus als Vektor und auch die produzierten viralen Produkte nicht als Fremdantigene zu erkennen, da ihr Immunsystem noch nicht die nötige Reife besitzt. Sie bilden keine neutralisierenden Antikörper aus, bei ihnen führt die Antigenpräsentation im Thymus zu einer klonalen Deletion und nachfolgender Tolerierung. Deshalb führt auch eine Behandlung neugeborener Ratten mit Adenoviren zu einer Toleranz gegenüber eben diesem Virus in deren späterem Leben. Die Expression eines hierdurch transportierten Gens ist um ein Zehnfaches höher als bei Ratten, die keine Toleranzentwicklung im frühen Lebensstadium erlebt haben, und lässt sich auch über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten. Eine Exposition vor Ausreifung des Immunsystems zur Toleranzinduktion ist auch über Gewebegrenzen hinweg erfolgreich: Eine intraperitoneale Präsentation führt später auch zu einer Toleranz nach myokardialer Applikation (124). Ebenso zeigte die Injektion adenoviral infizierter Pankreasläppchen in den Thymus von Mäusen den Erfolg des Umgehens der antiviralen Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten und die verlängerte Transgenexpression bei nachfolgender intravenöser Vektorapplizierung (53, 109). Auch wenn Gilgenkrantz nach Injektion von Adenoviren in den Thymus sowohl gegen den Vektor als auch gegen das Transgen gerichtete Antikörper bei Neonaten nachweisen konnte, so beeinflussten diese wiederum nicht die Dauer der Genexpression (72).

Außerdem gibt es immunologisch abgeschirmte Bereiche wie z. B. die vordere Augenkammer. Nach subretinaler Injektion bleibt die Antikörperproduktion im Vergleich mit der subkutanen Applikation minimal. Der privilegierte Immunstatus dieses Bereiches lässt eine effektive Wiederholung der Adenovirusinjektion zu (20).

2.2.7.4 Serotypswitch

Die humorale antiadenovirale Antwort bleibt serotypspezifisch (150). In der Untersuchung von Wildtyp-Adenoviren vom Typ 4 (Untergruppe E), Typ 5 (Untergruppe C) und Typ 30 (Untergruppe D) konnten keine serotypübergreifenden Kreuzreaktionen festgestellt werden (154). Auch Kass-Eisler bewies für die Serotypen Ad 4, Ad 5 und Ad 7 ihre Unabhängigkeit in der humoralen Immunantwort (124). Durch Nutzung von Vektoren der gleichen Untergruppe (C), aber von unterschiedlichen Serotypen (Ad 2 und Ad 5) konnte Mack die Genexpression nach dem zweiten Viruskontakt von unter 30 % bei gleichem Serotyp auf die ursprüngliche Quantität bei verändertem Serotyp erhöhen, wenn auch die Dauer der nachweisbaren Expression vermindert blieb. Dies wiederum ist wahrscheinlich bedingt durch die gegen das Transgen gerichteten Antikörper und zytotoxischen T-Lymphozyten, da bei zusätzlicher Veränderung auch des transportierten Gens die Expressionsdauer konstant bleibt (150). Die sich nach dem Kontakt mit Viren vom Serotyp 5 bildenden Antikörper konnten auch beim Pavian keine Neutralisierung von Adenoviren vom Typ 2 hervorrufen (175).

Auch der weitergehende Einsatz von „helper-dependent“ Adenoviren, die keine proteinkodierenden Sequenzen enthalten, ist im Rahmen des Serotypenwechsels möglich (188). Das Vorhandensein viraler Anteile des Genoms ebenso wie das Transgen und der Promoter spielen eine nicht vollständig geklärte Rolle bei der immunogenen oder tolerogenen Reaktion des Immunsystems (124).

Ein Serotypswitch bei der wiederholten adenoviralen Therapie ist also möglich, bedeutet aber durch die Herstellung mehrerer Vektoren mit dem gleichen Transgen hohe Kosten und einen großen Planungsaufwand.

2.2.7.5 Einsatz speziesfremder Adenoviren

Zwischen menschlichen Adenoviren und denen von Affen wurden Kreuzreaktionen beschrieben (244), aber Antikörper von Kaninchen oder Maus gegen humane Adenoviren vom Typ 5 oder bovine oder porcine Viren vom Typ 3 erkennen spezifisch und nicht speziesübergreifend nur einen einzigen Virustyp. So können alternierend auch Vektoren aus dem Spektrum anderer Arten zur Überlistung der Immunantwort eingesetzt werden (173).

Um eine größere Sicherheit beim Einsatz von Adenoviren zu erreichen, indem Koreplikation und Rekombination von Viren beim Wirt ausgeschlossen werden, wurden in-vitro canine und bovine Vektoren sowie Adenoviren der Ente auf menschlichen Zellen getestet. Die besten Erfolge wurden mit dem bovinen Virus (BAV 3) erzielt. Die Infektion humaner Zelllinien ohne Vermehrung und Zytotoxizität ist gegeben. Durch einen Einsatz speziesfremder Viren werden wie beim Serotypswitch keine kreuzreagierenden Antikörper gebildet. Außerdem bleibt die Expression viraler Gene vermindert, die zelluläre Immunantwort fällt geringer aus (200). So kann das große Problem der vorhandenen oder durch Erstapplikation induzierten Immunität, bei der humorale Mechanismen die Reapplikation sowie zelluläre die Dauer der Genexpression beeinträchtigen, umgangen werden.

2.2.7.6 Blockade bestimmter Zellpopulationen

Über eine vorübergehende teilweise Blockade des Immunsystems durch Ablation der Funktion der CD 4⁺-Zellen kann die Bildung antiadenoviraler neutralisierender Antikörper unterdrückt werden (247), und auch die zelluläre Abwehr wird bei erneuter Stimulation in vermindertem Maße aktiviert. Die Genexpression bei erneuter Applikation wurde nach Injektion in das Pankreas von 5 % in der Kontrollgruppe auf 40 % gesteigert (164), was allerdings im Vergleich mit im Bezug auf die Adenoviren immunologisch naiven Tieren trotzdem eine starke Minderung bedeutet. Neben der Entfernung der CD 4⁺-Zellen gibt es auch die Möglichkeit der blockierenden Anti-CD 4-Antikörper mit Auswirkungen auf die Infiltration von CD 4⁺- und CD 8⁺-Zellen in das behandelte Gewebe. Dies hatte jedoch in Tierversuchen von Guerette wenig Erfolg in der Unterdrückung der humoralen Antwort, welche aber mit einer Kombination aus Anti-CD 4-, Anti-CD 8- und Anti-CD 11a-Antikörpern effizient erreicht wurde. Diese Assoziation monoklonaler Antikörper als immunsuppressive Zusatztherapie erlaubte eine stabile Langzeitgenexpression (82, 137). Christ jedoch erreichte mit Anti-CD 4-Antikörpern alleine eine drei Wochen anhaltende Inhibition dieser Zellpopulation mit vollständiger Verhinderung der Ausprägung antiadenoviraler Immunglobuline, was mit Cyclosporin oder Dexamethason nicht möglich war. Auch die Blockade des CD 40-Liganden vermindert deutlich die Produktion neutralisierender Antikörper, weil die Interaktion mit CD 40 entscheidend für die Induktion der zellulären und humoralen Antwort auf adenovirale Antigene ist (251, 36).

SCHRIFTTUM

Es gibt außerdem den Ansatz, präimmunisiertes Serum über eine mit Virusbestandteilen beschichtete Säule laufen zu lassen, um die Immunglobuline festzuhalten und zu entfernen. Die Präsenz neutralisierender Antikörper kann unter das Detektionslimit gesenkt werden. Auf diese Art und Weise kann die Effizienz der Zelltransduktion bei systemischer (intravenöser) Applikation wieder auf den Level von Patienten ohne präexistierende Immunität gebracht werden (199).

2.3 Interleukin 2 (IL 2)

2.3.1 Eigenschaften und Wirkungen

Im komplexen Netzwerk interzellulärer Signalmoleküle, das im Rahmen einer immunologischen Stimulation genutzt wird, spielen verschiedene Interleukine eine tragende Rolle (94). Interleukin 2 ist ein Protein von einer Größe von 15.000 Dalton, das über spezifische Rezeptoren in autokriner oder parakriner Weise auf verschiedene hämatopoetische Zellen wirken kann. Es wird von aktivierten T-Lymphozyten freigesetzt und erfüllt Immunsystem-modulierende Aufgaben. Es kommt zur Proliferation weiterer T- und auch B-Lymphozyten sowie zu einer verstärkten Zytotoxizität von NK-Zellen und Monozyten. Das geschaffene Mikromilieu an Orten der Behandlung mit rekombinantem IL 2 begünstigt die Zusammenarbeit von Makrophagen und aktivierten T-Zellen. Seine Fähigkeit, die antineoplastische Wirkung von interleukinabhängigen Lymphozyten und LAK-Zellen zu verstärken, wurde schon in den achtziger Jahren in der Onkologie erkannt und genutzt (147, 232, 85). Aktivierte Zellen erhalten die Möglichkeit, autologe Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Die direkte, zellvermittelte Lyse maligner Zellen basiert auf der Aktion von NK- und CTL-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten). Allerdings ist die Wirksamkeit unter anderem stark abhängig vom benutzten Tumormodell. Dranoff konnte mit IL 2-transduzierten, bestrahlten Melanomzellen keine Erfolge erzielen, wohingegen der Transfer von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) zum erwünschten Ergebnis führte. Beim Mammakarzinom wiederum zeigte sich die IL 2-Vakzine erfolgreich, GM-CSF blieb ergebnislos. Diese Unterschiede beruhen auf dem unterschiedlichen Milieu und Zytokinprofil, das im Tumor zu finden ist (siehe auch Kapitel 2.6.2 Das Tumormilieu), und auf der Immunogenität der jeweiligen malignen Zellen (56, 94, 190).

IL 2 ist ein Zytokin meist parakriner Natur, weshalb die lokale IL 2-Produktion auch unabhängig von der Frage der Toxizität der systemischen Applikation bei weitem vorzuziehen ist (187). Bei den T-Helfer-Zellen ist unstrittig, dass zumindest die Subpopulation T_H1 im Sinne einer autokrinen Schleife ihr eigenes IL 2 herstellt. Dieses muss aber von den produzierenden Zellen erst abgegeben werden, um sich dann anschließend von außen wieder an die IL 2-Rezeptoren der Zellen binden zu können. Die T_H2 -Subpopulation benutzt entweder IL 2 von T_H1 -Zellen oder IL 4 als Wachstumsfaktor, wobei die Unterteilung in diese beiden T-Helfer-Subpopulationen wahrscheinlich erst ein nach der Aktivierung auftretendes Ereignis ist.

Zunächst können alle CD 4⁺-Lymphozyten IL 2 produzieren. Auch einige CD 8⁺-Zellen können zumindest kurz nach ihrer Aktivierung eigenes IL 2 sezernieren. Im Allgemeinen hängt jedoch die weitere Proliferation zytotoxischer T-Lymphozyten von aus T_H1-Zellen stammendem IL 2 ab (236). Im Normalzustand ohne immunologischen Stimulus tragen weniger als 15 % der zirkulierenden Zellen des Immunsystems einen Interleukinrezeptor. Durch das Vorhandensein von rekombinantem IL 2 kann die Anzahl von Lymphozyten, die einen IL 2-Rezeptor ausbilden, um das vier- bis 15fache gesteigert werden (71, 94).

Nach systemischer IL 2-Stimulation treten signifikante Änderungen nicht nur in der Anzahl und dem Phänotyp zirkulierender PBLs (peripheral blood lymphocytes) auf, auch die zytotoxische Leistung steigt nach endogener Aktivierung (132). Auch wenn NK-Zellen und NK-ähnliche zytotoxische T-Lymphozyten unter IL 2-Einfluss zu lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) mit zytotoxischen Eigenschaften werden (193, 228) und dies als Hauptmechanismus der antitumoralen Aktivität vermutet wird, so gibt es doch keine Korrelation zwischen der Bildung von LAK-Zellen und der Tumorregression (50). Jedoch haben LAK-Zellen die Fähigkeit gewonnen, ein breites Spektrum transformierter Zellen zu lysieren, die wie autologe Tumorzellen vorher resistent waren gegen Angriffe unveränderter NK-Zellen (80).

IL 2 wird nicht nur in der Malignombehandlung eingesetzt, auch die verbesserten Überlebenschancen und die reduzierte Hirnzystenanzahl bei Infektionen wie der mit *Toxoplasma gondii* bei Mäusen zeigen die Potenz des Zytokins. Bei jungen Katzen wurde zwischen dem dritten und achten Lebensmonat die Fähigkeit zur IL 2-Produktion untersucht ebenso wie der Anstieg mitogeninduzierter Lymphozytenproliferation. Diese beiden korrelieren mit der stark verbesserten Abwehr des Immunsystems bei Infektionen, in diesem Fall der experimentellen Herausforderung einer Toxoplasmenerkrankung oder dem Kontakt mit dem feline Leukosevirus. Trotz der Fähigkeit, schon im Alter von wenigen Wochen humorale und zelluläre Mechanismen zu aktivieren, fehlt es dem Immunsystem dennoch an Reife. Als Beispiel und messbarer Parameter kann die Fähigkeit zur IL 2-Sekretion dienen, die sich ab dem sechsten Lebensmonat eindeutig verbessert (143).

2.3.2 Einheiten, Dosis und Pharmakokinetik

Die Einheiten, in denen IL 2 verwendet wird, sind bis jetzt nicht standardisiert. Das erste rekombinante, humane IL 2 von Hoffmann-LaRoche wurde in „Biologic Response Modifiers Program (BRMP) units“ gemessen. Daneben existiert die Einheit „Cetus unit“, benannt nach der herstellenden Firma, die in der biologischen Wirksamkeit zwei BRMP-Einheiten entspricht. Bei Proleukin®, das zur Zeit von der Firma Chiron auf dem Markt ist, wird in „international units“ (IU) gerechnet, wobei drei IU in etwa einer BRMP-Einheit entsprechen (94).

Es ist unmöglich, eine allgemeingültige, optimal immunmodulierende Dosis (OID) anzugeben. Die vom Individuum tolerierte Dosis ist stark abhängig von verschiedenen Faktoren. Die Bandbreite lokaler und systemischer positiver Wirkungen und negativer, toxischer Nebenwirkungen ist groß, die Toleranzgrenzen bei unterschiedlichen Spezies oder auch unterschiedlichen Individuen einer Spezies ebenfalls. Wichtig ist ebenso die Art der lokalen oder systemischen Applikation.

Beim Menschen z. B. ist die maximal tolerierte Dosis pro Tag und m^2 Körperoberfläche um den Faktor drei höher bei einer intravenösen Bolusinjektion als bei einer ganztägigen Dauertropfinfusion (132). Bis zu einer Dosis von 10^4 Einheiten (IU) pro m^2 Körperoberfläche konnten keine Nebenwirkungen bei intramuskulärer, subkutaner und auch intravenöser Verabreichung beobachtet werden, Dosen von 10^7 Einheiten pro m^2 Körperoberfläche konnten nur einmalig verabreicht werden, eine Dauertherapie ist in der Konzentration nicht möglich (232). Durch die Induktion von IL 1 aus Monozyten ist eine indirekte erhöhte körpereigene IL 2-Produktion nach der Gabe von humanem rekombinantes IL 2 möglich (64).

Die optimale Dosis bei Mäusen, um den besten tumorprotektiven Effekt zu erreichen mit der Ausbildung einer Langzeitimmunität lag in Versuchen mit genetisch veränderten, zytokinsezernierenden Tumorzellen bei 100 ng oder 400 ng IL 2 je nach gewähltem Tumormodell. Nicht nur zu geringe Dosen zeigten keinen Effekt, auch deutlich höhere Dosen konnten keine Verbesserungen auslösen. Dieselbe Versuchsreihe zeigte in der Kombination von IL 2 mit IFN γ eine Optimaldosis des Interleukins zwischen 100 ng und 200 ng (130). In ähnlichen Versuchen konnte Schmidt sogar eine Verringerung der Schutzwirkung von Tumorstoffen bei zu hoher IL 2-Produktion zeigen (208).

Die Transgenexpression ist proportional zu der applizierten Virusmenge (58). Bei der inhalativen IL 2-Liposomen-Applikation konnte Khanna jedoch in Hunden nachweisen, dass die niedrigere Dosis von zweimal täglich $0,5 \times 10^6$ BRMP units IL 2-Liposomen signifikant stärker auf die Aktivierung der Effektorzellen wirkte als die doppelte Dosis bei nur einmal täglicher Applikation (128).

Nach intravenöser IL 2-Injektion beim Menschen ist dieses nur für 6,9 min weiterhin im Plasma nachweisbar, dann befindet es sich vollständig verteilt im extravaskulären Raum (147), wo seine Halbwertszeit aber bei auch nur 85 min liegt, unabhängig von der applizierten Dosis. Zwischen intramuskulärer und subkutaner Injektion gibt es keine Unterschiede in den vorliegenden pharmakokinetischen Daten, der Serumpeak liegt allerdings 10 bis 100fach unter dem nach intravenöser Bolusinjektion. Nach zwei bis sechs Stunden ist die Serumkonzentration nach subkutaner Applikation am höchsten, der Metabolismus sowie die Ausscheidung rekombinanten Interleukins erfolgen vollständig über die Nieren (113).

2.3.3 Speziesspezifität

Humanes rekombinantes IL 2 löst in-vitro speziessübergreifend eine Proliferation der Lymphozyten aus, ohne dass ein Antigen vorhanden ist. Bei Pferden, Ziegen, Schafen, Hunden und Katzen wurde in-vitro die Wirkung und auch die Dosisabhängigkeit bewiesen, wobei die gleiche Dosis humanen IL 2 ausreicht, um Katzenlymphozyten zu stimulieren wie bei der optimalen Stimulierung menschlicher PBMC. Interessanterweise besteht diese Wirkung über Tierartgrenzen hinweg nur in eine Richtung: Menschliche Lymphozyten lassen sich ausschließlich von humanem oder vom Gibbonaffen stammendem IL 2 stimulieren, andere xenogene Interleukine verfehlen ihre Wirkung (64, 77).

Cozzi beschreibt bei der Klonierung von felinem IL 2 und der Synthetisierung des rekombinanten, bioaktiven Proteins eine Struktur aus 154 Aminosäuren, die eine Homologie von 81 % verglichen mit humanem IL 2 besitzt (45). Nach Quintin-Colonna sind es nur 77 % Sequenzhomologie zwischen der Katze und dem Menschen (198). Abbildung 2 zeigt die große Homologie besonders zwischen humanem und felinem IL 2 im Vergleich mit den Sequenzen des caninen und murinen Proteins. Beachtet werden muss neben der Abfolge von Aminosäuren allerdings auch die dreidimensionale Struktur mit ihren hydrophoben und

SCHRIFTTUM

ren allerdings auch die dreidimensionale Struktur mit ihren hydrophoben und hydrophilen Abschnitten.

Helfand wies 1994 die Induktion lymphokin-aktivierter Killerzellen in einer Kultur caniner Lymphozyten durch humanes IL 2 nach und konnte auch die erhöhte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zeigen (97). Bei mehreren klinischen Versuchsreihen an Hunden wurde intravenös, subkutan oder per inhalationem humanes rekombinantes IL 2 erfolgreich verwendet (95).

Maus	MYSMQLASCVTLTLVLLVNSAP	TSSSTSSTAE	AAAAAAAAAAAAAAAA	QQLI
Hund	MYKMQLLSCIALTLVLVANSAP	ITSSSTKETE	QQMEQLLLLDL	QLLLNGVN
Mensch	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAP	TSSSTKKTQL	LEHLLLDL	QMILNGIN
Katze	MYKIQLLSCIALTLILVTNSAP	ASSSTKET	QQLEQLLLDL	RLLLLNGVN
	MDLQELLSRMENYR	NLKLPRMLTFK	FYLPKQATEL	KDLQCLEDELG
		PLRHLVLDL	TQSKSF	
	HLENYE	NPQLSRMLTFK	FYTPKKATEF	THLQCLAEEL
		KNLEEV	LGLPQSKNV	
		NYK	NPKLTRMLTFK	FYMPKKATEL
			KHLQCLEEEL	KPLEEVLN
			LAQSKNF	
		NPE	NPKLSRMLTFK	FYVPKKATEL
			THLQCLVEEL	KPLEEVL
			LYLAQSKNF	
QL	EDA	EN	FISN	IRVTVVKLKGS
				DNTFECQFDDES
				ATVVDFLRRW
				IAFCQSIISTSPQ
HL	TDT	KE	LISN	MNVTLKLGSET
				SYNCEYDDE
				TATITEFLNK
				WITFCQSIFSTLT
HL	RP	RD	LISN	INVIVLELKGSET
				TFMCEYADE
				TATIVEFLNR
				WITFCQSIISTLT
HL	NHI	KE	LMSN	INVTVLKLGSET
				TRFTCN
				YDDE
				TATIVEFLNK
				WITFCQSIFSTLT

Abbildung 2: IL 2-Sequenz im Vergleich verschiedener Spezies

Die einzelnen Buchstaben kodieren jeweils eine Aminosäure (A - Alanin, C - Cystein, D - Asparaginsäure, E - Glutaminsäure, F - Phenylalanin, G - Glycin, H - Histidin, I - Isoleucin, K - Lysin, L - Leucin, M - Methionin, N - Asparagin, P - Prolin, Q - Glutamin, R - Arginin, S - Serin, T - Threonin, V - Valin, W - Tryptophan, Y - Tyrosin)

Leucin ist als hydrophobe Aminosäure von ganz besonderer Bedeutung für die dreidimensionale Helixanordnung und wurde deshalb zum Vergleich der Spezies schwarz hervorgehoben. Die Sequenzen sind durch Verschiebungen so in der Abbildung angeordnet, dass Homologien gleich ins Auge fallen.

Die Sequenzen stammen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.3.4 Einfluss verschiedener Applikationsarten

Die Art des Zuführens von IL 2 direkt als rekombinantes Protein, durch sezernierende Zellen oder per viralem Vektor ebenso wie die Frage, ob eine lokale oder systemische Applikation vorgezogen wird, ist entscheidend für die Auswirkungen. Bei Katzen mit Fibrosarkomen konnte der Erfolg einer verlängerten rezidivfreien Zeit nicht durch lokale postoperative Gabe des rekombinanten humanen Proteins erreicht werden. Und auch die Injektion unveränderter Verozellen führte zu keiner Verbesserung. IL 2-sezernierende Verozellen allerdings führten durch die Kombination der zytokin-induzierten Immunstimulation mit der lokalen Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle zum erwünschten Ergebnis (198), was außerdem auf das für einen längeren Zeitraum sezernierte IL 2 statt des schnell die Wirkung verlierenden rekombinanten IL 2 zurückzuführen sein kann.

Die größtmögliche antitumorale Wirkung kann sich nur über IL 2-sezernierende, tumorinfiltrierende Lymphozyten oder über selbst zytokinsezernierende Tumorzellen entfalten. Da Lymphozyten oft gewebespezifisch sind und nach der Entnahme bei Reapplikation wieder in ihr Ursprungsgewebe zurückkehren, wurde dieser Ansatz auch für tumorinfiltrierende Lymphozyten untersucht. Diese werden in-vitro mit IL 2 transfiziert, dessen Expression lokal wirksam werden soll. Die Ergebnisse bleiben allerdings unklar, die Wirkmechanismen konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden (50, 138).

Die systemische Toxizität von Zytokinen, im Besonderen von IL 2, kann mit einer auf den Tumor begrenzten Expression mit nur geringer Abschwemmung in den Blutkreislauf weitgehend umgangen werden.

2.3.5 Entzündlicher Kontext

Bei entzündlichen Zuständen ist im Gewebe neben vielen anderen pro- und antiinflammatorisch wirkenden Komponenten auch das Prostaglandin E₂ (PG E₂) vorhanden. Dieses blockiert die Aktivierung von LAK-Zellen durch IL 2. Dieser Zusammenhang führt zu der Überlegung, durch eine Blockade der PG E₂-Produktion eine Verbesserung der Interleukinwirkung zu erzielen. Dies ist Khoo mit dem Zyklooxygenasehemmer (COX-Hemmer) Ibuprofen auch gelungen. Er erreichte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und der Streuung durch eine verbesserte IL 2-Wirkung (129). Ebenso hemmt die Produktion von

GM-CSF durch die Induktion von GM-Suppressorzellen die Ansprechbarkeit von T-Zellen auf IL 2. Dagegen kann mittels einer Kombination von IFN γ und TNF α durch die Verminderung der GM-Suppressorzellpräsenz eine bessere Wirkung von IL 2 erzielt werden (185).

TNF α wiederum wird zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt, die zur Toxizität von IL 2 entscheidend beitragen. Es hat eine pyrogene Wirkung und trägt in hohen Konzentrationen zum septischen Schock bei. In der Hinsicht gibt es den Ansatz, die TNF-Synthese der Monozyten durch die niedrigdosierte Gabe von Dexamethason zu unterdrücken, um selektiv Nebenwirkungen der Interleukintherapie auszuschalten ohne die Generierung zytotoxischer Zellen durch IL 2 zu hemmen. Im Gegenteil wird sogar eine höhere IL 2-Dosierung tolerabel, sodass der antineoplastische Effekt sogar verstärkt werden kann (169).

Durch komplexe Wechselwirkungen der verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Zytokine ergeben sich je nach Zeitpunkt, Fortschreiten der entzündlichen Reaktion und medikamentösem Gegensteuern immer neue Konstellationen, die fördernd oder hemmend auf die körpereigene Interleukinproduktion und die Transgenexpression genauso wie auf die Nebenwirkungen und die Toxizität Einfluss haben.

2.3.6 Zytokinkinetik bei der adenoviralen Gentherapie

Selbst innerhalb derselben Spezies ist die Dauer der Transgenexpression in weitem Rahmen abhängig von individuellen Faktoren. Barr fand in unterschiedlichen Mäusestämmen mit gleichen immunologischen Voraussetzungen Variationen zwischen drei Wochen und drei Monaten der Expression (11). Nach intratumoraler Applikation eines Interleukin-Gen-transportierenden adenoviralen Vektors wurde über neun Tage ein erhöhter Zytokinlevel an der Injektionsstelle nachgewiesen. Das Maximum der lokalen Expression wurde zwischen 24 und 72 h post injectionem gemessen, der Serumpeak trat nach 24 h auf und fiel sofort wieder ab. Serumwerte und lokale Zytokinkonzentrationen korrelieren also nicht über den gesamten Zeitraum, was unter anderem auf einen angiostatischen Effekt induzierter Zytokine mit Gefäßalterationen zurückzuführen sein kann, der ein Abschwemmen ins Serum minimiert (25).

Möglicherweise ist ein kurzzeitiger Interleukinpeak sogar wirksamer als eine langanhaltende Expression auf niedrigem Level. Das zeigen in-vivo-Versuche an Mäusen, bei denen die Präsenz der modifizierten und sezernierenden Zellen über einen Zeitraum von weniger als 48 h ausreichte, um eine systemische Antitumorreaktion auszulösen (149).

Urba wiederum sieht den Schlüssel zum Erfolg bei der Interleukinbehandlung in der chronischen Gabe niedriger Dosen IL 2. Durch die extreme Abhängigkeit IL 2-aktivierter Zellen von diesem Stimulus, stellt schon eine vierstündige Abwesenheit in-vitro und in-vivo eine zu große Unterbrechung dar, die zum Verlust der zytotoxischen Aktivität führt. Hier ist eine kontinuierliche Präsenz gefordert. Durch wiederholte intramuskuläre Injektion des rekombinanten Proteins kann ein konstanterer Spiegel aufrechterhalten werden als bei intravenöser Applikation (84, 232, 97). Durch den Vergleich eines gentherapeutisch induzierten Interleukinspiegels und einer täglichen äquivalenten Injektion wurde der gleiche Zusammenhang bewiesen: Die konstante Zytokinproduktion im Tumor ist der Schlüssel zur immuntherapeutischen Malignomtherapie (216). Eine interleukinstimulierte effektive Lymphozytenproliferation bei Hunden konnte aber auch durch eine Dauertropfinfusion erreicht werden. Hier kann das Problem der kurzen Halbwertszeit ausgehebelt werden (96).

Einen Anhaltspunkt des Verlaufs der Transgenexpression kann vielleicht eine adenovirale Gentherapie bei Katzen geben, bei der eine deutliche Transgenexpression am Tag sieben nach der Intervention noch im Serum nachgewiesen werden konnte. Eine Woche später war der Level auf Werte vergleichbar denen untherapierter Katzen gefallen. Hier handelte es sich allerdings um die intravenöse Applikation zur Transduktion von Leberzellen (144).

Bei intratumoralem IL 2-Transfer beim Menschen konnte nur nach 48 h im Homogenat der Biopsie die Expression gezeigt werden, nach sieben Tagen war kein IL 2 mehr detektierbar, im Serum fanden sich zu keinem Zeitpunkt erhöhte Werte (218). Dies mag sich aber mit der gewählten Dosis verändern.

2.3.7 Messen der Zytokinkonzentration, lokaler und systemischer Auswirkungen

Eine Möglichkeit der Einschätzung der IL 2-Menge besteht darin, IL 2-abhängige Zellen zu beobachten (murine T-Zelllinie CTLL-2) und aus deren Vermehrung und DNA-Synthese auf vorhandenes IL 2 im zugegebenen Überstand rückzuschließen. Auf diese Weise ist durch die Wirksamkeit feline Interleukins auf die T-Lymphozyten der Mäuse ein Nachweis des Katzenproteins ohne vorhandene Anti-Interleukin-Antikörper möglich (230, 12, 104). Dies ist ein biologischer Test, der gleichzeitig nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die biologische Wirksamkeit des Proteins zeigt.

In unserer Studie ist jedoch der Nachweis des von der Katze gebildeten, aber der menschlichen Gensequenz folgenden, Interleukins nötig. So können wir im Katzenserum mit Antikörpern, die sich gegen humanes IL 2 richten, im ELISA die Zytokinkonzentration feststellen (siehe auch Kapitel 3.1.4.2 Interleukin 2-Konzentration: Methode).

Zu dem Zeitpunkt, an dem kein Interleukin mehr nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob die Proteinexpression nicht mehr vorhanden ist oder ob vielleicht entstehende Antikörper gegen das Produkt Komplexe mit demselben bilden, wodurch die Nachweisbarkeit im ELISA nicht mehr gegeben ist (168). Diese Frage ist natürlich unabhängig von der Tatsache, dass die lokale und die im Serum vorhandene Konzentration des Lymphokins keineswegs gleich verlaufen müssen.

Histologische Untersuchungen und FACS-Analysen („fluorescence activated cell sorter“) von Tumorgewebe oder umgebenden transduzierten Zellen zeigen die Infiltration von Lymphozyten und anderen Effektorzellen in die Neoplasie und das lokale Verhältnis von CD 4⁺- und CD 8⁺-Zellen (121). Nach der inhalativen IL 2-Applikation können die durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Leukozyten auf ihre Anti-Tumor-Aktivität untersucht werden (128). Anhand einer Blutprobe lassen sich z. B. das rein quantitative Ansteigen der Leukozytenzahl oder auch die Aktivierung der peripheren mononukleären Zellen im Vollblut untersuchen (128).

Auch die Produktion weiterer durch IL 2 induzierter Zytokine kann nachgewiesen werden. Diese sind es, die maßgeblich zur Toxizität von IL 2 beitragen (214).

2.4 Interferon γ (IFN γ)

2.4.1 Eigenschaften und Wirkungen

Interferone sind natürlich vorkommende Glykoproteine, die die Replikation einer großen Gruppe von Viren beeinflussen können und zusätzlich antiproliferative, antineoplastische und immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen (126, 112).

Das in allen T-Zellen synthetisierte Lymphokin IFN γ erfüllt im Rahmen einer Infektion mehrere Aufgaben: Alle Moleküle, die der Antigenpräsentation dienen, werden verstärkt ausgeprägt, und der mikrobizide Effekt von Makrophagen wird verstärkt. Außerdem nimmt es Einfluss auf die Immundominanzhierarchien und verlängert die Lebensdauer antigenspezifischer CD 8⁺-Zellen (8). Die antitumorale Wirkung erfolgt also über zwei Prinzipien: Durch antiproliferative Eigenschaften wird eine direkte Einwirkung auf die malignen Zellen ausgeübt, und durch Stimulation der Abwehrzellen und Verbesserung der Wechselwirkungen des Individuums mit der Neoplasie kann indirekt der Tumor bekämpft werden (13).

Aktivierte zytotoxische T-Zellen, die spezifisch auf Tumorantigen reagieren, sezernieren verstärkt IFN γ (3). In einer Studie von Whitley, in der canine Tumorzellen nach der Stimulation mit caninem IFN γ untersucht wurden, erhöhte sich die Expression von MHC I-Rezeptoren um den Faktor 19, MHC II-Rezeptoren wurden sogar 167fach vermehrt ausgeprägt. Die Präsentation tumorassoziierter Antigene verstärkte sich je nach Zelllinie zwischen fünffach und 131fach (241). Durch diese Fähigkeit können Tumorzellen anfällig für eine Lyse durch zytotoxische Zellen werden, da eine Antigenerkennung möglich wird. Die Einwanderung von Entzündungszellen in das Tumorgebiet wird klar verstärkt (240), die lokale Interferonproduktion führt zu einer zellvermittelten antitumoralen Antwort in-vivo.

Ausschließlich mit IFN γ transduzierte Tumoren bei Mäusen erfahren eine verstärkte Infiltration durch Makrophagen. Auch die Anfälligkeit für deren zellschädigende Aktivität steigt deutlich. Hierauf beruht der antineoplastische Effekt des IFN ohne die synergistische Wirkung im Zusammenhang mit IL 2. Die Tumorzellproliferation wird durch IFN γ nicht beeinflusst, das gebremste Tumorstadium beruht auf der Lyse von malignen Zellen (145). Nicht unerwähnt bleiben darf aber, dass Puisieux im gleichen Tumormodell, dem murinen Mammakarzinom, nach IFN γ -Transduktion in-vitro keinen antitumoralen Effekt feststellen konnte. Er fand im Gegenteil eine erhöhte Malignität transformierter Zellen im Vergleich zu

den ursprünglichen Tumorzellen (196). Eine mögliche Erklärung stellt nur die Tatsache dar, dass Puisieux eine Sekretion von sieben Tagen untersuchte, bei Lollini wurde über einen langen Zeitraum IFN γ exprimiert. So werden Zellen zu Beginn verstärkt tumorigen, während anhaltende IFN-Spiegel die Immunogenität erhöhen (184).

Die Produktion von Interferon γ wird unter anderem durch IL 2 reguliert (147, 64). Aufgereinigtes IL 2 ohne Interferonaktivität verstärkt die gegen maligne Zellen gerichtete Wirkung von NK-Zellen in der Zellkultur über eine Kaskade, in der das Lymphokin die Bildung von IFN γ induziert, das wiederum dann für die verstärkte Tumorabwehr verantwortlich ist. Mit Interleukin stimulierte Lymphozyten produzieren in-vitro große Mengen Interferon, das mit Hilfe spezifischer Antikörper als IFN γ typisiert werden konnte. Der Effekt von IL 2 auf die NK-Zellen kann durch eine spezifische Blockade von IFN γ komplett aufgehoben werden, sowohl in menschlichen als auch in murinen Zellkulturen. Nur das durch das erste Lymphokin induzierte zweite Lymphokin führt zum biologischen Effekt. Makrophagen und andere Nicht-T-Zellen können nach Interleukinstimulation keine Interferone ausschütten (122, 237). Das Interleukin mit der stärksten IFN γ -induzierenden Wirkung ist IL 12 (25).

Kirchheis konnte mit einer Dosis von 200 ng IFN γ bei Mäusen, die mit zytokinsezernierenden Tumorzellen behandelt wurden, den besten Effekt erzielen. In der Kombination mit IL 2 erwies sich jedoch eine niedrigere Dosis von 50 ng als höchst erfolgreich (130). Die Kombination der beiden Lymphokine, und nur diese, gibt einer aktivierten B-Zelle Signale zur Differenzierung, d. h. zum Beginn der Sekretion von Immunglobulinen (236).

Durch stärkere Unterschiede im Aufbau dieses Zytokins im Vergleich verschiedener Spezies muss es artspezifisch eingesetzt werden. Seine Wirkung auf artfremde Zellen ist stark begrenzt, der direkte zytotoxische Effekt in-vitro minimal (176).

Generell weisen hämatopoetische Tumoren und Melanome eine höhere Sensitivität für Interferone auf als andere neoplastische Zellen, was durch das Vorhandensein oder Fehlen von Rezeptoren erklärt werden kann. Solide Tumoren reagieren verstärkt auf IFN γ in Vergleich mit anderen Interferonen. In-vitro konnte Kessler die Speziespezifität allerdings nicht nachvollziehen. Er zeigte eine Wirkung humaner rekombinanter Interferone auch auf neoplastische feline und canine Zellen (177, 126).

2.4.2 Einfluss auf den Gentransfer

Lymphokine können promoterabhängig die Transgenexpression beeinflussen. IFN γ und TNF α bewirken eine Inhibition der Transgenexpression über den viralen Promoter CMV. Diese Zytokine verursachen keine Schädigung der Vektor-DNA, keine Inhibition der Proteinsynthese und zerstören nicht transduzierte Zellen, sondern agieren auf dem Niveau der viralen mRNA. Diese wird abhängig vom und spezifisch für den verwendeten Promoter auf post-transkriptionaler Ebene angegriffen. Es wird eine Kaskade intrazellulärer Signale ausgelöst, die die Regulation der Transkription und auch Translation beeinflussen und den Level der Genexpression herabsetzen. In synergistischer Funktion können diese beiden Zytokine die Transgenexpression so um bis zu 60 % vermindern (79, 86, 197). Bei gleichzeitiger Applikation von IFN γ und TNF α während des Gentransfers in-vitro wurde die Expression reversibel gehemmt. Zwei Tage nach Entfernen dieser Zytokine war die ursprüngliche Quantität der Transgenproduktion wiederhergestellt, was beweist, dass kein Schaden der viralen DNA und auch kein Angriff auf transduzierte Zellen stattgefunden hat, sondern dass der Zytokineinfluss das Transkriptions-Translations-Gefüge verändert (197). Eine andere Studie wurde an Mäusen durchgeführt, die kein IFN γ oder TNF α produzieren konnten. Hier war die Expression in der Frühphase deutlich stärker messbar, in der Spätphase ergaben sich keine Änderungen, aber es trat eine Verlängerung des Vorhandenseins des Markergens auf (222).

Nicht nur durch das in unserer Studie verwendete IFN γ -Transgen, sondern auch durch die adenovirale Stimulation des Immunsystems und den Reiz der transferierten Nukleinsäuren wird körpereigenes IFN γ produziert (59, 206), das in diesen Prozess zusätzlich hemmend eingreifen kann. Die auftretende Inhibition des Gentransfers allerdings ist promoterabhängig und tritt verstärkt bei viralen im Vergleich zu zellulären Promotern in Erscheinung. Dies konnte sowohl in-vitro als auch in-vivo bewiesen werden. So folgert Harms, dass ein Vektor mit CMV-Promoter nicht in einer immunstimulierenden Gentherapie allgemein, im Besonderen im Zusammenhang mit transportiertem IFN γ eingesetzt werden darf. Dazu kommt der noch stärkere Effekt anderer Interferone, insbesondere IFN α , das während der Entzündungsreaktion vom Körper freigesetzt wird und die Effektivität des Gentransfers unter anderem durch seine antivirale Wirksamkeit dosisabhängig stark mindert. Für eine verbesserte Gentransferleistung wird sogar der Einsatz von Anti-IFN-Antikörper vorgeschlagen (86, 1, 222).

2.4.3 Nachweis

Der Nachweis von feline Interferon γ im ELISA ist aufgrund nicht vorhandener Antikörper nicht möglich. Die biologische Aktivität des Katzenzytokins wurde durch eine Analyse der induzierten MHC I-Moleküle auf PG 4-Zellen bewiesen. Dies sind transformierte Astrozyten aus dem feline Gehirn (registriert unter der Nummer CRL-2032 bei der American Type Culture Collection (ATCC), basierend auf den Zellen Nummer G355-5). Diese Zellkultur wurde mit dem Kulturüberstand von Zellen inkubiert, die mit dem rekombinanten, feIFN γ -Gen-tragenden Adenovirus AdTG13273 infiziert worden waren. So konnte in der FACS-Analyse nach der Bindung fluoreszierender Antikörper (Rat anti-feMHC I-Ak) nachgewiesen werden, dass durch feline Interferon γ bis zu Verdünnungen von 10^{-6} eine starke MHC I-Induktion nach Exposition ausgelöst werden konnte (6, 102). Abbildung 3 zeigt die verstärkte Expression bei einer Verdünnung des Kulturüberstandes von 10^{-4} im Vergleich zu Zellen, die keine Interferonstimulation erhalten haben.

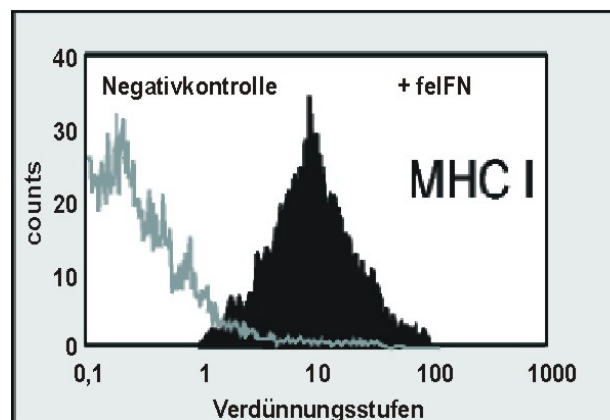


Abbildung 3: FACS-Analyse: MHC I-Expression nach Kultivierung von PG 4-Zellen im Überstand AdfeIFN γ -transduzierter Zellen (AdTG 13273)

2.5 Reaktionen des Organismus auf Transgen und transduzierte Zellen

2.5.1 Immunantwort gegen das Transgen

Die gegen das Transgenprodukt gerichtete Abwehr ist aus mehreren Gründen unerwünscht. Einerseits kommt es zum schnellen Wirkverlust des induzierten Proteins, zweitens durch die gegen transduzierte Zellen gerichtete zytolytische Aktivität zur schnellen Elimination, drittens bei manchen Konstellationen zur Gefahr des Hervorrufens autoimmuner Prozesse, und viertens beeinträchtigt diese Immunantwort auch die erneute Anwendung (150).

Bei der Gentherapie von immunkompetenten Mäusen mit murinem Erythropoetin (EPO) konnte über eine Langzeitgenexpression der Hämatokritwert langfristig erhöht werden, während die gentherapeutische Applikation von humanem EPO in einer gegen das Transgen gerichteten Abwehr mit nur transienter Expression resultierte (231).

Interessanterweise konnten keine Antikörper gegen den humanen „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) bei neun Affen nachgewiesen werden, die über mehr als ein Jahr bis zu 18 Dosen des tragenden Adenovirus vom Serotyp 2 erhielten. Auch eine Aktivierung der T-Helfer-Zellen unterblieb. Mögliche Erklärungen könnten eine große Ähnlichkeit mit dem gleichen Protein des Affen oder eine zu geringe Genexpression sein (120).

Yei fand eine gegenläufige Korrelation zwischen den im Serum vorhandenen neutralisierenden Antikörpern und der Höhe der Transgenexpression bei der Ratte (253). Auch bei Mäusen ließ sich dieser Zusammenhang eindeutig bestätigen (168). Nach intraperitonealer gentherapeutischer Intervention konnte Gilgenkrantz nach 14 Tagen Antikörper gegen das körperfremde Transgen nachweisen. Diese führten zur starken Reduktion exprimierender Zellen, die völlig unabhängig war von dem Vorhandensein virusneutralisierender Antikörper (72).

Doch es etabliert sich auch eine zelluläre, transgenspezifische CTL-Abwehr, wie Yang an Splenozyten nachweisen konnte. Diese ist besonders an der Elimination des Transgens, aber auch der Transgen-exprimierenden Zellen beteiligt (siehe auch Kapitel 2.5.5 Reaktionen auf transduzierte Zellen) (248, 118). Die sich mit der Zeit steigernde Antwort der CD 4⁺-T-Zellen gegen das Protein ist dosisabhängig, Transgen-neutralisierend und dauerhaft (69).

Eine Gentherapie bei Katzen, durchgeführt wie in der hier vorgelegten Studie mit einem E1 / E3-Adenovirus mit CMV-Promoter, zum Transport des humanen Lipoproteinlipase (LPL)-Gens, zeigte im Bioassay die Entwicklung transgenspezifischer Antikörper ab Tag 14. Die zu diesem Zeitpunkt 70 %ige Blockade der huLPL-Aktivität stieg in den zwei darauffolgenden Wochen auf fast 100 % an (144).

Gegen rekombinantes IL 2, das auf einer menschlichen Gensequenz basiert, bildeten Hunde bei einer Inhalationstherapie innerhalb von 30 Tagen Antikörper. Sogar Menschen, die mit rekombinantem humanem IL 2 behandelt wurden entwickelten neutralisierende Immunglobuline (127, 94). Auch diese entwickeln sich dosisabhängig. Ratten, die über 13 Wochen mit 1 µg / kg pro Tag behandelt wurden, bildeten keinerlei neutralisierende Antikörper, wohingegen die Dosis von 5 µg / kg innerhalb von vier Wochen zu deutlich messbaren Titern führte (85). Juillard untersuchte die Dauer der Ig G-Antwort gegen das β-Galaktosidase-Protein und fand einen stabilen Titer vom 15. Tag bis zum sechsten Monat nach einem einmaligen Gentransfer bei Mäusen. Er wies eine langanhaltende humorale und zelluläre Immunität nach, die spezifisch für das transportierte Transgen ist. Hierbei ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen singularer und multipler Immunisierung (115).

2.5.2 Beeinflussung der Transgenexpression durch den Immunstatus

In immundefizienten Mäusen bleibt die Transgenexpression im Serum und im behandelten Gewebe länger nachweisbar als bei immunkompetenten Tieren. Während der Peak an Tag zwei in beiden Gruppen auftritt, bleibt nur bei den immunologisch supprimierten Patienten die Expression über den Versuchszeitraum von 80 Tagen konstant. In der anderen Gruppe erfolgt der schnelle Abfall schon innerhalb des ersten Monats. Dieser korreliert mit der Entwicklung und dem Nachweis gegen das Transgen gerichteter Antikörper, die nur in der Gruppe der immunologisch kompetenten Tiere gefunden werden (168).

Besonders wichtig für die Dauer der Transgenexpression ist die gegen den Vektor gerichtete Abwehr. Für die Effektivität der Abwehr ist hier die Applikationsart entscheidend: Bei der intravenösen Vektorapplizierung werden die Viren schnellstmöglich von Immunglobulinen erkannt und blockiert. Dies ist jedoch nicht der Fall bei der intramuskulären Gabe. Hier ist trotz präexistierender Immunität eine wiederholte Therapie effektiv (32). Eine Korrelation

zwischen der systemischen, zellulären, antiviralen Antwort und der Dauer der Transgenexpression ist grundsätzlich nicht gegeben (168, 235). Durch eine Verminderung der antiadenoviralen Entzündungsreaktion und der damit vorhandenen Zelltoxizität kann eine deutlich verlängerte Expression des Transgens erreicht werden (88).

Durch systemische Applikation von Dexamethason oder Cyclosporin A wird die Transkription von IL 2 in menschlichen T-Lymphozyten vermindert, da bestimmte Proteine im Kern als Transkriptionsfaktoren nicht mehr an den IL 2-Promoter binden können (186). Auch die Stabilität der zytokinen mRNA wird durch das Glukokortikosteroid angegriffen, die Halbwertszeit halbiert sich in-vitro unter diesem Einfluss. Dexamethason erzielt jedoch keine Wirkung auf das IL 2-Rezeptorgen, exogen zugeführtes IL 2 bleibt also auch unter Dexamethasonbehandlung wirksam (24).

2.5.3 Transduktion von Zellen

Die Fähigkeit von Adenoviren vom Typ 5, die nicht replikationsfähig sind, feline Fibrosarkomzellen zu transfizieren, ist gegeben. Bei acht Katzen mit Fibrosarkomrezidiven wurde mit verschiedenen Dosen und an verschiedenen Injektionsstellen die Verteilung auch im umliegenden Gewebe untersucht, indem die Tumoren 48 – 96 Stunden nach der Injektion chirurgisch entfernt wurden und die Verteilung des Markergens histologisch geprüft wurde. Die Grenze des Nachweises dieses β -Galaktosidase-Markergens liegt bei 1000 Molekülen pro Zelle, sodass bei negativem Befund eine Überprüfung durch eine rt-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) stattfand, die auch noch zehn Moleküle pro Zelle finden kann. Injizierte niedrige Dosen von 400 μ l in einer Konzentration von 10^4 oder 10^5 p.f.u. des adenoviralen Vektors pro ml streuten nach intratumoraler Injektion nicht in das umliegende Gewebe. Ein Gentransfer wurde nur an den Injektionsstellen intra- oder peritumoral beobachtet. Bei Dosen, die um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher konzentriert waren, war die Streuung transfizierter Zellen größer. Diese ließen sich auch im die Injektion umgebenden Gewebe und in weiter entfernten Tumorschichten nachweisen, nicht aber auf der der Einstichstelle gegenüberliegenden Seite der Neoplasie (152).

Huard fand eine Korrelation zwischen der Menge viraler DNA in einer Zelle und der Quantität des von ihr exprimierten Transgens. Die Anzahl der in verschiedenen Organen gefundenen Viruskopien pro Kern der transduzierten Zelle lag bei ein bis drei Exemplaren (105). Auch bei der Transduktion muriner Fibrosarkomzellen wurde eine lineare Beziehung zwischen der verwendeten MOI (multiplicity of infection) und der Expression des Transgens bewiesen (229). Interessanterweise wurde in anderen Untersuchungen ein bemerkenswerter Unterschied zwischen der Menge viraler DNA im Gesamttumor und der Transgenaktivität desselben nachgewiesen (142). Für die Gesamtheit transduzierter Zellen scheint also keine Korrelation vorzuliegen, auch wenn in Einzelzellen Rückschlüsse vom einen Parameter auf den anderen zulässig sind.

2.5.4 Der Bystander-Effekt

Die Anzahl transfizierter Zellen ist vor allem abhängig von der angewandten Dosis. Durch verschiedene Tumorgrößen, unterschiedliche Applikationsarten und variierende Dosen lässt sich nur beispielhaft angeben, wie viele Zellen danach eine Fremdgenexpression zeigen. Cusack erzielte mit hohen Dosen von 10^{10} p.f.u. Ad in Neoplasien mit einem Volumen von 1 cm^3 je nach Art der Neubildung Transduktionsraten zwischen 47 % und 82 % (48). Mit der gleichen Dosis kann bei Applikation in die Portalvene eine Effizienz von über 95 % transfizierter Hepatozyten erreicht werden (140).

Auch wenn eine Transduktion jeder einzelnen Tumorzelle wünschenswert wäre, so ist dies weder möglich noch nötig, da durch die verstärkte, gegen Tumorzellen gerichtete Antwort zytotoxischer T-Zellen auch nicht-transduzierte Nachbarzellen erkannt und lysiert werden können. Diese Wirkung auf das gesamte umgebende Milieu wird Bystander-Effekt genannt. Durch genetische Modifikation von nur 10 % der Tumorzellen z. B. bei der Transfektion mit dem Thymidinkinasegen eines Herpes simplex-Virus kann die Gesamtneoplasie zur Apoptose gezwungen werden (66).

Durch die Rekrutierung von Entzündungszellen, die direkt oder indirekt einige Tumorzellen zerstören, werden Antigene in Form von Peptiden oder Apoptosekörperchen freigesetzt, die wiederum von dendritischen Zellen aufgenommen werden. Diese wandern in den zugehörigen Lymphknoten und begegnen dort naiven T-Zellen, die hierdurch aktiviert werden und eine systemische Immunität induzieren. Diese bedeutet eine tumorspezifische Immunantwort und

eine weitere Zerstörung von Tumorzellen (190). Außerdem nehmen unveränderte, maligne Nachbarzellen apoptotische Vesikel auf, was einen toxischen Effekt auf sie hat (66). Der Bystander-Effekt wird begünstigt durch IL 2, IL 4, IL 7 und TNF α (41).

2.5.5 Reaktionen auf transduzierte Zellen

Im Vergleich des viralen Gentransfers an immunkompetente und immunologisch supprimierte Individuen konnte immer wieder die unterschiedliche Dauer der Expression und des Verbleibs viralen Genoms sowie transfizierter Zellen gezeigt werden. Bei Mäusen z. B., die keinen Thymus besitzen, kann nach adenoviraler Zelltransduktion über 60 Tage eine Genexpression nachgewiesen werden, die virale DNA bleibt mit fünf Kopien pro Zelle über diesen Zeitraum konstant. Bei immunkompetenten Tieren hingegen ist schon nach 21 Tagen nur noch 1 / 25 der fremden genetischen Information vorhanden (250). Bei gesunden Menschen konnte auch 28 Tage nach intradermaler Adenovirusapplikation ein Verbleib des Vektorgenoms gezeigt werden, Stewart fand intratumoral nach zwei Wochen, Gahéry-Ségard nach 60 Tagen noch Virusanteile, wodurch der Rückschluss auf eine schnelle Zerstörung der Mehrheit transfizierter Zellen durch die lokale, zelluläre Abwehr unzulässig wird, auch wenn die Lyse solcher Zellen durch infiltrierende Lymphozyten gezeigt werden konnte (252, 69, 118, 92, 218). Allerdings lässt sich von vorhandener adenoviraler DNA nicht auf eine Genexpression schließen, ein großer Teil ist nicht transkriptionsaktiv (222).

Unabhängig vom Transgen wird eine starke virusspezifische Antwort der CTLs gefunden. Diese ist es jedoch nicht, die zur Elimination transduzierter Zellen führt. Gezeigt wurde eine Stabilität viraler DNA im Gewebe (168). Hier spielt die gegen das Transgen gerichtete Aktivität die entscheidende Rolle (115, 36). Wahrscheinlich wird durch die entstehenden Antikörper eine antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (antibody dependant cellular cytotoxicity (ADCC)) ausgelöst, die zur Zerstörung Transgen-exprimierender Zellen führt (168), auch wenn Yang noch zwei Jahre vorher die antivirale Komponente für den dominierenden Faktor der Zellelimination und des Absinkens der Transgenexpression hielt. Jedoch konnte auch er bei Einsatz UV-inaktivierter Viren nicht die gleichen Ausmaße einer Organschädigung nachweisen wie bei transgentragenden Vektoren, sodass schon der Einfluss des Transgens vermutet werden musste (250). Dafür spricht auch der Verbleib transduzierter Zellen über einen Zeitraum von über zwei Monaten nach erneuter Adenovirusapplikation trotz

vorhandener und messbarer zellulärer, antiadenoviraler Immunität (168) sowie die Langzeitexpression nicht-immunogener Transgene im Vergleich mit verstärkt immunogenen bei gleichbleibendem Vektor (231). Bei immunkompetenten Tieren und einer Therapie mit einem Protein, gegenüber welchem eine immunologische Toleranz besteht, persistiert die Expression deutlich länger als aufgrund der bekannten antiviralen Antwort angenommen (36). Selbst bei nachgewiesener, sich entwickelnder, zellulärer, antiviraler Antwort ist die Expression eines nicht-immunogenen Transgens weiterhin gegeben (235).

Jedoch können auch zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden, die spezifisch auf den Kontakt mit de novo synthetisierten viralen Antigenen reagieren und an der Elimination transfizierter Zellen teilhaben, besonders bei schon präimmunisierten Tieren (59, 248, 35). Hier werden genetisch veränderte Zellen zerstört, in der Leber z. B. kommt es zu einer massiven Hepatitis, charakterisiert durch Lymphozyteninfiltrate. Danach findet eine Regeneration durch mitoseaktive Hepatozyten mit Bildung nicht-transgener Zellen statt (250).

2.6 Tumorimmunologie

2.6.1 Antitumorimmunität

Die Frage, warum der Körper es in den allermeisten Fällen schafft, entartete Zellen zu erkennen und auch schnellstmöglich zu eliminieren, in manchen Fällen aber versagt und einer Neoplasie die Möglichkeit des Wachstums bietet, ist nicht durch ein einziges Faktum zu beantworten. In schnell wachsenden Tumoren fehlen meistens entzündliche Infiltrate, und die Rekrutierung und Aktivierung antigenpräsentierender Zellen bleibt mangelhaft (183). Das Unvermögen des Körpers bei der Bekämpfung von Tumorzellen ist weniger auf die Nicht-Immunogenität tumoraler Peptide zurückzuführen. Vielmehr werden diese nicht adäquat präsentiert. Durch eine mangelhafte MHC-Ausprägung, Defekte in der Antigenpräsentation, unterdrückte Zytokinsekretion oder fehlende kostimulatorische Signale kann die Neoplasie die gegen sie gerichtete Abwehr schwächen oder komplett ausschalten (106, 31, 50, 57). Der Mangel an exprimierten MHC-Molekülen stellt eine wichtige Überlebensstrategie des Tumors dar. Ein komplettes Fehlen von MHC-Rezeptoren führt allerdings zur sofortigen Zellyse durch NK-Zellen. Bei MHC-negativen Neoplasien handelt es sich also nur um eine stark herabgesetzte Anzahl von Molekülen, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Erkennung und eines Nachweises gering bleibt (57).

Eine Sekretion von TGF β (transforming growth factor) und auch IL 10 unterdrückt die Antitumorantwort, der Patient bleibt tolerant gegenüber tumoralen Antigenen. Auch eine besondere Maskierung der präsentierten Antigene durch die Glykokalix verhindert effiziente Gegenwehr (138, 256). Selbst sterbende Tumorzellen versuchen noch, ihrer Erkennung vorzubeugen: Sie erleiden eine Apoptose und keinen Zelltod mit der Freisetzung von Stressproteinen, sodass dem Immunsystem statt getöteter Zellen ein sich normal regenerierendes Gewebe vorgegaukelt wird. Außerhalb eines entzündlichen Kontextes werden tumorale Antigene also entweder ignoriert oder als zum Körper gehörend toleriert (183).

Auch durch die ständige Proliferation in Gegenwart einer sich aufbauenden Immunantwort werden Mutanten selektiert, die der Abwehr besser widerstehen, sodass sich eine gewisse Form der Resistenz ausbildet (117).

Genetisch veränderte Tumorzellen, die selbst Zytokine ausschütten, erhalten immunogene Eigenschaften, die dem Immunsystem ein Eingreifen ermöglichen. Lokal wird eine inflammatorische Reaktion provoziert. Antigenpräsentierende Zellen und angeborene Immunkontrollmechanismen wie polymorphkernige, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen werden angelockt, und dem Immunsystem wird ein Warnsignal übermittelt (183). Immunsupprimierte tumorinfiltrierende Lymphozyten werden in diesem Mikromilieu durch IL 2 oder auch IL 7 aktiviert und zur Expansion gebracht (229). Durch die lokale Zytokinausschüttung kann insbesondere der Prozess des „Cross-Priming“ verstärkt werden. Dieser Mechanismus besteht in einer Vernetzung der Prozessierung exogener Antigene über MHC II-Moleküle und endogener Antigene in MHC I-Rezeptoren (41, 227). Tumorzelldebris wird von antigenpräsentierenden Zellen verarbeitet und kann sowohl über MHC I als auch über MHC II präsentiert werden, sodass eine effektive Aktivierung sogar von CD 4⁺-Zellen in den Lymphknoten erreicht werden kann (189, 190).

Ziel der in dieser Studie angewandten immunmodulierenden Gentherapie ist eine Langzeit-Antitumorimmunität. So schwierig es sein mag, einen vorhandenen Tumor nur durch den Kampf des Immunsystems zu besiegen, weil seine Mechanismen, der Erkennung zu entkommen, sehr ausgereift sind, so ist es aber möglich, eine Immunität gegen einzelne Tumorzellen außerhalb des Tumormilieus zu erzeugen. (41). Dieses Ergebnis ist erwünscht für die Rezidivprophylaxe nach chirurgischer Intervention. Eine große Schwierigkeit der onkologischen Immunstimulation bleibt der Kampf gegen die Zeit. Für eine komplexe Antwort des Immunsystems mit ausgereifter Spezifität braucht es unter Umständen länger als der Tumor für sein Größenwachstum. Dies trifft insbesondere bei schnellwachsenden Tumoren zu. Auch darin ist der adjuvante, postchirurgische Einsatz begründet (183). Mit IL 12 konnte Bramson zeigen, dass im Falle einer kompletten Tumorregression eine Langzeit-Antitumorimmunität für einen Zeitraum von bis zu acht Monaten besteht, während derer das Versuchstier einer Herausforderung durch injizierte, frische Tumorzellen trotzen kann. Diese schützt vor Rezidiven und Metastasierung und kann evtl. durch Boosterinjektionen mit bestrahlten Tumorzellen aufrecht erhalten werden (25). Wichtig ist der Einsatz der Zytokine an Ort und Stelle für eine optimale Induktion der Immunantwort.

Puisieux beschreibt den Effekt des Vektors selbst (Canarypoxvirus) ohne wirksames Transgen bei einem Adenokarzinom der Maus. Eine Wachstumshemmung des Tumors und die Ausbildung einer Immunität konnten bei 33 % der Tiere beobachtet werden. So hoch kann in dem Fall der adjuvante Effekt des Vektors eingeschätzt werden (196).

2.6.2 Das Tumormilieu

Zu den immunsupprimierenden Faktoren, die vom Tumor selbst freigesetzt werden können, gehören z. B. TGF β und IL 10 (183). Jedoch können Tumoren desselben Typs bei unterschiedlichen Individuen unterschiedliche Sekretionsprofile wachstumsstimulierender und antitumoral wirkender Zytokine besitzen, weshalb Pekarek empfiehlt, eine Zytokintherapie erst nach einer Profilerstellung per PCR maßzuschneidern (192). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass auch ein und dasselbe Zytokin je nach Umgebungsbedingungen und Wechselwirkungen unterschiedliche und manchmal sogar gegensätzliche Wirkungen hervorruft. Gadiant konnte unter verschiedenen Bedingungen sowohl die pro- als auch die anti-inflammatorische Wirkung von IL 6 und IL 11 zeigen (68).

2.6.3 Messen der Antitumorimmunität

Wichtig für den Erfolg der Therapie ist das klinische Ergebnis. Es gibt aber mehrere Parameter und verschiedene Möglichkeiten, die Antitumorimmunität zu messen, um eine Einschätzung der erfolgten Immunstimulation zu gewinnen. Effektorzellen der Tumorantigen-spezifischen Abwehr wie Monozyten und NK-Zellen spielen eine große Rolle, ebenso wie die Immunglobuline als Bestandteil der humoralen Antwort. Besonders wichtig ist die Zahl und Funktion der CD 4⁺-Helfer-T-Zellen und der CD 8⁺-T-Lymphozyten, die auf MHC-Molekülen präsentierte Tumorpeptide erkennen, was den Auslöser einer Zytolyse darstellt. Hierzu muss die antigenspezifische, T-Zell-vermittelte Immunantwort detektiert und quantifiziert werden können, wozu Tetrameranalysen, ELISPOTs, Durchflusszytometrien und T-Zell-Rezeptor-Messungen per PCR durchgeführt werden (39).

Die Zusammensetzung der infiltrierenden Zellen in Tumorgewebe oder Gewebe, in das ein Gentransfer erfolgt ist, gewonnen z. B. durch eine broncho-alveoläre Lavage oder die Tumorexstirpation, kann einfach durch Färbemethoden untersucht werden. Hierzu zählen insbesondere immunhistologische Verfahren. Auch in Proben aus der Milz oder den Lymphknoten können Zellpopulationen und ihr Aktivierungszustand sowie Antikörperkonzentrationen gemessen werden, um die sich entwickelnde lokale und auch systemische Immunität kennen zu lernen (120, 55). McClane fand z. B. nach direkter Injektion von Adenoviren in das Pankreas sensitivierte Splenozyten mit deutlich erhöhter zytotoxischer und lymphoproliferativer Aktivität sowie vermehrter endogener Zytokinausschüttung nach erneutem Vektorkontakt (164). Durch spezifische, fluoreszierende Antikörper gegen Oberflächenantigene wird der Phänotyp von Lymphozyten näher bestimmt: Anti-CD 2-Antikörper binden an alle T-Lymphozyten, CD 20 ist charakteristisch für B-Zellen. Auch CD 4⁺- und CD 8⁺-Zellen können so in der Durchflusszytometrie unterschieden werden (120). Aber nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die zytolytische Aktivität sind wichtig für die Beurteilung und können in Zellkulturen ermittelt werden.

Eine Untersuchung direkt am wachen Patienten ist der „delayed-type hypersensitivity-test“ (DTH-Test). Dieser zeigt auch mehrere Monate nach erfolgreicher antitumorale Immunstimulation bei der Durchführung ein positives Ergebnis. Hierbei wird lösliches Protein oder auch auf antigenpräsentierenden Zellen geladenes Tumorantigen intradermal injiziert. Das entstehende Erythem und die lokale Verhärtung werden ausgewertet. Über freigesetzte Zytokine, die die Gefäßpermeabilität erhöhen und Entzündungszellen anlocken, reagieren CD 4⁺- und langlebige CD 8⁺-Lymphozyten und lassen sich so nachweisen (195, 39).

In Tumor- oder Organhomogenaten sowie im Serum lassen sich im ELISA Zytokinkonzentrationen körpereigener oder durch Gentransfer induzierter Zytokine bestimmen. Der ELISPOT gibt Auskunft über die Lymphokinproduktion einzelner in Kultur genommener Zellpopulationen. Die quantitative rt-PCR weist mit hoher Genauigkeit den Level der Transkripte ausgewählter Gene nach.

All diese Parameter haben keinen direkten Zusammenhang mit der Zahl bekämpfter maligner Zellen oder der Stärke des Tumorrückganges. Für jedes Projekt ist eine genaue statistische Analyse nötig, um den Parameter zu finden, der am engsten mit dem Ergebnis am Patienten korreliert (39).

2.7 Immunstimulation in der Tiermedizin

Bei immunmodulierendem Eingreifen in das Abwehrsystem unserer Haustiere spielt vor allem die Immunsuppression im Rahmen von allergischen Erkrankungen und angeborenen oder erworbenen Autoimmunkrankheiten eine Rolle. Jedoch werden in den letzten Jahren verstärkt Strategien zum Einsatz bei Immunschwächezuständen entwickelt, wobei im Rahmen von Infektionskrankheiten besonders die systemische, bei Tumorerkrankungen eher die lokale Immunstimulation zum Tragen kommt.

Schon 1907 setzte Coley das nach ihm benannte Coleytoxin ein, das aus einer Mischung von Bakterien der Gattungen *Erysipelothrix* und *Bacillus* bestand. Hiermit behandelte er inoperable Sarkome und erzielte einige klinische Remissionen, die wahrscheinlich vor allem auf die Bildung von TNF zurückzuführen sind (226, 117).

Die medikamentöse Stimulierung von Abwehrmechanismen hat sich vor allem als prophylaktische Paramunisierung bewährt. Außerdem kann der unterstützende Einsatz bei multifaktoriellen Erkrankungen hilfreich sein. Unter Paramunität versteht man den sich schnell entwickelnden Zustand eines zeitlich begrenzten erhöhten Schutzes gegenüber Infektionen und weiteren Herausforderungen des Immunsystems, der allerdings weder antigen- noch erreger-spezifisch ist. Hierdurch sollen Immunsuppressionen und -dysfunktionen behoben werden (75). Diese unspezifische Verstärkung bewährt sich in der Behandlung chronischer Erkrankungen mit (vermuteter) Immunsuppression wie z. B. der Demodikose, der Staphylokokkenpyodermie oder der Leukose der Katze, steckt aber noch in den Kinderschuhen, da viele ausgelöste Mechanismen erst in Ansätzen verstanden werden (233).

Neben stimulierenden Auslösern einer Zytokinproduktion pflanzlichen, bakteriellen oder viralen Ursprungs, können auch die Zytokine selbst eingesetzt werden.

Acemannan (Carrisin® von Carrington Laboratories) ist eine pflanzliche Substanz, die ursprünglich beim equinen Sarkoid erfolgreich eingesetzt wurde. Allerdings zeigen etwa ein Drittel der Patienten vorübergehende Nebenwirkungen. Die Substanz wird von Makrophagen aufgenommen und bewirkt dort die Ausschüttung von IFN, IL 1, TNF α und dem Prostaglandin E2. Die Phagozytosefähigkeit und die nonspezifische Zytotoxizität der Effektorzellen werden verstärkt. In Studien mit FeLV-positiven und klinisch erkrankten Katzen konnten große Erfolge erzielt werden, indem die geschwächten Lymphozytenfunktionen wieder

gestärkt wurden (siehe auch Kapitel 2.7.5 Immunmodulation beim feline Fibrosarkom) (226, 233).

Ein Immunmodulator, der die Entzündungsreaktion durch Aktivierung von T-Suppressorlymphozyten hemmt, ist das Rötelnvirus (Rubeola Virus® von Eudaemonics Corp.). Hierzu gibt es allerdings noch keine klinischen Studien (233).

2.7.1 Bakterielle Immunstimulatoren

Zu den bakteriellen Immunstimulatoren gehören inaktivierte Propionibakterien (*Propionibacterium acnes*), Zellwandbestandteile von Subspezies nicht-pathogener Mykobakterien oder Lysate von *Staphylococcus aureus* (233).

Inaktivierte Propionibakterien stimulieren insbesondere eine schnelle Makrophagenaktivierung ohne unerwünschte Nebenwirkungen oder ausgelöste Überempfindlichkeitsreaktionen. Sie werden mit den Präparaten EqStim® und ImmunoRegulin® von der Firma Vetoquinol vertrieben. Durch die starke Stimulierung der IL 1-Ausschüttung und die verstärkte Aktivität der NK-Zellen durch IFN und TNF werden auch Zubereitungen aus Propionibakterien in der FeLV-Behandlung eingesetzt, um die Immunsuppression umzukehren (233).

Mykobakterien rufen eine ganze Kaskade von Immunreaktionen hervor, woraus hauptsächlich eine hohe Konzentration an TNF resultiert (siehe auch Kapitel 2.7.4 Immunstimulierende Tumorthherapie). Als Präparate, die in der Tiermedizin eingesetzt werden können sind Nomagen® (Fort Dodge), Regressin® (Vetrepharm Research), Immunoboost K® (Boehringer Ingelheim) und Ribigen® (Ribi Immunochem Research) auf dem Markt (233).

Staphylokokkenpräparate werden speziell bei Hauterkrankungen mit herabgesetzter Immunabwehr eingesetzt (Staphage lysate® von Delmont Laboratories) (233). Das Staphylokokken-Zellwandprotein A führt aber auch zu einer Immunmodulation mit effektiver Viruselimination bei Infektionen der Katze mit FeLV. Die Überlebenszeit der Tiere und die Einschätzung des Wohlbefindens und der Lebensqualität konnten gesteigert werden. Es wurde über immunstimulierende und antineoplastische Erfahrungen durch die IFN-Produktion sowie Makrophagen-aktivierende und Lymphozyten-mitoseinduzierende Mechanismen berichtet (78, 226, 163).

2.7.2 Paramunitätsinducer aus Pockenviren

Sowohl aus Parapox-, Avipox- und Fowlpoxviren wie aus Canarypox-, Orthopox- und Vacciniaviren wurden physikalisch durch die Verminderung des Molekulargewichtes oder chemisch durch eine Vielzahl von Deletionen attenuierte Stämme zur Paramunisierung erzeugt. Als Laborpräparate für die präklinische und klinische Forschung standen PIND-AVI (Fowlpoxvirus), PIND-ORF (Parapoxvirus), Conpind AOV (Fowlpoxvirus und Parapoxvirus), Conpind KOV (Fowlpoxvirus und Canarypoxvirus) und Conpind MOV (Parapoxvirus und Vacciniavirus) lyophilisiert zur Verfügung (158).

Heute auf dem Markt ist das Präparat Baypamun® (Bayer Vital Leverkusen). Dieser Paramunitätsinducer wird aus inaktivierten Parapoxviren des Schafes hergestellt. Sie wurden aus den Pusteln einer Dermatitis eines erkrankten Schafes isoliert und in 200facher Passage attenuiert. Jetzt wird das Virus auf bovinen Zellen vermehrt, durch γ -Strahlung inaktiviert und bei einer Vielzahl von Krankheitszuständen in der Tiermedizin eingesetzt (219, 161, 14). In-vitro konnte insbesondere die Interferon-induzierende Wirkung auf Rinder-, Schweine-, Pferde- und Hundezellen nachgewiesen werden. In Tierversuchen an Ratten und Pferden zeigte man die Inhibition stressinduzierter Kortisolanstiege, die zu einem Katabolismus von Zellen des Immunsystems führen, der wiederum in einer geschwächten Abwehrbereitschaft resultieren kann (14). Der Effekt wird durch verschiedene Epitope des Virus hervorgerufen und ist unabhängig von einer Erregermultiplikation (160).

Die unspezifische Stimulation des Immunsystems durch Baypamun® ist unbestritten, aber die Darstellung der Erfolge klinischer Versuchsreihen ruft starke Kritik hervor. Diese ist begründet in fehlenden Kontrolltieren, keiner doppelblinden Durchführung und Ergebnissen, die keine statistische Signifikanz aufweisen (89).

Erwünscht ist eine funktionsbezogene Aktivierung bei Krankheiten mit Störungen im Immunsystem (103). Da jedoch durch das Medikament nur der unspezifische Anteil des Immunsystems stimuliert wird, steht das Eintreten der erwarteten Wirkung in Frage. Hervorgerufen wird die paraspezifische Aktivität durch Struktureinheiten der Hüllproteine des verwendeten Virus. Bewirkt wird eine Lymphozytenproliferation und eine erhöhte Phagozytoseaktivität durch das mononukleäre Phagozytensystem ebenso wie eine Zytokinausschüttung insbesondere von IL 1, 2 und 12 sowie IFN α und γ als Mediatoren beim Abbau des viralen Materials. Es kann somit zu einer verbesserten Interaktion zwischen den verschiedenen Wegen im Netzwerk des Immunsystems kommen. Ein abgeschwächtes Immunsystem

wird kurzfristig in erhöhte Abwehrbereitschaft versetzt, die enge Verknüpfung zwischen dem unspezifischen und dem spezifischen Anteil des Immunsystems soll ausgenutzt werden (159, 75). Dies kann nur bei einem störungsfreien Funktionieren des paraspezifischen Anteils des Abwehrsystems funktionieren, der den phylogenetisch ältesten Teil des komplexen Immunsystems darstellt (157).

1991 behandelte Hörber 84 Katzen, die im ELISA positiv auf das feline Leukosevirus (FeLV) getestet worden waren, mit mehreren paramunisierenden Injektionen. Alle klinisch unauffälligen sowie 88,5 % der Katzen mit klinischen Symptomen wurden innerhalb eines Zeitraumes von sechs Wochen negativ im Sinne einer Virämie und blieben dies auch über den Beobachtungszeitraum von anderthalb bis zweieinhalb Jahren. Allerdings gab es in dieser Studie keine Ein- oder Ausschlusskriterien und keine Kontrolltiere, deshalb auch keine Randomisierung der Patienten (103). Eine orale Therapie von Katzen mit chronischer Stomatitis führte zu 42 % Heilung im Vergleich zu 13 % in der Kontrollgruppe (162).

Bei der Immundefizienz im Rahmen von Herpesvirusinfektionen der Katze konnte PIND-AVI mit gutem Erfolg eingesetzt werden (219, 23) und auch in der Mammatumorbehandlung der Hündin konnten Tumor- und Metastasenwachstum günstig beeinflusst werden (21). Jedoch handelt es sich bei der letzteren um keine randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie.

2.7.3 Rekombinantes felines Interferon ω (Virbagen® Omega)

Bei den Interferonen gibt es bei allen Wirbeltieren zwei Hauptklassen: Zu den Typ I-Interferonen gehören IFN α , IFN β , IFN δ , IFN ω und IFN τ , das einzige Typ II-Interferon ist IFN γ (13, 205).

Seit kurzem auf dem Markt ist ein Produkt aus rekombinantem felinem Interferon ω (Virbagen® Omega von Virbac). Dieses wird von Seidenraupen, die als Wirt für rekombinante Baculoviren dienen, hergestellt. Im Organismus wird IFN ω vom Trophoblasten produziert und kann zu den Reproduktionshormonen gezählt werden, da es die mütterliche Antwort auslöst, die zur Implantation des Embryos im Uterus führt. Das antivirale Wirkprinzip basiert darauf, dass Interferone sich auf spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran setzen und so eine Kette biochemischer Vorgänge auslösen, die die Zelle resistent gegen die Mehrzahl aller Viren machen. Der Hauptmechanismus liegt in der Umwandlung viraler genetischer Information in spezifische gegen das Virus gerichtete Eiweißstoffe wie die 2-5A-Synthetase, die

virale mRNA degradieren kann, und eine Proteinkinase, die die virale Proteinsynthese blockiert. So ist die Wirkung also nicht virusspezifisch, sondern basiert auf einer Verstärkung der unspezifischen Antwort über eine Hemmung der internen Synthesemechanismen der infizierten Zelle. Lymphozyten, NK-Zellen und auch neutrophile Granulozyten werden immunmodulatorisch aktiviert (13, 234).

In den zur Zulassung benötigten Studien konnte selbst bei zehnfacher Überdosierung kein toxischer Effekt festgestellt werden. Sowohl gesunde als auch klinisch an Parvovirose erkrankte Welpen zeigten keine auf die Therapie zurückzuführenden Veränderungen der Blutwerte, der biochemischen Parameter im Serum oder der Ergebnisse eines Myelogramms. Bei Hunden zeigten sich bei der Mehrzahl der Patienten keine Antikörper gegen das feline Protein innerhalb von vier Wochen nach der Therapie, auch wenn eins von 24 Tieren nach zehnfacher Überdosierung einen Monat nach der letzten Injektion spezifische Immunglobuline aufwies (234). Die Antigenität variiert von Spezies zu Spezies. Sie ist zwischen Hund und Katze nur sehr gering. Menschliches Interferon bewirkt bei der Ratte keinerlei Ausbildung von Antikörpern, bei Mäusen, Katzen und Rindern allerdings sind deutliche Anstiege spezifischer, zirkulierender Immunglobuline nachweisbar (211). Zugelassen ist das Präparat zum Einsatz bei der Parvovirose des Hundes. Eine Umwidmung zum Einsatz bei weiteren caninen, viralen Erkrankungen und auch für die Anwendung bei anderen Spezies wird bereits durchgeführt. Klinische Studien wurden aufgenommen (211). In Japan ist das Präparat schon seit vier Jahren unter dem Namen Intercat® mit der Indikation der feline Calicivirose im Handel und wird dort in vielen weiteren Indikationen eingesetzt (30 % Katzenschnupfen, 20 % allgemeine Prophylaxe, 14 % Parvovirose, 14 % FIV-FeLV). Gerade erfolgte auch dort die Zulassung für den Hund (211).

Studien an zehn experimentell mit Parvovirose infizierten Hunden sowie an 92 spontan erkrankten Tieren zeigten eine vierfach erhöhte Überlebenschance bei Einsatz von IFN ω zusätzlich zur unterstützenden Standardtherapie mit Rehydrierung, Antiemetika und Antibiotika. Auch die Genesung der überlebenden Hunde wurde ab Tag vier signifikant beschleunigt (60, 234).

In einer Studie an FeLV-positiven Katzen mit klinischer Symptomatik sank über zwei Monate bei IFN ω -Therapie die Sterblichkeitsrate signifikant von 75 % auf 36 %. Das Befinden der Patienten konnte durch verminderte Symptome von Begleiterkrankungen verbessert werden. Aktuelle Studien mit veränderten Therapieschemata laufen zur Zeit (156, 70).

Zwei Studien mit 14 und 160 Katzen mit Katzenschnupfensymptomatik konnten eine signifikante Verbesserung der Symptome Augenentzündung, Stomatitis, Nasenausfluss, Appetit und Kräftezustand ab Tag 7 nach Interferonbehandlung beweisen, wobei eine frühzeitige Erstbehandlung ab Tag 2 einer späteren Intervention erst ab Tag 4 deutlich überlegen ist (60).

2.7.4 Immunstimulierende Tumorthherapie

Neben Ansätzen, das Immunsystem des Gesamtorganismus in unspezifische, verstärkte Aktivität zu versetzen, muss zur Tumorthherapie lokal am Ort der Neoplasie ein Stimulus gesetzt werden, um durch den Tumor provozierte Zellanergien zu überwinden (25). Hierzu kann ein unspezifisches entzündungsinduzierendes Signal ausreichend sein, um die körpereigene Abwehr anzulocken. Listerien z. B. sind geeignet, eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, in deren Rahmen vorher tolerierte tumorassoziierte Antigene jetzt als Abwehr-auslösende erkannt werden und das Immunsystem in einen Wachsamkeitszustand versetzt wird (183). Der Nachweis, dass auch ein viraler Vektor ohne Transgen in einem Drittel der Fälle zur Wachstumshemmung eines Malignoms führt, zeigt den adjuvanten Effekt der Entzündung (196, 256). Sogar die Expression eines Fremdproteins nach Gentransfer, das keinerlei eigene therapeutische Potenz besitzt, führt im Zuge der Immunantwort zu einer Tumorregression (223). Der spezifische Effekt allerdings wird durch unterschiedliche Ansätze mit verschiedenen Zytokinen erreicht. Dieser Nachweis lässt sich erbringen, wenn gleichzeitig mit dem Zytokinen-transportierenden Vektor Antikörper verabreicht werden, die das produzierte Interleukin neutralisieren, sodass es seine Wirkung nicht entfalten kann (25). Für induzierte immunstimulierende Zytokine gibt es vielerlei Ansätze: Neben Interleukinen (IL 1, IL 2, IL 6, IL 7, IL 10, IL 12) und Interferonen (IFN α , IFN γ , IFN ω) werden auch Koloniestimulierende Faktoren (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), TGF β oder der Tumornekrosefaktor eingesetzt (41, 184).

Die Produktion von TNF kann auch in großen Mengen induziert werden durch den Einsatz in die Läsion injizierter Zellwandbestandteile von Mykobakterien, was bei verschiedenen Tumorarten zu guten Resultaten führt (131, 233). Insbesondere beim Hund wurden sowohl Myko- als auch Corynebakterien im Einsatz in der Onkologie, hauptsächlich in der Therapie des malignen Melanoms, erprobt (55).

2.7.5 Immunmodulation beim feline Fibrosarkom

Unspezifische Immunmodulationen mit bakteriellen Mischvakzinen oder Levamisol wurden in Einzelfällen ausprobiert, blieben aber ohne nachgewiesene Wirksamkeit (180). Bei Behandlung mit dem Polysaccharid Acemannan zeigten fünf von sieben Tieren eine klinische Verbesserung durch eine verminderte Tumorgröße und eine verlängerte Überlebenszeit (87).

Humanes, rekombinantes IL 2 sezernierende Zellen wurden siebenmalig peritumoral injiziert, wonach zwei von 16 Katzen ein Rezidiv und drei Metastasen ausbildeten. Elf von 16 Kontrollkatzen blieben nicht rezidivfrei, und die mittlere Überlebenszeit war mit acht Monaten in dieser Gruppe halbiert im Vergleich mit den behandelten Katzen (198). Ogilvie hält diesen Therapieansatz aufgrund der Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle und der Gefahr einer Anaphylaxie für nicht empfehlenswert und kritisiert weiterhin die geringe untersuchte Gruppengröße (180).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

Siehe auch Kapitel 12.1 Allgemeine Angaben zu Material und Reagenzien

Vollständige Dokumentation im Laboratory Notebook n° 201 vom 16.01.01 des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München und im Cahier de laboratoire n° 2540 MMH (Marei Müller-Heidelberg) 01001 vom 01.10.01 von TRANSGENE SA (société anonyme / Aktiengesellschaft)

3.1.1 Studiendesign

In den Tierkliniken der LMU München wird in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München seit Mai 1999 eine Gentherapie-studie durchgeführt. In dieser prospektiven, randomisierten, Placebo-kontrollierten und doppelblinden Untersuchung wurden zu Beginn nach chirurgischer Entfernung des Fibrosarkoms fünf Injektionen rekombinanter Adenoviren in das Tumorbett vorgenommen, die die Gene des humanen IL 2 oder des felines IFN γ tragen (siehe auch Kapitel 2.1.4 Adenoviren in der Gentherapie). Der chirurgische Eingriff fand an Tag 1 statt, die Injektionen erfolgten an den Tagen 1, 2, 3, 6 und 7. Nach einer Dosisfindungsstudie mit einer Kombination beider Vektoren (siehe auch Doktorarbeit Susanne Wieland: Klinische Phase I-Studie zur gentherapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferon γ als adjuvante Behandlung des felines Fibrosarkoms) wurde eine Untersuchung an einem größeren Kollektiv in vier Therapiegruppen (AdhuIL 2, AdfeIFN γ , AdhuIL 2 + AdfeIFN γ , Kontrollgruppe) durchgeführt (siehe auch Tabelle 1: Übersicht über die vier Therapiegruppen (Tierzahl, Vektoren und Dosis) der Phase II der Zytokingentherapie nach Injektion rekombinanter Adenoviren ins Tumorbett), wobei aus Gründen nicht tolerabler Toxizität die Gruppe, die ausschließlich die Interleukingen-tragenden Viren erhielt, vorzeitig nach der Behandlung von sechs Tieren abgebrochen werden musste (siehe auch Doktorarbeit Jenny Ludwig (in Vorbereitung): Phase II-Studie einer adjuvanten immunstimulierenden Gentherapie nach chirurgischer Entfernung feline Fibrosarkome).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In einer folgenden Studie wurde die Applikationsart geändert, und der Gentransfer wurde präoperativ intratumoral eingesetzt. Hier erfolgten zwei Vektorapplikationen an den Tagen –7 und –1 sowie die chirurgische Intervention an Tag 1. Auch hier folgte auf die Dosisfindung in einer Phase I-Studie (siehe auch Doktorarbeit Kathrin Wiedmann) der Einsatz bei größeren Tierzahlen in einer Phase II-Studie.

Alle Kontrolltiere wurden ausschließlich chirurgisch versorgt, sie erhielten aus Gründen der Risikominimierung in bezug auf eine Fibrosarkombildung infolge Trauma und lokaler Entzündung keinerlei Injektion des Lösungsmittels oder gar leerer Adenoviren. Alle Patienten wurden in den gleichen Ställen untergebracht, in jeder Studie von den gleichen beiden Tierärzten versorgt, vom gleichen Chirurgen operiert und von der gleichen Person gentherapeutisch behandelt. So wurden möglichst viele externe Einflüsse ausgeschlossen, und die Ergebnisse sind von Tier zu Tier vergleichbar.

Therapiegruppe	huIL 2	feIFN γ	huIL 2 + feIFN γ	Kontrolltiere
AdhuIL 2 (AdTG 6624)	5 x 10 ⁸ i. u.	-	5 x 10 ⁸ i. u.	-
AdfeIFN γ (AdTG 13273)	-	5 x 10 ⁸ i. u.	5 x 10 ⁸ i. u.	-
Ad^o (ohne Transgen) (AdTG 6401)	5 x 10 ⁸ i. u.	5 x 10 ⁸ i. u.	-	-

Tabelle 1: Übersicht über die vier Therapiegruppen (Tierzahl, Vektoren und Dosis) der Phase II der Zytokingentherapie nach Injektion rekombinanter Adenoviren ins Tumorbett

Der in unserer Studie verwandte Vektor ist ein Adenovirus vom Typ 5 der Gruppe C, der unter der Kontrolle des humanen Zytomegalievirus (CMV)-Promoters steht. Die E1-Region ist von Nukleotid 455 bis 3328 entfernt worden, die E3-Deletion erfolgte zwischen den Nukleotiden 28593 und 30470 (nach der Nomenklatur von Chroboczek (37)). Die Viren wurden auf Zellen vom Typ 293 produziert und über einen zweistufigen Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt. 2 x 10⁶ i. u. des Vektors wurden auf RCA-Bildung negativ getestet. Der huIL 2-tragende Vektor trägt die Bezeichnung AdTG 6624, das Virus mit feIFN γ ist mit AdTG 13273 nummeriert. AdTG 6401 ist ein sog. „leeres“ Adenovirus ohne Transgen, das bei den Injektionen dazu dient, allen Tieren die gleiche Virusmenge zu applizieren unabhängig davon, welches therapeutische Gen oder welche Kombination derselben sie erhalten (siehe auch Abbildung 4: Struktur der in der Studie verwendeten Vektoren).

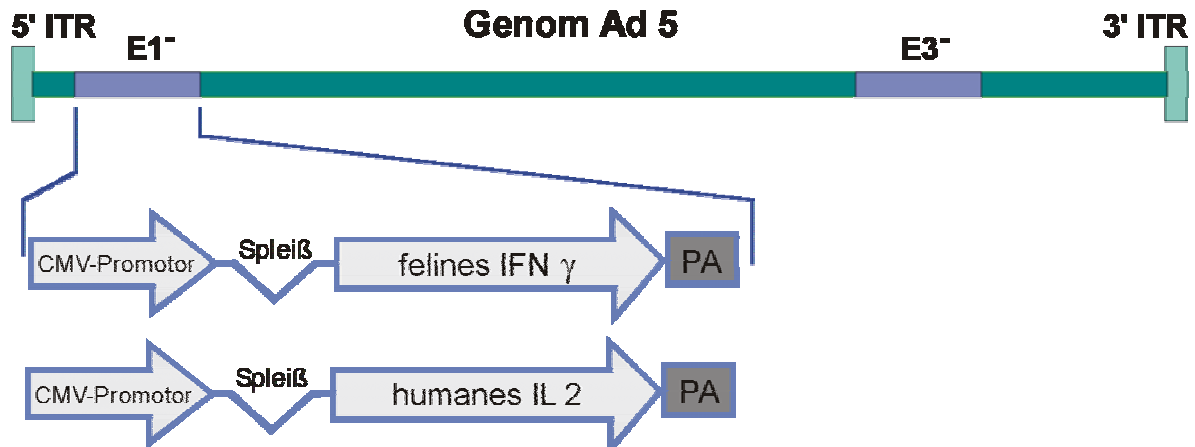


Abbildung 4: Struktur der in der Studie verwendeten Vektoren (CMV - Zytomegalievirus, ITR - inverted terminal repeats, PA - Polyadenylierungssignal)

3.1.2 Gewinnung, Transport und Lagerung der untersuchten Proben

Von allen postoperativ behandelten Katzen wurden Proben der Tage 0, 2, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270 und 360 der Studie untersucht, sofern sie vorhanden waren. Einige Proben sind in der Klinik, auf dem Transport oder bei TRANSGENE SA verloren gegangen, konnten aber häufig durch das in München eingefrorene Doppel ersetzt werden. Nach Auftreten eines Rezidivs wurden die Kontrolluntersuchungen normalerweise abgebrochen, sodass keine Proben mehr verfügbar waren.

Der Versand der Proben nach Straßburg erfolgte als gefrorenes Serum in einer Isolierbox auf Trockeneis über ein Pakettransportunternehmen oder durch persönlichen Transport, bevor sie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und über einen Zeitraum von einigen Wochen bis zu zwei Jahren gelagert wurden. Die Proben wurden dann ca. 24 h vor den Untersuchungen in den ELISAs und im Neutralisationstest wieder aufgetaut. Alle Proben wurden nach den Untersuchungen nach 48 h Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wieder eingefroren. Seren, die als Kontrollseren dienten, wurden mit $1/100\text{ NaN}_3$ versetzt, sodass die Atmungskette eventueller Kontaminanten inhibiert wurde und ein verschlossenes Aufbewahren im Kühlschrank möglich war.

Ein doppeltes oder sogar dreifaches Untersuchen aller Proben wäre aus Gründen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wünschenswert gewesen. Da allerdings ca. 1000 Proben zu untersuchen waren und nur eine begrenzte Zeit in den Laboren von TRANSGENE SA, ein

begrenzter Materialetat und z. T. auch nur geringe Probenmengen zur Verfügung standen, wurde standardmäßig jede Probe in jedem Test zunächst nur einmal in allen angegebenen Verdünnungsstufen untersucht. Alle im Vergleich mit dem Durchschnitt der Proben unerwarteten Ergebnisse, extreme oder unerklärliche Werte wurden dann im Anschluss doppelt wiederholt, sodass drei einzelne Ergebnisse vorlagen. Alle Serumproben von Tag 2 wurden von vorneherein gedoppelt oder getripelt auf ihre Interleukinkonzentrationen untersucht.

Alle vorliegenden Proben eines Tieres wurden gleichzeitig aufgetaut und sowohl auf die IL 2-Konzentration wie auch auf das Vorliegen von Antikörpern gegen den Vektor und das Transgen sowie auf deren Neutralisationsfähigkeit geprüft.

Bei den präoperativ intratumoral behandelten Katzen wurde Blut an den Tagen -14, -7, -6, 0, 2, 14, 45 und 90 entnommen. Von 16 behandelten Tieren wurden diese Serumproben zusätzlich untersucht, um einen Vergleich der beiden Applikationswege im Hinblick auf die Transgenexpression und die antiadenovirale Abwehr durchführen zu können.

Der Versand der Proben erfolgte als gefrorenes Serum in einer Isolierbox auf Trockeneis. Sie wurden am Tag der Untersuchung oder am Tag vor der Untersuchung einmalig aufgetaut. Es erfolgte eine Messung der IL 2-Konzentration sowie ein Neutralisationstest auf antiadenovirale Antikörper.

3.1.3 TRANSGENE SA

Die Biotechnologiefirma TRANSGENE SA mit Sitz in Straßburg arbeitet zur Zeit mit drei viralen Vektoren (Adenoviren, Vacciniaviren, Retroviren), zellulären Transportsystemen und synthetischen Vektoren. Ihr Arbeitsschwerpunkt liegt in der immunstimulierenden, onkologischen Therapie durch Transfer von Zytokinen oder Tumorantigenen. Aber auch die Forschung im Bereich angeborener genetischer Defekte wie der zystischen Fibrose (CF) oder der Muskeldystrophie (Duchenne's muscular dystrophy (DMD)) wird vorangetrieben.

Alle von mir durchgeführten Untersuchungen wurden in den Laboratorien von TRANSGENE SA, Strasbourg, durchgeführt. Diese entsprachen ausschließlich dem S2-Standard (Sicherheitsstufe 2).

3.1.4 Interleukin 2-Konzentration

Siehe auch Kapitel 12.2 Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Serum

3.1.4.1 Material

Zur Bestimmung des IL 2-Spiegels im Serum wurde der von R&D-Systems, Minneapolis, kommerzialisierte ELISA-Testkitt „QUANTIKINE® human IL-2“ genutzt, mit dem sich natürliches und rekombinantes IL 2 in Zellkulturüberständen sowie im Serum oder Plasma bestimmen lässt. Kreuzreaktionen mit verschiedenen humanen Interleukinen, huGM-CSF, huTGF oder huTNF ebenso wie mit murinen Interleukinen werden vom Hersteller ausgeschlossen.

Die ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen in acht Zeilen à zwölf Reihen ist aus Polystyren und ist beschichtet mit monoklonalen interleukinbindenden Antikörpern. Das im Testkitt enthaltene rekombinante, humane Interleukin wurde von Escherichia coli (E. coli) exprimiert. Die Antikörper gegen huIL 2 sind gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase (HRPO)). Die Verdünnungslösung RD 1 A besteht aus einer gepufferten Eiweißlösung mit Konservierungsstoffen, das Reagenz RD 6 E ist haltbar gemachtes, tierisches Serum. Als Farbstoff wird Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet, die Reaktion wird mit Schwefelsäure (2N) beendet. Als Waschlösung wird PBS mit 10 mM EDTA und 0,1 % Tween 20 verwendet.

Das Photospektrometer arbeitet mit dem DOS-basierten (disc operating system) Programm GENESIS und nimmt die Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm vor.

3.1.4.2 Methode

Alle verwendeten Reagenzien wurden vor Untersuchungsbeginn auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden nach Anbruch maximal einen Monat lang trocken bei 4 °C gelagert. Die Standardlösung mit rekombinantem huIL 2 in einer Konzentration von 2000 pg / ml wurde bei -20 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde jeweils frisch aufgetaut und dann in einer siebenfachen Verdünnungsreihe auf Standardkonzentrationen von 1000 pg / ml, 500 pg / ml,

250 pg / ml, 125 pg / ml, 62,5 pg / ml, 31,25 pg / ml und 15,625 pg / ml gebracht. Die Serumproben wurden in den meisten Fällen am Vortag aufgetaut, im Kühlschrank gelagert und in einer Verdünnung von 1 : 4 untersucht. Bei nach oben aus dem Messbereich herausragenden Werten wurde die Verdünnungsstufe erhöht, bei sehr niedrigen Werten in fraglichen Fällen wurde auch unverdünntes Serum eingesetzt.

Eine Lagerung der Proben in aufgetautem Zustand im Kühlschrank beeinflusst die gemessenen Interleukinwerte nicht. Auch nach sechs Wochen unterscheiden sich die Ergebnisse nicht von denen einer frisch aufgetauten Serumprobe.

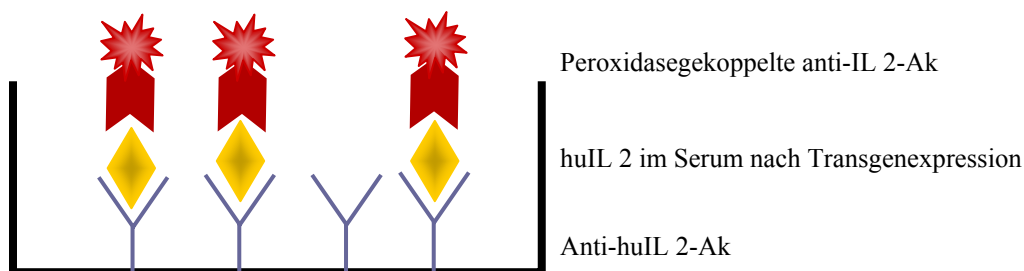


Abbildung 5: Schema der ELISA-Komponenten: IL 2-Konzentration

Dieser Test arbeitet nach der Methode des quantitativen, kolorimetrischen Sandwich-ELISA: Die 96-Loch-Platte mit flachem Boden ist beschichtet mit monoklonalen, unmarkierten, murinen Anti-huIL 2-Antikörpern. Nach Zugabe des Katzenserums bindet sich innerhalb einer Inkubationszeit das durch das Transgen exprimierte humane IL 2 an die Antikörper, verbleibende Reste werden abgewaschen. Als nächstes werden polyklonale anti-huIL 2-Ak benutzt, die wiederum das Interleukin erkennen, aber gegen andere Epitope gerichtet sind. Sie sind peroxidasegekoppelt, sodass nach Zugabe sowohl von Wasserstoffperoxyd als auch eines Farbstoffes eine Reaktion beginnt, die in einer Blaufärbung der Probenvertiefungen resultiert (siehe auch Abbildung 5: Schema der ELISA-Komponenten: IL 2-Konzentration). Abhängig davon, wie viele polyklonale Antikörper gebunden sind, fällt die Farbreaktion intensiver oder schwächer aus. Durch Zugabe von Schwefelsäure kann die Reaktion gestoppt werden, die Blaufärbung verwandelt sich in eine unterschiedlich starke Gelbfärbung (siehe auch Abbildung 6: ELISA-Platte: IL 2-Konzentration im Serum).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Test ist hochspezifisch, da Antigene, die mit dem ersten Antikörper kreuzreagieren, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht auch noch an den zweiten binden. So können Zytokine mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit quantifiziert werden.

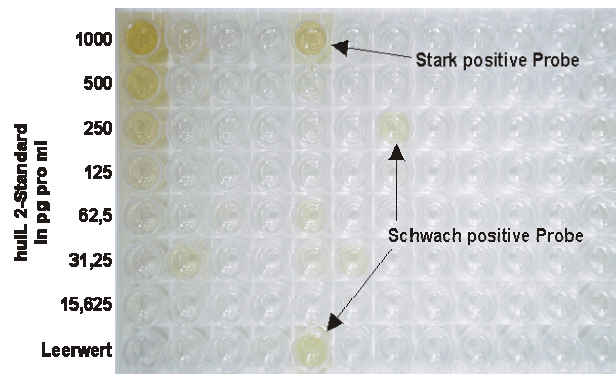


Abbildung 6: ELISA-Platte: IL 2-Konzentration im Serum

Ein Photospektrometer ermittelt bei einer Wellenlänge von 340 nm die Farbintensität. Aus den bekannten Werten der Vertiefungen der Platte, die die Standardlösung in Konzentrationen zwischen 15 pg / ml und 1000 pg / ml beinhalten, wird eine Standardkurve errechnet, anhand derer alle unbekannt Werte der Proben ermittelt werden können. Diese Aufgabe übernimmt das Computerprogramm. Abbildung 7 zeigt die optische Dichte (y-Achse) in Abhängigkeit von der Interleukinkonzentration (x-Achse).

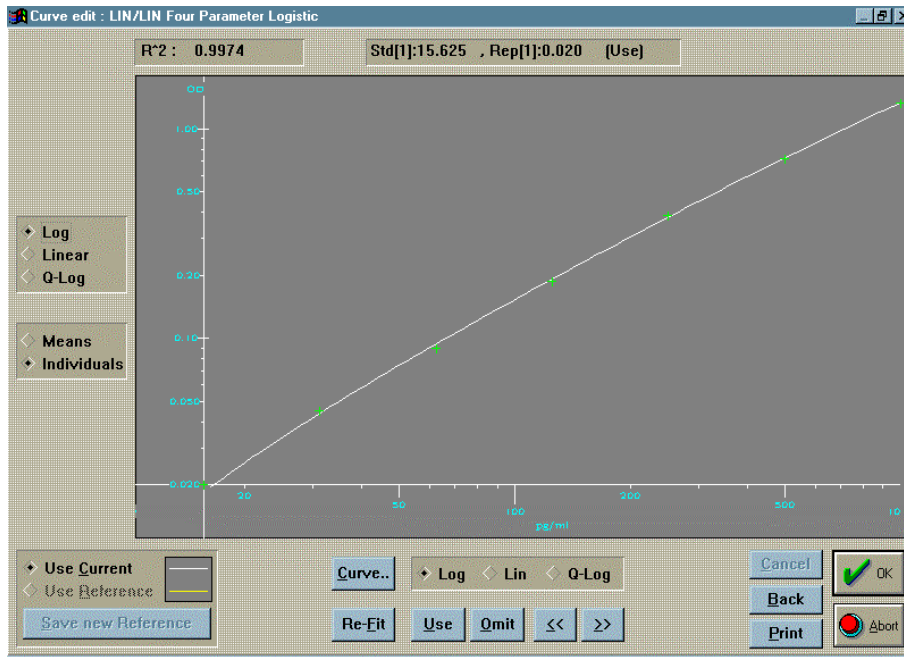


Abbildung 7: Vom Programm Genesis aus den Werten der IL 2-Standardlösung erzeugte Standardkurve (x-Achse: Interleukinkonzentration, y-Achse: optische Dichte)

3.1.5 Antikörper gegen Interleukin 2

Siehe auch Kapitel 12.3 Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline G und Kapitel 12.4 Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline M

3.1.5.1 Material

Es wurden ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen und flachem Boden ausgewählt, die eine besonders hohe Absorptionskapazität besitzen (Nunc-Immuno MaxiSorp® von Nalge Nunc International, Rochester). Der flache Boden ist in allen Fällen der spektrometrischen Messung essentiell, um nicht durch gewölbte Strukturen die Lichtbrechung zu verändern und somit eine korrekte Messung zu verhindern.

Proleukin® ist rekombinantes humanes IL 2 (Wirkstoffname Aldesleukin) der Firma Chiron, Amsterdam, das von E. coli exprimiert wurde. Das lyophilisierte Reagenz wurde mit 1,1 ml NaCl 0,9 % rekonstituiert (pH 7,5), sodass es in einer Konzentration von 1 mg / ml vorlag. Es

wurde aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mehrere Wochen gelagert. Als nicht wirksame Bestandteile sind Mannitol, Natriumdodekylsulfat und Puffersalze wie Natriumphosphate enthalten.

Als Waschlösung wird PBS mit 10 mM EDTA und 0,1 % Tween 20 verwendet.

Als Kontrollseren wurden Blutproben von Katzen verwandt, die in Lyon im Rahmen einer Toxizitätsstudie huIL 2-Injektionen erhalten hatten. Das Serum stammt von den Katzen mit den Nummern 9721 und 9724 von Tag 24 nach Beginn der Studie. Es zeigt eine stark positive Reaktion bei der Untersuchung auf anti-huIL 2-Ak und wurde in einer Verdünnungsreihe von 1 : 50 bis 1 : 3200 im Nachweisversuch für Ig M sowie in Stufen von 1 : 3000 bis 1 : 192000 zur Ig G-Suche auf jeder Platte verwendet. Die starke Verdünnung war nötig, um eine klare Farbabstufung zu erreichen. Als Negativkontrolle diente Serum von Mäusen, die noch nie Kontakt mit humanem Interleukin hatten (POOL OF1 und C57 BI 6).

Das Photospektrometer arbeitet mit dem DOS-basierten Programm GENESIS und nimmt die Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm vor.

3.1.5.2 Methode

Am Vorabend des Versuches müssen ELISA-Platten mit rekombinantem Interleukin beschichtet werden. Über Nacht wird dieses durch die hohe Absorptionsfähigkeit der Platten fest gebunden und kann auch durch mehrfache Waschvorgänge nicht mehr abgelöst werden. Diese spülen nur ungebundenes IL 2 ab.

Im nächsten Schritt werden evtl. freigebliebene Stellen der ELISA-Platte mit bovinem Serumalbumin besetzt, um auszuschließen, dass Serumbestandteile direkt mit der Platte interagieren könnten.

Bei der nachfolgenden Zugabe des Katzenserums binden also möglicherweise vorhandene feline anti-huIL 2-Ak an das auf der Platte fixierte Interleukin. Jedes Serum wurde in den Verdünnungsstufen 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 und 1 : 400 getestet. Überreste werden wiederum abgewaschen. Zur Sichtbarmachung werden peroxidasegekoppelte Immunglobuline verwendet, die spezifisch an Katzen-Ig G oder Ig M binden und in Ziegen generiert wurden. Trotz einer Verdünnung der anti-Ig G-Ak von 1 : 5000 müssen die anti-Ig M-Ak noch vier mal stärker verdünnt werden, um keine unspezifische und in jedem Fall positive Antwort zu

erhalten. Die Anti-Immunglobulin-Antikörper reagieren in der Nachweisreaktion mit TMB und H_2O_2 mit einer Blaufärbung, die sich quantifizieren lässt (siehe auch Abbildung 8: Schema der ELISA-Komponenten: Antikörper gegen Interleukin 2). Abhängig davon, wie viele polyklonale Antikörper gebunden sind, fällt die Reaktion intensiver oder schwächer aus. Durch Zugabe von Schwefelsäure kann die Reaktion gestoppt werden, die Blaufärbung verwandelt sich in eine unterschiedlich starke Gelbfärbung.

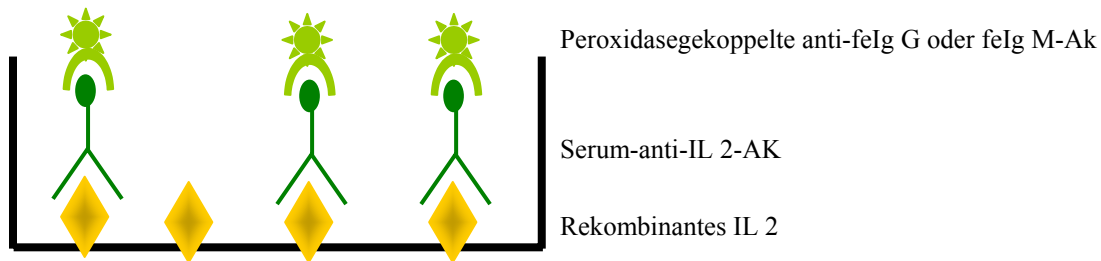


Abbildung 8: Schema der ELISA-Komponenten: Antikörper gegen Interleukin 2

Um auszuschließen, dass der Ig G-Test durch unspezifischen Nachweis von Ig E verfälscht wird, wurden zehn Proben von Katzen, die an Tag 30 oder 60 in der IL 2-Gruppe bzw. an Tag 180 oder 270 in der IL 2 + IFN γ -Gruppe hochpositiv auf Ig G getestet worden waren, 20 min lang auf 56 °C erhitzt, sodass sichergestellt war, dass alle möglicherweise vorher vorhandenen Ig E nun zerstört waren.

Eine Lagerung der Proben in aufgetautem Zustand im Kühlschrank beeinflusst die gemessenen Antikörpertiter nicht. Auch nach sechs Wochen unterscheiden sich die Ergebnisse nicht von denen einer frisch aufgetauten Serumprobe.

3.1.6 Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper

Siehe auch Kapitel 12.5 Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline G und Kapitel 12.6 Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline M

3.1.6.1 Material

Es wurden ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen und flachem Boden ausgewählt, die eine besonders hohe Absorptionskapazität besitzen (Nunc-Immuno MaxiSorp® von Nalge Nunc International, Rochester).

Die verwendeten inaktivierten Viren waren unter der Nummer 14682 von TRANSGENE SA hergestellte rekombinante Adenoviren mit der β -Galaktosidase als Transgen. Sie wurden am 14.09.2000 titriert auf $3,3 \times 10^{12}$ tp / ml. Es wurden als Ersatz auch „leere“ Adenoviren (ohne Transgen) eingesetzt mit 5×10^{12} tp / ml oder 2×10^{11} i. u. / ml (Nummer 15149 vom 28.09.2001).

Als positives Katzenkontrollserum dienten Proben der Katze Nummer 22 unserer Studie von Tag 30 nach der Operation. Diese wurden im Vorhinein als positiv getestet. Negatives Kontrollserum stammte von Katzen aus einem Toxizitätsversuch aus Lyon, die mit IL 2 immunisiert worden waren, aber keinen Adenoviruskontakt hatten (Katze Nummer 9721 und 9724 am Tag 24 der Studie).

Die peroxidasegekoppelten Nachweisantikörper stammten aus der Ziege und wurden im Rahmen der Untersuchung auf antiadenovirales Ig G 1 : 5000, im Zuge der anti-Ig M-Versuche auf 1 : 20000 verdünnt.

Als Waschlösung wurde PBS mit 10 mM EDTA und 0,1 % Tween 20 verwendet.

Das Photospektrometer arbeitet mit dem DOS-basierten Programm GENESIS und nimmt die Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm vor.

3.1.6.2 Methode

Am Vortag wurden ELISA-Platten mit inaktivierten Adenoviren beschichtet. Hierzu wurden zwei verschiedene rekombinante Vektoren verwendet. In parallel laufenden Platten wurde immer wieder verglichen, dass Beschichtungen an unterschiedlichen Tagen, unterschiedlich lange Lagerungszeiten gut verpackt bei 4 °C und verschiedene Adenoviren mit und ohne Transgen dieselben Ergebnisse erbrachten.

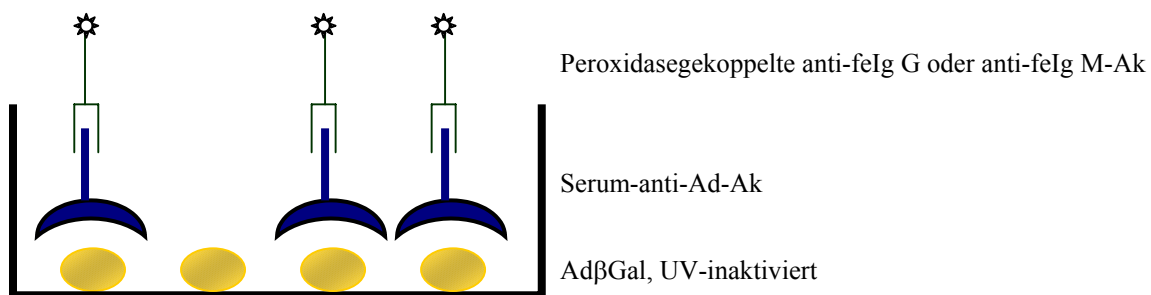


Abbildung 9: Schema der ELISA-Komponenten: Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper

Es erfolgt eine Absättigung mit 3 %iger BSA-Lösung (bovines Serumalbumin), um alle möglichen Bindungsstellen der Platte zu besetzen. Die Viren werden von den im Serum enthaltenen Antikörpern erkannt. Nach der spezifischen Bindung werden Restbestandteile des Katzenserums abgewaschen. Zum Nachweis der feline Immunglobuline werden in der Ziege generierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch entweder Katzen-Ig G oder Katzen-Ig M erkennen und daran binden (siehe auch Abbildung 9: Schema der ELISA-Komponenten: Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper). Durch ihre Kopplung an die Meerrettichperoxidase kann über die Farbreaktion mit TMB eine Bestimmung der Anzahl gebundener anti-feIg G/M-Ak vorgenommen werden, die proportional zur Menge im Patientenserum vorhandener antiadenoviraler Antikörper ist. Die Blaufärbung entsteht allmählich und wird zu dem Zeitpunkt durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wenn die Verdünnungsreihe der Positivkontrolle eine deutliche Farbabstufung von dunkelblau zu farblos aufweist. Hierdurch entsteht die Gelbfärbung der Probenvertiefungen mit positivem Ergebnis (siehe auch Abbildung 10 (links) und Abbildung 11 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig G, vor und nach Beenden der Nachweisreaktion).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Sowohl Kontroll- als auch Probenseren wurden in sieben Verdünnungsstufen von 1 : 50 bis 1 : 3200 untersucht. Eine Lagerung der Proben in aufgetautem Zustand im Kühlschrank beeinflusste die gemessenen Antikörperspiegel. Sie sanken nach sechs Wochen um über 50 % ab.

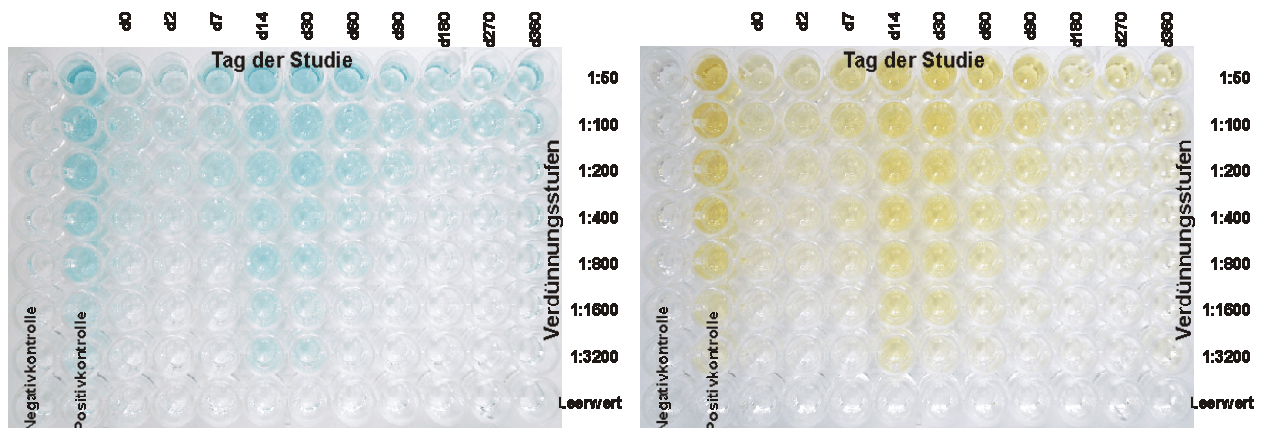


Abbildung 10 (links) und Abbildung 11 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig G, vor und nach Beenden der Nachweisreaktion, jeweils Katze Nummer 31

3.1.7 Neutralisierende antiadenovirale Antikörper

Siehe auch Kapitel 12.7 Versuchsprotokoll Neutralisationstest

3.1.7.1 Material

PER.C6®-Zellen sind humane, embryonale Retinazellen. Sie werden in Kultur gehalten in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) inkl. 10 % FCS (fetal calf serum). Die Besonderheit liegt in ihrem Bedarf an Magnesium, sodass 10 mM MgCl₂ supplementiert werden (61). Die Zellen wurden gefroren zur Verfügung gestellt und befanden sich in der 40. Passage. Sie wurden maximal bis Passage 50 verwendet (Einfriermedium: DMEM + 20 % FCS + 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)). Bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 95 % ruhten sie ohne Medienwechsel im Brutschrank, dann wurden sie passagiert oder im

Neutralisationstest infiziert (siehe auch Abbildung 12: PER.C6®-Zellkultur, Vergrößerung 200fach).

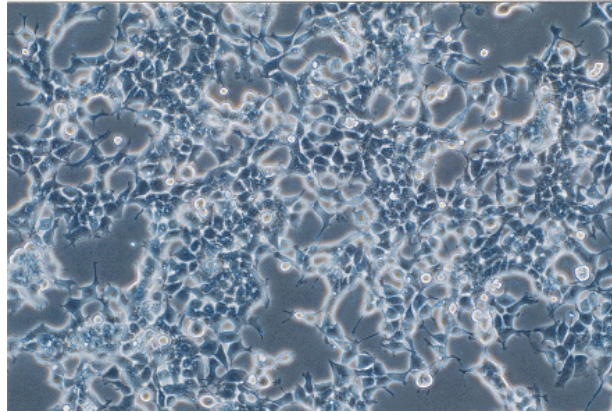


Abbildung 12: PER.C6®-Zellkultur, Vergrößerung 200fach

Die verwendeten Viren waren unter der Nummer 14682 von TRANSGENE SA hergestellte rekombinante Adenoviren mit der β -Galaktosidase als Transgen. Sie wurden am 14.09.2000 titriert auf $3,3 \times 10^{12}$ tp / ml oder $1,8 \times 10^{11}$ i. u. / ml und danach eingefroren.

Zur Kontrolle wurden einerseits Vertiefungen mit Zellkulturen ohne Zugabe von Serum infiziert (Negativkontrolle = maximale Infektion, da keine neutralisierenden Antikörper) oder ohne Zugabe von Viren inkubiert (Positivkontrolle = keine Infektion), andererseits dienten als Kontrollseren Proben einer mit Adenoviren infizierten Maus (Positivkontrolle = keine Infektion aufgrund neutralisierender Antikörper) und einer SPF-Katze (spezifisch pathogenfrei) ohne Kontakt zu Adenoviren (Negativkontrolle = maximale Infektion, da keine neutralisierenden Antikörper).

Als Substrat der β -Galaktosidase wurde 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid (MUG) eingesetzt. Die Messung erfolgte bei einer anregenden Wellenlänge von 340 nm und einer Messung des abgestrahlten Lichtes bei 460 nm über ein Photospektrometer und wurde mit dem Programm System Victor, Wallach, ausgewertet.

3.1.7.2 Methode

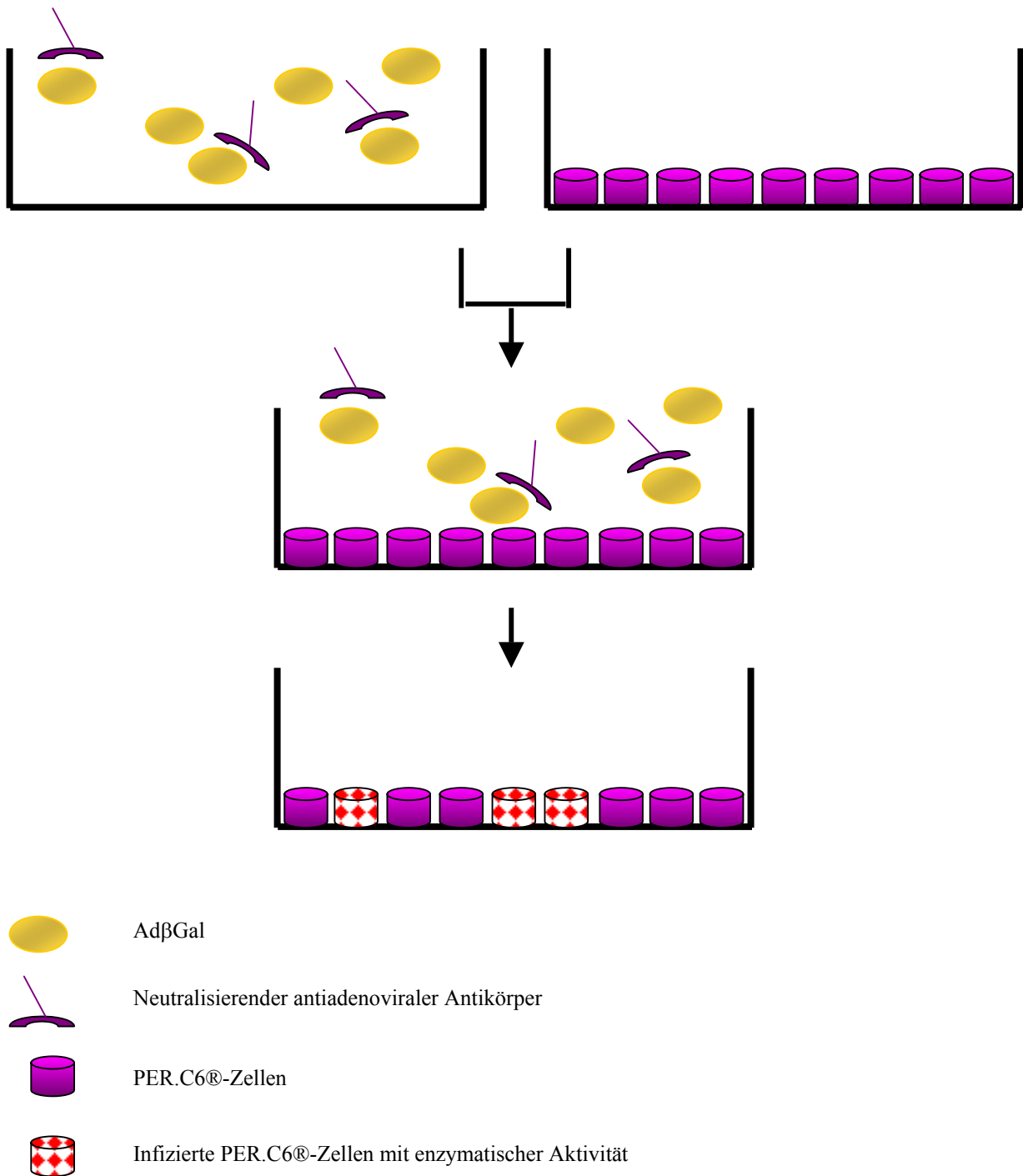
PER.C6®-Zellkulturen werden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % – 90 % inkubiert. Am Vortag der Durchführung des Neutralisationstests müssen sie trypsiniert werden, um sie in bekannter Zellzahl auf Versuchsplatten mit 96 Probenvertiefungen auszusäen.

Dazu wird das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen, um vorhandene Proteasen, die als Inhibitoren des nachfolgenden Trypsins agieren können, zu entfernen. Nach Lösung der Zellen voneinander und aus der Kulturflasche wird das Trypsin durch Zentrifugation wieder entfernt, um den erneuten Anheftungs- und Wachstumsprozess nicht zu stören. Nach erneutem Aussäen von 60000 PER.C6® pro Vertiefung ist eine Ruhephase von ungefähr 30 Stunden erforderlich, um eine höchstmögliche Adhäsion der Zellen zu erreichen.

Bevor am nächsten Tag die eigentliche Infektion der Zellen erfolgt, müssen die im Serum vorhandenen Antikörper die Möglichkeit erhalten, die Viren zu erkennen, daran zu binden und sie zu neutralisieren. Wenn hierdurch eine effiziente Verhinderung einer Infektion der Zellen hervorgerufen wird, ist das Vorhandensein neutralisierender Antikörper nachgewiesen.

Infektiöse Adenoviren mit dem Transgen β -Galaktosidase werden also für eine Stunde mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Katzenserums inkubiert. Mit dieser Mischung wiederum werden darauf folgend die Zellen konfrontiert und somit evtl. infiziert. Alle Seren wurden in Verdünnungen zwischen 1 : 50 und 1 : 1600 getestet. Ein Erhitzen des Serums auf 70 °C zur Dekomplementierung ist bei Katzen nicht erforderlich. Als Kontrolle dienten einerseits Vertiefungen, in denen Viren ohne Serumkontakt zur Zellinfektion zum Einsatz kamen und Zellkulturen, die nur mit BSA in Berührung kamen, und andererseits wiederum Serum von Katzen, die im Versuchstierlabor keinen Viruskontakt hatten und somit keine Antikörper ausbilden konnten sowie Serum von Mäusen, die mit Adenoviren immunisiert worden waren. So sind vier verschiedene Kontroll- und Vergleichsmöglichkeiten in verschiedenen Verdünnungsschemata für die Auswertung vorhanden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN



**Abbildung 13: Schema der aufeinander folgenden Arbeitsschritte:
Neutralisierende antiadenovirale Antikörper**

Eine Beurteilung der Anzahl infizierter Zellen erfolgt am nächsten Tag durch Lyse der Zellen und Messung der β -Galaktosidase-Aktivität nach Substratzugabe (siehe auch Abbildung 13: Schema der aufeinander folgenden Arbeitsschritte: Neutralisierende antiadenovirale Antikörper). 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid (MUG) ist ein fluoreszierendes Substrat der

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

β -Galaktosidase und wird von Licht der Wellenlänge 340 nm angeregt, Licht der Wellenlänge 460 nm abzustrahlen. Wenn man vom Wert der enzymatischen Aktivität der Probe und der maximalen Infektion den Grundwert nicht-infizierter Zellen abzieht und die beiden ins Verhältnis zueinander setzt, erhält man den Prozentsatz erfolgter Infektion. Der zu 100 % fehlende Anteil entspricht dem Ausmaß der Neutralisation durch die untersuchte Probe.

$$\text{Neutralisation in \%} = 100 - \frac{(\text{enz. Akt. der Probe} - \text{enz. Akt. nicht-infizierter Zellen})}{(\text{enz. Akt. der max. infizierten Zellen} - \text{enz. Akt. nicht-infizierter Zellen})} \times 100$$

enz. Akt. = enzymatische Aktivität

Zur Visualisierung ist auch eine Anfärbung der Zellen mit X-Gal möglich, sodass man unter dem Mikroskop eine Zählung infizierter Zellen vornehmen kann. Dies ist anschaulicher, aber ungenauer und ungleich zeitaufwendiger, sodass es nur bei jeder 16. Platte zur Bestätigung der photospektrometrischen Messung durchgeführt wurde. Hierzu werden die Zellen nach der Inkubation mit 2 %igem Formaldehyd fixiert und mit einer Lösung aus $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, MgCl_2 und X-Gal in PBS angefärbt.

Abbildung 14 (links) und Abbildung 15 (rechts): Ad β Gal-infizierte PER.C6®-Zellen, koloriert, Vergrößerung 200fach (links: MOI 0,5, rechts: MOI 5) zeigen mit unterschiedlichen MOI infizierte, kolorierte Zellkulturen.

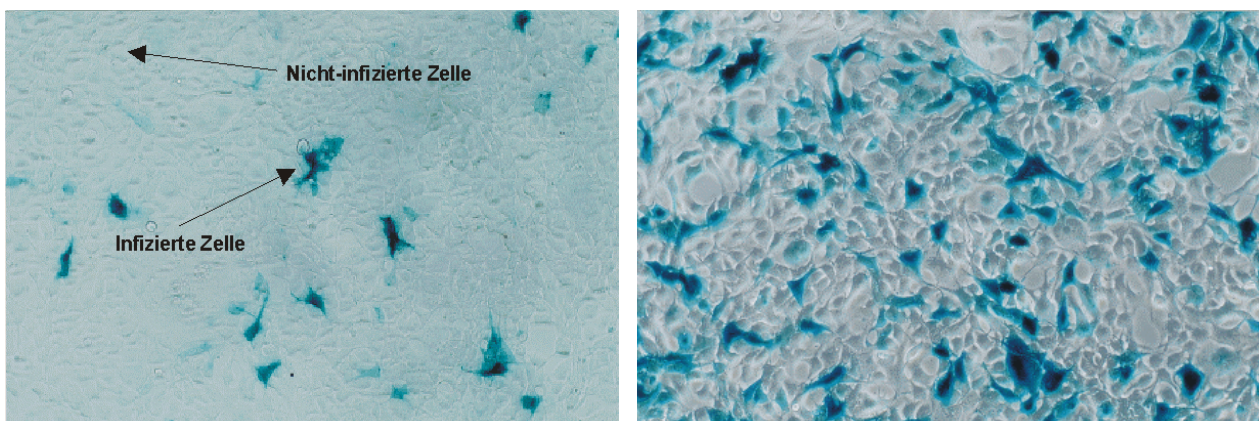


Abbildung 14 (links) und Abbildung 15 (rechts): Ad β Gal-infizierte PER.C6®-Zellen, koloriert, Vergrößerung 200fach (links: MOI 0,5, rechts: MOI 5)

3.1.7.3 Anpassung des Versuchsprotokolls

Die in Kapitel 3.1.7.2 Neutralisierende antiadenovirale Antikörper: Methode beschriebene Vorgehensweise war bei TRANSGENE SA oft durchgeführt worden, basierte allerdings auf der Verwendung von p293-Zellen. Diese sind deutlich größer als PER.C6®-Zellen, adherieren sehr viel schneller am Boden der Kulturplatte, teilen sich aber erst nach der Anheftung, während PER.C6® auch schon in der Suspension ein Wachstum zeigen. Deshalb musste das Protokoll angepasst werden, indem mit Zellzahlen zwischen 40000 pro Vertiefung und 80000 pro Vertiefung, verschiedenen MOI (im Bereich von 1 bis 8) und variierenden Inkubationszeiten von 12 h bis 30 h experimentiert wurde. Eine Kombination aus 60000 Zellen pro Loch, infiziert mit einem Virus pro Zelle (MOI 1) und einer langen 30-stündigen Inkubationszeit vor der Infektion stellte sich als Optimum heraus.

Es wurde auch die Verwendung einer PBS-Kationen-Lösung mit 2 % FCS zur Virusverdünnung für die Inkubationsphase mit dem Serum im Vergleich mit 1 %igem BSA in PBS getestet, was aber zu einer verminderten Infektionsrate und somit unklarerer Vergleichen neutralisierter und nicht-neutralisierter Erreger in der Zellkultur führte. Weiterhin musste die Zeit der Einwirkung des Nachweisreagenz, die die Zellen lysiert und als Substrat für die β -Galaktosidase dient, verlängert werden (von 30 min auf 45 min). Es wurde auch eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem Lösen des MUG in DMSO statt in H₂O erzielt.

3.1.8 In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen

Siehe auch Kapitel 12.8 Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Zellkulturüberstand

3.1.8.1 Material

Für die Bestimmung der IL 2-Konzentration im Überstand wurde der von R&D-Systems, Minneapolis, kommerzialisierte ELISA QUANTIKINE® human IL-2 genutzt, mit dem sich

natürliches und rekombinantes IL 2 in Zellkulturüberständen sowie im Serum oder Plasma bestimmen lässt (siehe auch Kapitel 3.1.4.1 Interleukin 2-Konzentration: Material).

3.1.8.2 Methode

Ein chirurgisch entferntes felines Fibrosarkom wurde in Kultur genommen. Beim Routine-splitting (4. Passage) wurden 30000 Zellen pro Loch auf zwei Zellkulturplatten ausgesät, um diese mit den auch in der Studie verwendeten Vektoren zu transduzieren.

Im ersten Durchlauf wurden die Kulturen mit beiden Viren mit unterschiedlichen Transgenen gleichzeitig infiziert mit MOI zwischen 1 und 1000. Jedes Verhältnis von Virenzahl zu Zellzahl konnte gedoppelt überprüft werden. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde jeweils der Überstand entnommen und in zwei Gefäße aufgeteilt, die dann eingefroren wurden. Mit dem QUANTIKINE®-ELISA wurde die IL 2-Konzentration bestimmt.

Nach den ersten Ergebnissen wurde der Versuch modifiziert. Es sollte ein Vergleich der Genexpression erreicht werden zwischen der Infektion mit AdhuIL 2 und der Infektion mit einer Kombination aus AdhuIL 2 und AdfeIFN γ . Mit leerem Virus wurde die MOI in der ersten Gruppe aufgestockt, um in beiden Fällen die gleiche Virusmenge pro Zelle zu haben. Es wurden MOI zwischen 5 und 50 verwendet und der Überstand bis zum 12. Tag alle 24 h entnommen und durch frisches Medium ersetzt.

Die einzige Veränderung im Vergleich zur Versuchsdurchführung bei Messung der IL 2-Konzentration im Serum (siehe auch Kapitel 3.1.4.1 Interleukin 2-Konzentration: Material) ist die Verwendung der gepufferten Proteinlösung RD 5 anstatt des Reagenz RD 6 E (wie vom Hersteller vorgegeben, siehe auch Kapitel 3.1.4.2 Interleukin 2-Konzentration: Methode). Die Proben wurden je nach erwarteter Interleukinkonzentration unverdünnt, 1 : 1,5, 1 : 2, 1 : 10 oder 1 : 20 verdünnt untersucht, außerhalb der Standardkurve liegende Werte wurden erneut nachgemessen.

Eine Lagerung der Überstände im Kühlschrank ist nicht möglich. Innerhalb von vier Tagen sinken die gemessenen Werte um über 30 %, alle Proben wurden erst ca. 1 h vor Beginn der Untersuchung aufgetaut.

3.1.9 Abweichungen vom Protokoll

Die im Vergleich zu der Beschreibung der zugehörigen Methode des Versuches aufgetretenen Abweichungen betrafen:

- Lagerung von Proben über mehrere Tage im Kühlschrank
- Verwendung von zwei verschiedenen rekombinanten Viren zum Beschichten der ELISA-Platten zum Nachweis antiadenoviraler Antikörper
- Verwendung von QUANTIKINE®-Testkits nach deren Ablaufdatum

Jede dieser Abweichungen wurde durch gleichzeitig stattfindende Vergleichsversuche untersucht. Die auftretenden Abweichungen der Messwerte lagen in allen Fällen unter 10 %, was im Rahmen der normalen Schwankungen bei korrekter Durchführung eines ELISA liegt.

Zusätzlich wurden bei Ausfall des ELISA-Platten-Waschautomaten die Platten mit einer Mehrfachpipette zweimalig per Hand mit Waschlösung beschickt und durch Umstürzen und Abtropfenlassen der Platte entleert.

Auf Unregelmäßigkeiten beim Auffinden der Proben wurde schon in Kapitel 3.1.2 eingegangen.

3.1.10 Statistische Auswertung

Mit Hilfe statistischer Tests wird überprüft, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Hypothese über die Grundgesamtheit anhand der Daten der Stichprobe bestätigt wird oder nicht. Die beurteilende Statistik untersucht die dem Experiment zugrundeliegende Wahrscheinlichkeitsverteilung.

Der t-Test für unabhängige bzw. unverbundene Stichproben (Student-Test) kommt zur Anwendung, um genau zwei Stichproben zu vergleichen (Mittelwertgleichheit). Voraussetzung ist das Vorliegen quantitativer Merkmale, die Normalverteilung beider Stichproben und eine in etwa übereinstimmende Varianz. In dem Fall kann die Größe der Stichproben unterschiedlich sein.

Die Regression untersucht die Abhängigkeit zweier beobachteter quantitativer Merkmale. Wenn man herausgefunden hat, dass zwei oder mehrere Merkmale miteinander zusammen-

hängen, kann das eine Merkmal zur Vorhersage des anderen eingesetzt werden. In unserem Fall wurde nur die lineare Regression betrachtet. Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den Grad der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale. Je näher der Korrelationskoeffizient betragsmäßig bei 1 liegt, desto enger schmiegt sich die Punktwolke an die Regressionsgerade. Um Irrtümer zu vermeiden, muss die Punktwolke jedoch unbedingt auch graphisch dargestellt werden, um zu erkennen, ob eine Korrelation z. B. durch zwei getrennt liegende, für sich unkorrelierte Gruppen oder durch einen einzelnen Ausreißer vorgetäuscht wird oder auch eine nichtlineare Abhängigkeit vorliegt.

Für die Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Parametern wurde eine externe Varianzanalyse von Herrn Stefan Krieger vom Statistischen Beratungslabor STABLAB der LMU München durchgeführt. Hier wurden mehr als zwei voneinander unabhängige Stichproben miteinander verglichen unter denselben Voraussetzungen wie für den t-Test (gleiche Varianz und Normalverteilung). Da die Abweichungen vom Erwartungswert nach unten und oben gleichermaßen von Interesse sind, nennt man einen solchen Test zweiseitig. Als Signifikanzniveau wird 5 % ($S = 0,05$) festgelegt.

3.2 Ergebnisse

Alle quantitativen Messergebnisse werden als Mittelwerte in Linien- (zeitlicher Verlauf) oder Säulendiagrammen (mengenmäßiger Vergleich) dargestellt. Die Mittelwerte werden mit der Messgenauigkeit der Einzelwerte gerundet, d. h. sie erhalten die gleiche Anzahl an Nachkommastellen. Die grafische Darstellung der Ergebnisse muss ohne Eintragung der jeweiligen Standardabweichung erfolgen. Diese ist immer unterhalb der gezeigten Daten in einer Tabelle mit aufgeführt und trägt die Einheit des angegebenen Parameters. Durch sehr große Standardabweichungen lässt die Übersichtlichkeit und Aussagekraft der Diagramme eine Illustration nicht zu (siehe auch Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11, Tabelle 14, Tabelle 15, Tabelle 18 und Tabelle 19).

Neben den von mir generierten Daten liegen vergleichbare Werte von 22 Katzen vor, denen experimentell rekombinante Adenoviren, die das huIL 2-Gen trugen, appliziert wurden. Es handelt sich um eine Toxizitätsstudie von TRANSGENE SA, die in Lyon mit dem Vektor AdTG 1024 bei zweimal wöchentlicher Applikation durchgeführt wurde (Phoenix's study n° 921/047). Hier wurden ebenfalls Serumproben von den Tagen der Injektion sowie jeweils 24 h später entnommen und auf die IL 2-Konzentration, Anti-huIL 2-Ak, antiadenovirale Antikörper insgesamt und deren Neutralisationskapazität untersucht. Ein Gentransfer erfolgte an den Tagen 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22 und 26 in Dosierungen von $1,4 \times 10^9$ tp pro Tier, $1,4 \times 10^{10}$ tp pro Tier oder $1,4 \times 10^{11}$ tp pro Tier. Eine infektiöse Einheit enthält ca. 20 tp.

Diese Ergebnisse werden hier vergleichend kurz mit dargestellt, um sie im Diskussionsteil ansprechen zu können.

3.2.1 Interleukin 2-Konzentration

Vom Hersteller wird das Detektionslimit mit 7 pg / ml angegeben. Reproduzierbare Ergebnisse konnten von mir aber erst ab Werten von 20 – 25 pg / ml erzeugt werden. Da die Proben 1 : 4 verdünnt waren, müssen Werte unter 90 pg / ml als unsicher gelten. Tabelle 2 zeigt alle nachgeprüften Werte über 90 pg / ml aller per Injektion ins Tumorbett behandelten Tiere.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Leere Felder bedeuten, dass von diesem Tag der Kontrolluntersuchung keine Probe vorhanden war. Dies ist meistens bedingt durch den Verzicht auf weitere Kontrollen nach dem Auftreten von Rezidiven, manchmal auch durch Verluste beim Transport oder nicht mehr zuzuordnende Beschriftungen der Probengefäße.

IL 2-Konzentrationen, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0		0		0	0	0	
3	Kontrolle			0	0	0	0	0	0		
4	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,2x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0		0		
9	Kontrolle	0	0	0	0	0					
10	0,2x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
11	0,2x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0				
15	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	5,0x10e8 IL2+IFN	0	256	0	0	0	0	0	0	0	0
17	5,0x10e8 IL2+IFN	0	369	0	0	0	0	0	0	0	0
18	5,0x10e8 IL2+IFN	0	376	231	0	0	0	0	0	0	0
19	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0		0	0	0	0
21	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0	181	0	0	0					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0	195	181	0	0	0	0	0	0	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0				
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0	303	0	0	0	0	0			
27	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
28	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0		0	0	0	0
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	0	225	0	0	0	0	0	0	0	0
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0	387	0	96	0	0	0	176		
33	5x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0		0	0	0		
35	Kontrolle	0	0	0	0	0					
36	5,0x10e8 IL2+IFN	0	107	0	0	0	0	0			

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

IL 2-Konzentrationen, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
37	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0		
38	5,0x10e8 IL2	0	0	0	0		0	0			
39	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
40	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	5,0x10e8 IL2	0	843	368	0	0	0	0	0	0	0
42	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	5,0x10e8 IL2	0	286	889	2745						
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0	424	0	0	0	0	0			
46	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
47	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0		
48	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
49	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
50	Kontrolle	0	0	0	0						
51	5,0x10e8 IL2+IFN	0	375	0	0	0	0	0	0	0	0
52	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0			
53	Kontrolle	0	0	0							
54	5,0x10e8 IL2	0	241	343	0	0	0	0			
55	5,0x10e8 IL2	0	1173	0	0						
56	5,0x10e8 IL2+IFN	0	1095	143	0	0	0	0	0	0	0
57	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0				
58	5,0x10e8 IL2	0	647	196	0	0	0	0			
59	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0				
60	5,0x10e8 IL2+IFN	0	208	0	0	0					
61	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
62	5,0x10e8 IFN	0		0	0	0	0	0	0	0	0
63	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
64	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
67	Kontrolle	0	0	0	0	0					
68	5,0x10e8 IL2+IFN	0	436	0	0	0	0	0	0	0	0
69	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	5,0x10e8 IL2+IFN	0	334	0	0	0	0	0	0	0	0
71	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0			
72	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0			
75	5,0x10e8 IL2+IFN	0	284	0	0	0	0				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0	937	0	0	0	0	0	0	0	0
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0			
78	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	Kontrolle	0	0	0	0	0	0				

IL 2-Konzentrationen, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0	179	0	0	0	0	0	0	0	0
81	5,0x10e8 IL2+IFN	0	782	0	0	0	0	0	0	0	0
82	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	5,0x10e8 IFN	0	0								
84	Kontrolle	0	0	0	0	0	0				
85	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
86	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
87	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0		
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0	324	0	0	0	0	0			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	0	131	0	0	0	0	0			
90	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0			
91	5,0x10e8 IL2+IFN	0	580	0	0	0	0	0	0	0	0
92	5,0x10e8 IFN		0	0	0	0	0	0			
93	5,0x10e8 IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2: IL 2-Konzentrationen aller genterapeutisch behandelten Katzen der Phase I und der Phase II an allen Kontrolluntersuchungsterminen bei Applikation ins Tumorbett (in pg / ml)

Hieraus ergeben sich eine Vielzahl von Vergleichsmöglichkeiten. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte der in der Dosisfindungsstudie mit verschiedenen Dosen behandelten Tiere im Vergleich miteinander aufgetragen. Die im Serum messbaren Interleukinspiegel sind abhängig von der injizierten Dosis rekombinanter Viren. Während nach Injektion von 0,2 oder $1,0 \times 10^8$ i. u. im Serum überhaupt kein humanes Interleukin gefunden wird, steigert sich der Spitzenwert von 91 pg / ml nach Applikation von $2,5 \times 10^8$ i. u. (nur zwei behandelte Tiere) auf 286 pg / ml nach Gabe von $5,0 \times 10^8$ i. u. Dieser Peak wird an Tag 2 deutlich. Der klare Unterschied in den Mittelwerten ist allerdings mit hohen Standardabweichungen behaftet (91 pg / ml für die Dosierung $2,5 \times 10^8$ i. u. und 277 pg / ml für die Dosierung $5,0 \times 10^8$ i. u.), da mehrere Tiere auch in diesen Vektorkonzentrationen bei einem Nullwert verbleiben.

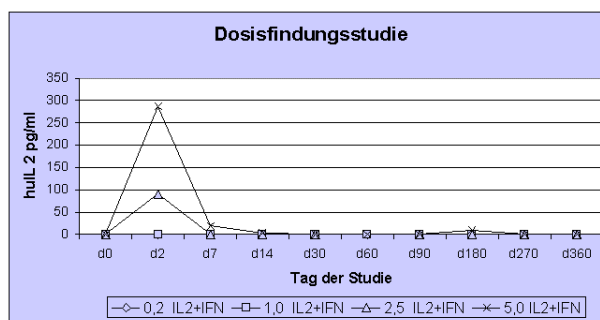


Abbildung 16: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum bei Injektion unterschiedlicher Vektordosen (0,2 oder 1,0 oder 2,5 oder 5,0 x 10⁸ i. u.)

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
0,2 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0		
1,0 IL2+IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5 IL2+IFN	0	91	0	0	0					
5,0 IL2+IFN	0	277	58	18	0	0	0	40	0	0

Tabelle 3: Standardabweichungen zu Abbildung 16

Für die Phase II der Tumorbettstudie ist ein Vergleich der Interleukinwerte der unterschiedlichen Therapiegruppen aufschlussreich (siehe auch Abbildung 17: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der vier therapeutischen Gruppen), wobei weder in der Kontrollgruppe noch in der Gruppe der mit dem Interferon γ -Transgen behandelten Tiere humanes Interleukin nachgewiesen wurde. Die schon an Tag 2 doppelt so hohen Werte der aus Toxizitätsgründen eingestellten IL 2-Gruppe waren auch noch zwei Wochen nach der Erstinjektion stark erhöht, während die IL 2 + IFN γ -Therapiegruppe nur einen Peak an Tag 2 beobachten lässt. Der Gruppenmittelwert zeigt 532 pg / ml humanes Interleukin im Vergleich zu 286 pg / ml. Ein Transgennachweis im Serum an Tag 7 gelingt nur bei drei von 29 Tieren. An Tag 14 kann ein IL 2-Wert oberhalb der Nachweisgrenze nur noch bei jeweils einem von sechs Tieren in der IL 2-Gruppe mit 2745 pg / ml und bei einem weiteren von 29 in der IL 2 + IFN γ -Gruppe mit 96 pg / ml gemessen werden.

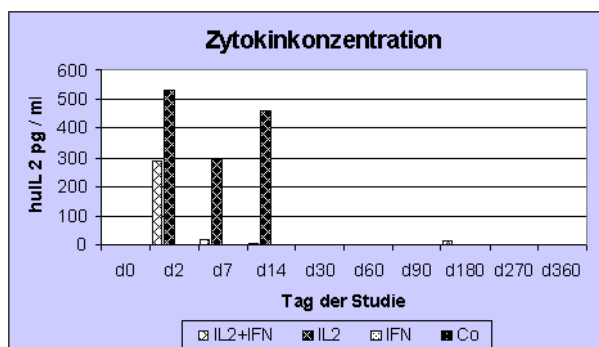


Abbildung 17: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der vier therapeutischen Gruppen

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60		d180	d270	d360
Co	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL 2	0	398	301	1023	0	0	0			
IL 2 + IFN	0	277	58	18	0	0	0	40	0	0

Tabelle 4: Standardabweichungen zu Abbildung 17

Eine interessante Frage ist, ob der gemessene Interleukinspiegel im Serum die Rezidivwahrscheinlichkeit voraussagen lässt. Innerhalb der Therapiegruppe 5×10^8 i. u. IL 2 + IFN γ (28 Tiere) ergibt ein Vergleich der Werte von im ersten Jahr rezidivierten (15 Tiere) mit nach einem Jahr noch rezidivfreien Tieren (13 Tiere) eine mehr als doppelt so hohe Interleukinkonzentration bei Tieren, die rezidivlos bleiben (siehe auch Abbildung 18). Mit 438 pg / ml zu 162 pg / ml beobachtet man einen klaren Unterschied an Tag 2 der Studie, also 24 h nach erstmaliger Vektorapplikation. Auch hier liegt allerdings die Standardabweichung mit 321 pg / ml und 149 pg / ml recht hoch.

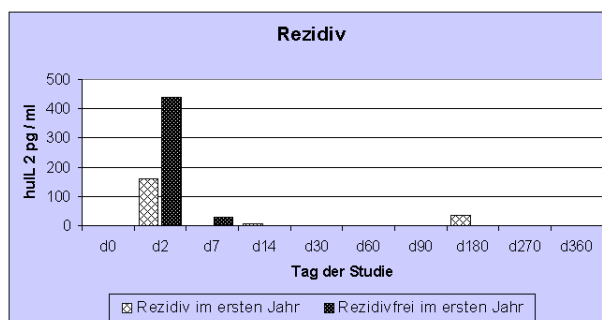


Abbildung 18: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum von Tieren mit (15 Tiere) und ohne (13 Tiere) Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn im Vergleich (nur Therapiegruppe 5×10^8 i. u. IL 2 + IFN γ (28 Tiere))

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Rezidiv im ersten Jahr	0	149	44	23	0	0	0	66	0	0
Rezidivfrei im ersten Jahr	0	321	70	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5: Standardabweichungen zu Abbildung 18

Die Serumproben der untersuchten Katzen aus der darauffolgenden Studie, in der die gleiche Vektoren- und Transgenkombination verabreicht wurde, aber der Applikationsweg sich von „postoperativ ins Tumorbett“ zu „präoperativ intratumoral“ veränderte, stammten aus der Anwendung zweier verschiedener Dosen. Bei keinem Patienten konnten zu einem beliebigen Zeitpunkt Serum-Interleukinspiegel gemessen werden, wenn die Dosis von 1×10^8 AdhuIL 2 + 1×10^8 AdfeIFN γ injiziert wurde (siehe auch Tabelle 6: IL 2-Konzentrationen behandelter Katzen der Dosisfindungsphase bei intratumoraler Applikation). Nur die höhere und klinisch schlecht tolerierte Dosis von 5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ erbrachte einen positiven Nachweis der Transgenexpression. Hier ist wie bei der Injektion ins Wundbett nur ein Peak nach 24 h sichtbar, eine länger andauernde Expression an Tag 7 oder Tag 14 kann zumindest mit Abschwemmung in den Blutkreislauf nicht beobachtet werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

IL 2-Konzentrationen, intratumorale Applikation									
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d-14	d-7	d-6	d0	d7	d14	d45	d90
101	5,0x10e8 IL2+IFN			454	0	0		0	0
102	5,0x10e8 IL2+IFN			567	0	0	0	0	0
104	5,0x10e8 IL2+IFN		0	133	0	0	0	0	0
106	5,0x10e8 IL2+IFN		0		0		0	0	0
107	5,0x10e8 IL2+IFN		0	1635	137	0	0	363	270
109	5,0x10e8 IL2+IFN			789		0	0	0	0
110	5,0x10e8 IL2+IFN		0	305	0	0	0	0	
111	5,0x10e8 IL2+IFN		0	564	90	0	0	0	0
112	5,0x10e8 IL2+IFN		0				0	0	0
113	5,0x10e8 IL2+IFN		0	1280	118				
114	5,0x10e8 IL2+IFN		0		0		0	0	0
115	5,0x10e8 IL2+IFN		0		0				
129	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0		0	0	0
130	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0			0	0	0
131	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0		0	0	0
133	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	0		0	0	0

Tabelle 6: IL 2-Konzentrationen behandelter Katzen der Dosisfindungsphase bei intratumoraler Applikation (in pg / ml)

Alle Vergleiche der beiden Applikationsarten im Hinblick auf deren Einfluss auf die Zytokin-konzentration im Serum werden in Kapitel 3.2.5 Vergleich der beiden Applikationswege erläutert.

Die in Lyon experimentell mit AdhuIL 2 behandelten Katzen zeigten erst nach der zweiten Injektion im Abstand von fünf Tagen die maximalen Serumwerte. Nach Injektion der niedrigsten Dosis von $1,4 \times 10^9$ tp pro Tier konnte nach der ersten Applikation in keinem Fall (6 Tiere) huIL 2 nachgewiesen werden, nach der Zweitinjektion lagen die Werte zwischen 18 pg / ml und 431 pg / ml. In der Gruppe, die mit der in München durchgeführten Studie am besten vergleichbar ist durch die Verwendung einer Dosis von $1,4 \times 10^{10}$ tp pro Tier (München: 2×10^{10} tp pro Tier) wurden nach Erstapplikation Werte zwischen 274 pg / ml und 609 pg / ml gefunden (6 Tiere), die sich in der Gruppe, die eine Dosis erhielt, die noch um eine Zehnerpotenz höher lag, ca. vervierzigfache (Werte zwischen 13500 pg / ml und 23400 pg / ml bei Injektion von $1,4 \times 10^{11}$ tp pro Tier). All diese sechs Tiere verstarben an

Tag 8 oder Tag 9 oder wurden zu diesem Zeitpunkt getötet. Ab Tag 12 war auch bei niedriger dosierten Gruppen kein Interleukin mehr nachweisbar.

3.2.2 Antikörper gegen Interleukin 2

Nach Erhitzen der Proben änderten sich die gemessenen Werte nur geringfügig sowohl nach oben wie auch nach unten (siehe auch Abbildung 19: Prozentuale Abweichung der optischen Dichte in verschiedenen Verdünnungsstufen nach Erhitzen der Proben). Dies lag mit 0 % bis 12 % in der normalen Schwankungsbreite bei der Durchführung eines ELISA. Bei der Messung der gegen das Transgen gerichteten Ig G spielen also ungewollt mitgemessene Ig E keine Rolle, diese wurden durch das Erhitzen komplett zerstört.

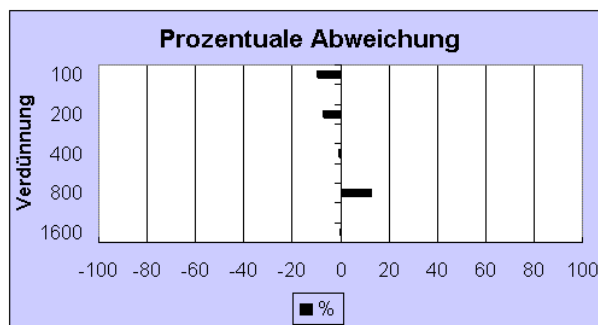


Abbildung 19: Prozentuale Abweichung der optischen Dichte in verschiedenen Verdünnungsstufen nach Erhitzen der Proben

In den folgenden Tabellen sind die gemessene optische Dichte aller untersuchten Proben auf Ig M und Ig G aller postoperativ behandelten Tiere über die Zeit aufgelistet (siehe auch Tabelle 7: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig M über die Zeit und Tabelle 8: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig G über die Zeit). Dies sind die korrigierten Werte nach Subtraktion des Leerwertes und Überprüfung extremer Werte durch Untersuchungstripel, wobei ein extremer Ausreißer unter drei Werten als Messfehler gewertet und gestrichen wurde, wohingegen ansonsten ein Mittelwert der Mehrfachmessung berechnet und eingetragen wurde.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-huIL 2-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0,460		0,507		0,594	0,423	0,736	
3	Kontrolle			0,256	0,655	0,322	0,256	0,278	0,216		
4	Kontrolle	0,196	0,151	0,272	0,523	0,209	0,261	0,166	0,237	0,246	0,159
5	0,2x10e8 IL2+IFN	0,338	0,505	0,292	0,307	0,440	0,412	0,295	0,308		
6	Kontrolle	0,370	0,381	0,454	0,505	0,552	0,511	0,491	0,488	0,506	
7	Kontrolle	0,344	0,498	0,451	0,449	0,584	0,772	0,881			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	0,401	0,352	0,453	0,481	0,386	0,429		0,167		
9	Kontrolle	0,978	1,057	1,308	1,280	1,217					
10	0,2x10e8 IL2+IFN	0,290	0,275	0,237	0,377	0,312	0,274	0,278	0,330		
11	0,2x10e8 IL2+IFN	0,320	0,249	0,293	0,284	0,393	0,309	0,282			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	0,242	0,208	0,978	0,592	0,475	0,312	0,439	0,434	0,526	0,389
13	1,0x10e8 IL2+IFN	1,743	1,275		1,156	1,048	1,257	1,432		0,955	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0,431	0,451	0,460	0,718	0,453	0,426				
15	1,0x10e8 IL2+IFN	0,518	0,628	0,556	0,808	0,534	0,689	0,557	0,731	0,822	0,547
16	5,0x10e8 IL2+IFN	0,523	0,519	0,389	0,495	0,464	0,476	0,457	0,754	0,521	0,560
17	5,0x10e8 IL2+IFN	0,261	0,254	0,424	0,339	0,205	0,270	0,179	0,151	0,155	0,132
18	5,0x10e8 IL2+IFN	1,322	0,496	0,764	0,868	0,363	0,311	0,313	0,391	0,342	0,275
19	5,0x10e8 IL2+IFN	0,285	0,310	0,568	0,484						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0,580	0,819	0,690	0,635	0,674		0,398	0,510	0,317	0,550
21	5,0x10e8 IL2+IFN	0,236	0,410	0,596	0,524	0,615	0,672	0,436	0,491		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0,357	0,325	0,326	0,323	0,327					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0,333	0,264	0,442	0,483	0,422	0,294	0,327	0,244	0,286	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0,998	0,863	1,230	0,913	1,010	0,903	0,742	0,941	0,884	0,711
25	5,0x10e8 IL2+IFN	0,501	0,462	0,611	0,458	0,492	0,376				
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0,668	0,580	0,872	1,047	0,889	0,584	0,248			
27	Kontrolle	0,941	1,120	0,730	0,817	0,445	1,046	0,909			
28	Kontrolle	0,640	0,816	0,697	0,674	1,375	0,467	0,522	0,620	0,820	0,744
29	5,0x10e8 IL2+IFN	1,183	1,338	1,550	1,523	1,834		1,418	1,570	1,528	1,442
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0,270	0,281	0,549	1,007	0,658					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	0,980	1,060	0,955	0,890	0,964	0,796	0,883	0,617	0,893	0,487
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0,182	0,193	0,459	0,380	0,339	0,125	0,134	0,212		
33	5x10e8 IFN	0,418	0,219	0,551	0,467	0,436	0,000				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0,726	0,504	0,800	0,751		0,732	0,440	0,548		
35	Kontrolle	0,177	0,191	0,311	0,166	0,242					
36	5,0x10e8 IL2+IFN	1,910	1,512	1,722	1,888	1,773	1,817	1,694			
37	Kontrolle	0,252	0,198	0,426	0,372	0,434	0,310	0,318	0,236		
38	5,0x10e8 IL2	0,265	0,484	1,003	1,054		0,706	0,724			
39	Kontrolle	0,708	0,710	0,742	0,952	0,995	0,860	0,856			
40	Kontrolle	0,694	0,832	0,933	0,787	0,775	0,561	0,791	0,785	0,729	1,514
41	5,0x10e8 IL2	0,957	0,835	1,260	1,122	0,690	0,559	0,444	0,407	0,342	0,330
42	5,0x10e8 IFN	0,868	0,966	0,975	0,987	1,083	0,545	0,678	0,417	0,622	0,527
43	Kontrolle	0,256	0,212	0,424	0,349	0,400	0,570	0,608	0,267	0,789	0,393
44	5,0x10e8 IL2	0,401	0,402	0,607	0,421						

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-huIL 2-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0,180	0,166	0,386	0,324	0,368	0,246	0,447			
46	Kontrolle	0,734	0,447	0,605	0,524	0,789	0,748	0,617	0,630	0,809	
47	Kontrolle	0,264	0,206	0,249	0,336	0,438	0,549	1,061	0,718		
48	5,0x10e8 IFN	0,263	0,228	0,258	0,531	0,636	0,448	0,495	0,363		
49	Kontrolle	0,449	0,340	0,286	0,505	0,559	0,878	0,437			
50	Kontrolle	0,427	0,363	0,426	0,490						
51	5,0x10e8 IL2+IFN	0,220	0,202	0,733	0,540	0,451	0,273	0,176	0,203	0,291	0,198
52	5,0x10e8 IFN	0,353	0,319	0,545	0,398	0,371	0,381	0,390			
53	Kontrolle	0,478	0,522	0,628							
54	5,0x10e8 IL2	0,362	0,320	0,333	0,234	0,417	0,345	0,235			
55	5,0x10e8 IL2	0,235	0,321	0,495	0,370						
56	5,0x10e8 IL2+IFN	0,254	0,244	0,289	0,223	0,246	0,186	0,227	0,167	0,231	0,200
57	5,0x10e8 IFN	0,455	0,363	0,384	0,463	0,376	0,434				
58	5,0x10e8 IL2	0,608	0,650	0,849	0,637	0,501	0,623	0,303			
59	5,0x10e8 IFN	0,321	0,369	0,348	0,332	0,314	0,186				
60	5,0x10e8 IL2+IFN	0,566	0,469	0,516	0,901	0,491					
61	Kontrolle	0,959	0,755	0,672	0,700	0,768	0,839	0,749			
62	5,0x10e8 IFN	0,329		0,312	0,395	0,445	0,304	0,416	0,346	0,415	0,346
63	5,0x10e8 IFN	0,303	0,280	0,540	0,514	1,164	0,635	0,324	0,369		
64	5,0x10e8 IFN	0,740	0,628	0,631	0,542	0,719	0,590	0,401	0,761	0,787	0,661
65	Kontrolle	0,437	0,311	0,338	0,384	0,348	0,409	0,449	0,594	0,542	0,571
66	Kontrolle	0,736	0,648	0,708	0,827	0,775	0,551	0,625	0,632	0,711	
67	Kontrolle	0,362	0,204	0,257	0,162	0,247					
68	5,0x10e8 IL2+IFN	0,174	0,139	0,667	0,309	0,307	0,048	0,071	0,036	0,305	0,171
69	5,0x10e8 IFN	0,425	0,329	0,373	0,335	0,365	0,321	0,284	0,283	0,223	0,329
70	5,0x10e8 IL2+IFN	0,251	0,277	0,429	0,216	0,419	0,275	0,387	0,391	0,337	0,509
71	5,0x10e8 IFN	0,415	0,567	0,663	0,471	0,546	0,459	0,363			
72	5,0x10e8 IFN	0,322	0,373	0,285	0,429	0,365	0,683	0,484	0,399	0,257	0,367
73	5,0x10e8 IFN	0,071	0,059	0,193	0,229	0,216	0,146	0,118	0,048	0,122	0,144
74	5,0x10e8 IFN	0,147	0,217	0,196	0,184	0,652	0,325	0,473			
75	5,0x10e8 IL2+IFN	0,632	0,558	0,652	0,595	0,634	0,709				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0,377	0,372	0,431	0,786	0,513	0,491	0,526	0,533	0,673	0,458
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0,757	0,690	0,821	0,736	0,767	0,661	0,808			
78	5,0x10e8 IFN	0,164	0,240	0,649	0,520	0,408	0,356	0,265	0,277	0,260	0,317
79	Kontrolle	0,350	0,636	0,332	0,609	0,577	0,675				
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0,292	0,474	0,393	0,636	0,393	0,453	0,609	0,463	0,341	0,517
81	5,0x10e8 IL2+IFN	0,309	0,564	0,775	0,786	0,513	0,404	0,226	0,395	0,321	0,295
82	Kontrolle	0,287	0,285	0,299	0,245	0,287	0,216	0,196	0,197	0,149	0,332
83	5,0x10e8 IFN	1,050	0,916								
84	Kontrolle	0,097	0,093	0,132	0,128	0,154	0,109				
85	5,0x10e8 IFN	0,157	0,599	0,407	0,260	0,818	0,764	0,658	0,801		
86	5,0x10e8 IFN	0,380	0,337	0,406	0,346	0,404	0,399	0,379	0,398		
87	Kontrolle	0,297	0,209	0,338	0,442	0,209	0,223	0,196	0,167		

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-huIL 2-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0,635	0,305	0,512	0,714	0,206	0,344	0,170			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	0,570	0,207	0,512	0,461	0,682	0,506	0,525			
90	5,0x10e8 IFN		0,131	0,258	0,332	0,213	0,226	0,145			
91	5,0x10e8 IL2+IFN		0,269	0,645	0,565	0,505	0,224	0,213	0,138	0,130	0,275
92	5,0x10e8 IFN		0,157	0,562	0,740	0,691	0,203	0,144			
93	5,0x10e8 IFN	0,689	0,667	0,772	0,639	0,712	0,709	0,487	0,593	0,498	0,416

Tabelle 7: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig M über die Zeit (Verdünnung 1 : 200)

Anti-huIL 2-Ig G											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30		d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0,066		0,077		0,108	0,049	0,155	
3	Kontrolle			0,054	0,096	0,059	0,037	0,041	0,030		
4	Kontrolle	0,199	0,047	0,034	0,087	0,053	0,040	0,145	0,084	0,133	0,000
5	0,2x10e8 IL2+IFN	0,218	0,027	0,201	0,012	0,219	0,162	0,213	0,087		
6	Kontrolle	0,120	0,137	0,111	0,140	0,143	0,094	0,088	0,129	0,122	
7	Kontrolle	0,112	0,131	0,102	0,141	0,184	0,272	0,045			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	0,017	0,030	0,053	0,060	0,033	0,029		0,061		
9	Kontrolle	0,041	0,043	0,034	0,034	0,025					
10	0,2x10e8 IL2+IFN	0,048	0,028	0,060	0,058	0,059	0,044	0,000	0,000		
11	0,2x10e8 IL2+IFN	0,102	0,088	0,172	0,202	0,203	0,000	0,000			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	0,002	0,000	0,065	0,009	0,003	0,053	0,010	0,048	0,058	0,032
13	1,0x10e8 IL2+IFN	0,099	0,047		0,133	0,077	0,130	0,073		0,140	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0,080	0,079	0,049	0,123	0,061	0,206				
15	1,0x10e8 IL2+IFN	0,108	0,093	0,200	0,186	0,042	0,197	0,131	0,088	0,109	0,140
16	5,0x10e8 IL2+IFN	0,046	0,036	0,036	0,062	0,049	0,052	0,048	0,053	0,071	0,063
17	5,0x10e8 IL2+IFN	0,018	0,019	0,031	0,038	0,014	0,030	0,028	0,060	0,050	0,055
18	5,0x10e8 IL2+IFN	0,150	0,055	0,096	0,149	0,189	0,235	0,593	0,738	0,599	0,516
19	5,0x10e8 IL2+IFN	0,003	0,054	0,000	0,031						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0,059	0,062	0,037	0,091	0,091		0,152	0,180	0,310	0,398
21	5,0x10e8 IL2+IFN	0,285	0,341	0,211	0,227	0,401	0,766	1,052	0,595		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0,091	0,014	0,099	0,136	0,140					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0,094	0,072	0,125	0,105	0,005	0,277	0,283	0,081	0,163	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0,368	0,244	0,324	0,292	0,210	0,117	0,235	0,146	0,088	0,221
25	5,0x10e8 IL2+IFN	0,173	0,182	0,137	0,069	0,030	0,000				

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-huIL 2-Ig G											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30		d90	d180	d270	d360
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0,228	0,180	0,177	0,158	0,141	0,055	0,023			
27	Kontrolle	0,091	0,159	0,072	0,129	0,041	0,084	0,171			
28	Kontrolle	0,076	0,101	0,079	0,080	0,130	0,059	0,079	0,051	0,059	0,065
29	5,0x10e8 IL2+IFN	0,131	0,144	0,107	0,152	0,116		0,077	0,098	0,065	0,100
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0,046	0,025	0,049	0,090	0,687					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	0,180	0,082	0,139	0,099	0,228	0,063	0,181	0,148	0,406	0,342
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0,034	0,032	0,095	0,081	0,021	0,021	0,005	0,172		
33	5x10e8 IFN	0,068	0,048	0,127	0,164	0,160	0,130				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0,145	0,078	0,134	0,142		0,458	1,020	1,374		
35	Kontrolle	0,041	0,052	0,036	0,049	0,022					
36	5,0x10e8 IL2+IFN	0,475	0,333	0,360	0,458	0,391	0,434	0,373			
37	Kontrolle	0,058	0,030	0,040	0,145	0,074	0,050	0,054	0,053		
38	5,0x10e8 IL2	0,080	0,061	0,118	0,158		0,209	0,271			
39	Kontrolle	0,145	0,142	0,099	0,120	0,085	0,073	0,122			
40	Kontrolle	0,153	0,182	0,187	0,127	0,126	0,110	0,067	0,011	0,000	0,020
41	5,0x10e8 IL2	0,030	0,018	0,082	0,246	1,139	1,142	0,829	0,725	0,839	0,985
42	5,0x10e8 IFN	0,029	0,018	0,063	0,072	0,097	0,018	0,056	0,040	0,025	0,006
43	Kontrolle	0,000	0,022	0,000	0,008	0,080	0,072	0,097	0,117	0,094	0,069
44	5,0x10e8 IL2	0,044	0,037	0,095	0,207						
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0,079	0,089	0,168	0,155	0,159	0,132	0,185			
46	Kontrolle	0,206	0,094	0,138	0,069	0,179	0,113	0,236	0,196	0,326	
47	Kontrolle	0,022	0,027	0,023	0,049	0,050	0,079	0,147	0,074		
48	5,0x10e8 IFN	0,032	0,042	0,036	0,075	0,073	0,066	0,088	0,068		
49	Kontrolle	0,047	0,021	0,047	0,147	0,153	0,118	0,104			
50	Kontrolle	0,192	0,152	0,128	0,194						
51	5,0x10e8 IL2+IFN	0,007	0,012	0,050	0,032	0,048	0,018	0,024	0,329	0,492	0,276
52	5,0x10e8 IFN	0,081	0,054	0,258	0,172	0,168	0,125	0,137			
53	Kontrolle	0,120	0,123	0,130							
54	5,0x10e8 IL2	0,112	0,069	0,067	0,120	1,192	0,484	0,355			
55	5,0x10e8 IL2	0,207	0,238	0,233	0,199						
56	5,0x10e8 IL2+IFN	0,165	0,163	0,153	0,153	0,182	0,130	0,003	0,018	0,000	0,016
57	5,0x10e8 IFN	0,052	0,011	0,043	0,021	0,096	0,036				
58	5,0x10e8 IL2	0,086	0,061	0,132	0,093	0,171	0,394	0,211			
59	5,0x10e8 IFN	0,195	0,193	0,178	0,165	0,156	0,015				
60	5,0x10e8 IL2+IFN	0,140	0,091	0,135	0,255	0,363					
61	Kontrolle	0,115	0,096	0,148	0,146	0,192	0,132	0,146			
62	5,0x10e8 IFN	0,060		0,047	0,138	0,104	0,058	0,038	0,084	0,107	0,113
63	5,0x10e8 IFN	0,063	0,056	0,090	0,092	0,314	0,143	0,168	0,069		
64	5,0x10e8 IFN	0,122	0,109	0,165	0,205	0,164	0,133	0,093	0,091	0,139	0,078
65	Kontrolle	0,034	0,074	0,087	0,066	0,081	0,062	0,065	0,056	0,096	0,069
66	Kontrolle	0,153	0,129	0,151	0,169	0,155	0,058	0,101	0,095	0,107	
67	Kontrolle	0,137	0,056	0,032	0,063	0,072					
68	5,0x10e8 IL2+IFN	0,036	0,031	0,131	0,081	0,164	0,370	1,328	1,238	1,258	0,887

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-huIL 2-Ig G											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
69	5,0x10e8 IFN	0,056	0,068	0,044	0,077	0,040	0,051	0,028	0,040	0,033	0,036
70	5,0x10e8 IL2+IFN	0,051	0,050	0,083	0,073	0,167	0,679	1,219	1,838	1,884	2,000
71	5,0x10e8 IFN	0,053	0,140	0,112	0,052	0,090	0,041	0,046			
72	5,0x10e8 IFN	0,071	0,046	0,084	0,070	0,097	0,124	0,157	0,099	0,079	0,101
73	5,0x10e8 IFN	0,151	0,148	0,129	0,125	0,072	0,066	0,053	0,045	0,053	0,083
74	5,0x10e8 IFN	0,063	0,100	0,041	0,108	0,109	0,094	0,153			
75	5,0x10e8 IL2+IFN	0,046	0,040	0,088	0,105	0,106	0,187				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0,031	0,025	0,083	0,172	0,062	0,290	1,423	1,319	1,163	0,476
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0,135	0,131	0,171	0,103	0,169	0,139	0,255			
78	5,0x10e8 IFN	0,044	0,034	0,128	0,088	0,026	0,058	0,051	0,064	0,055	0,081
79	Kontrolle	0,122	0,160	0,104	0,095	0,170	0,157				
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0,164	0,221	0,238	0,286	0,174	0,211	0,197	0,210	0,240	0,230
81	5,0x10e8 IL2+IFN	0,099	0,054	0,188	0,249	0,140	0,082	0,113	0,205	0,492	0,466
82	Kontrolle	0,029	0,001	0,096	0,115	0,007	0,000	0,010	0,011	0,010	0,043
83	5,0x10e8 IFN	0,285	0,201								
84	Kontrolle	0,040	0,058	0,110	0,055	0,042	0,084				
85	5,0x10e8 IFN	0,034	0,132	0,110	0,099	0,206	0,123	0,177	0,215		
86	5,0x10e8 IFN	0,102	0,054	0,063	0,032	0,049	0,044	0,030	0,068		
87	Kontrolle	0,101	0,058	0,091	0,082	0,056	0,030	0,033	0,027		
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0,229	0,075	0,188	0,253	0,129	0,128	0,186			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	0,111	0,072	0,083	0,163	0,181	0,193	0,221			
90	5,0x10e8 IFN		0,073	0,133	0,187	0,108	0,110	0,087			
91	5,0x10e8 IL2+IFN		0,275	0,267	0,345	0,299	0,317	0,294	0,517	0,286	0,591
92	5,0x10e8 IFN		0,338	0,342	0,501	0,460	0,337	0,356			
93	5,0x10e8 IFN	0,202	0,336	0,303	0,243	0,237	0,215	0,183	0,321	0,172	0,226

Tabelle 8: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig G über die Zeit (Verdünnung 1 : 200)

Bei der Messung der Immunglobuline der Klasse M war das Hintergrundrauschen der negativen Proben im Vergleich mit dem gemessenen Anstieg der optischen Dichte (OD) nach Therapiebeginn sehr hoch. Die gemessene optische Dichte selbst bei Kontrolltieren lag im Mittel bei 0,529. In den das Transgen exprimierenden Therapiegruppen konnte nur ein leichter Anstieg der Ig M zu Tag 7 mit baldigem Abfall beobachtet werden. Die Kurven der Ig G-Messung setzen sich deutlicher voneinander ab. Bei den Kontrolltieren und auch der nur mit dem IFN γ -Transgen behandelten Tieren sind keine Anti-huIL 2-Ak nachzuweisen. Die ausschließlich mit AdhuIL 2 behandelten Tiere zeigen eine Ig G-Entwicklung ab Tag 14 mit einem Peak an Tag 30 (OD 0,83 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit OD 0,09) und einem

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

schnellen Abbau dieser Antikörper. Diese Kurve setzt sich allerdings nur aus den Werten von vier Patienten zusammen, nach Tag 90 waren dann nur noch Proben eines Tieres zu untersuchen, diese sind deshalb nicht in der Grafik verarbeitet. Der Anstieg der gegen das Fremdinterleukin gerichteten Immunglobuline in der Therapiegruppe, die Transgene beider Zytokine erhalten hat, erfolgt deutlich später. Hier ist der Anstieg nicht vor Tag 60 zu sehen, das Maximum vorhandener Antikörper ist mit Tag 180 erreicht (OD 0,51). Der Spiegel zirkulierender Ig G ist auch nach einem Jahr mit einer OD von 0,45 noch messbar erhöht im Vergleich zum Ausgangszustand mit einer OD von 0,13 (siehe auch Abbildung 20 (links) und Abbildung 21 (rechts): Verlauf der gegen das Transgen gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G)).

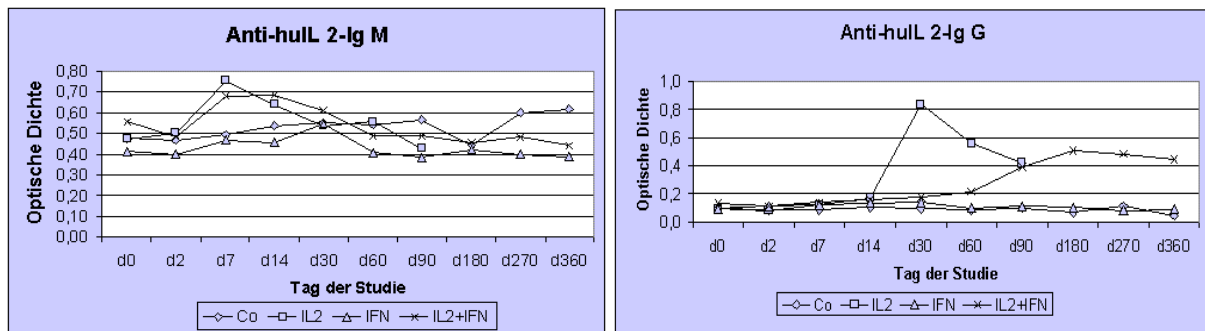


Abbildung 20 (links) und Abbildung 21 (rechts): Verlauf der gegen das Transgen gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Co	0,25	0,29	0,25	0,27	0,31	0,26	0,26	0,21	0,23	0,44
IFN	0,25	0,24	0,20	0,18	0,26	0,20	0,16	0,20	0,21	0,14
IL 2	0,25	0,19	0,31	0,34	0,11	0,13	0,19			
IL 2 + IFN	0,40	0,33	0,33	0,36	0,40	0,35	0,39	0,35	0,36	0,32

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Co	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,09	0,03
IFN	0,07	0,09	0,09	0,10	0,10	0,07	0,08	0,08	0,05	0,06
IL 2	0,06	0,07	0,05	0,05	0,47	0,35	0,24			
IL 2 + IFN	0,11	0,09	0,08	0,10	0,15	0,20	0,45	0,55	0,53	0,49

Tabelle 9 (oben) und Tabelle 10 (unten): Standardabweichungen zu Abbildung 20 und Abbildung 21

Durch die beiden folgenden Photos (siehe auch Abbildung 22 (links) und Abbildung 23 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis gegen humanes, rekombinantes IL 2-gerichteter Antikörper, jeweils Katze Nummer 18 (links: Ig M, rechts: Ig G)) lässt sich die Entwicklung der unterschiedlichen Immunglobuline veranschaulichen: eine starke unspezifische und in jedem Katzenserum vorhandene Farbaktivität bei den Ig M mit sichtbarem leichtem Anstieg der Farbintensität in den stärkeren Verdünnungsstufen in den ersten Tagen der Therapie sowie ein sehr später Anstieg der Ig G ab Tag 60, der sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nach einem Jahr fortsetzt.

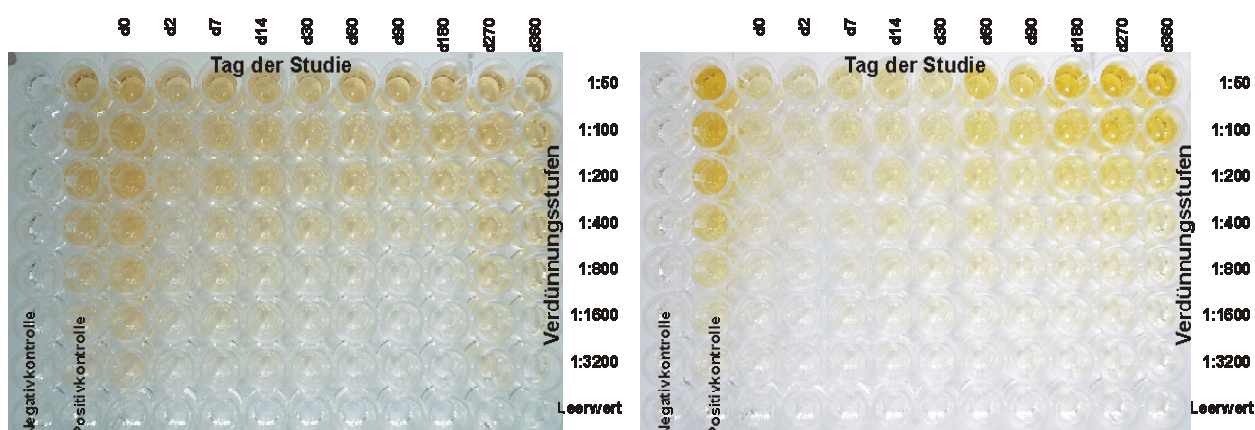


Abbildung 22 (links) und Abbildung 23 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis gegen humanes, rekombinantes IL 2-gerichteter Antikörper, jeweils Katze Nummer 18 (links: Ig M, rechts: Ig G)

Bei den in Lyon mit rekombinanten Adenoviren experimentell infizierten Katzen zeigten sich Antikörper gegen das Transgen dosisabhängig. Nach Injektion von $1,4 \times 10^9$ tp / Tier wurden keine spezifischen Immunglobuline detektiert, nach $1,4 \times 10^{10}$ tp / Tier traten sie spät (Ig M Tag 15, Ig G Tag 22), nach $1,4 \times 10^{11}$ tp / Tier schon sehr früh (Ig M Tag 5, Tod aller Tiere nach Tag 8) in Erscheinung.

3.2.3 Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper

Die Entwicklung des Anstiegens und auch Wiederabfallens antiadenoviraler Antikörper lässt sich visuell auf den Photos der ELISA-Platten direkt nachvollziehen. Der dargestellte Verlauf der Abwehr eines Tieres (Katze Nummer 31) der AdhuIL 2 + AdfeIFN γ -Gruppe zeigt einen Anstieg der antiviralen Ig M zu Tag 14 mit schnell darauf folgender Reduktion (siehe auch Abbildung 24: ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig M). Die Entwicklung der Ig G bis Tag 30, die dann nach Tag 90 stark vermindert sind, wird in Abbildung 10 und Abbildung 11 sichtbar. Dies ist der individuelle Verlauf eines Tieres, der aber typisch für diese gesamte Therapiegruppe ist.

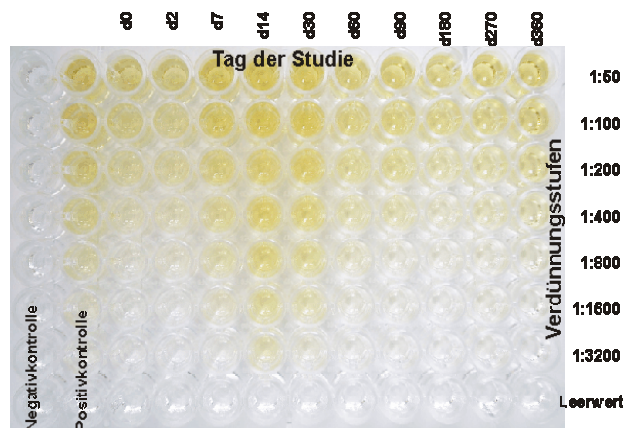


Abbildung 24: ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig M, Katze Nummer 31

Aus Tabelle 13 und Tabelle 14 können alle gemessenen optischen Dichten, die um den Leerwert korrigiert wurden, entnommen werden. Hieraus ergibt sich dann der Vergleich des Verlaufes der antiviralen Immunantwort der unterschiedlichen Therapiegruppen über die Zeit. Auch wenn die optische Dichte bei Messung der Ig M selbst bei negativen Proben sehr hoch

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

liegt (Durchschnitt Kontrollgruppe 0,433) und die Unterschiede zwischen den Therapiegruppen nicht so eindeutig zu Tage treten, so kann man doch klar den Anstieg bei den behandelten Tieren im Vergleich mit denen der Kontrollgruppe beobachten (OD 0,88 in der Gruppe IL 2 + IFN γ im Vergleich mit OD 0,43 in der Kontrollgruppe, Tag 14, Verdünnung 1 : 200).

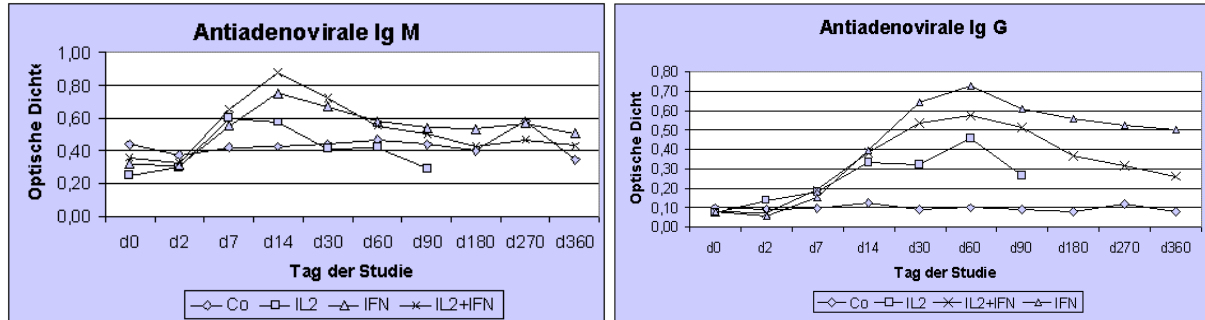


Abbildung 25 (links) und Abbildung 26 (rechts): Verlauf der gegen den Vektor gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G)

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Co	0,26	0,26	0,29	0,33	0,32	0,30	0,27	0,22	0,26	0,10
IFN	0,18	0,17	0,22	0,28	0,23	0,24	0,23	0,22	0,32	0,24
IL 2	0,11	0,12	0,15	0,14	0,10	0,20	0,16	0,00	0,00	0,00
IL 2 + IFN	0,19	0,17	0,27	0,29	0,27	0,24	0,24	0,26	0,28	0,25

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Co	0,07	0,08	0,08	0,11	0,07	0,08	0,07	0,06	0,08	0,06
IFN	0,04	0,03	0,12	0,27	0,27	0,29	0,31	0,30	0,38	0,41
IL 2	0,10	0,13	0,13	0,17	0,14	0,35	0,19	0,00	0,00	0,00
IL 2 + IFN	0,06	0,06	0,17	0,22	0,22	0,29	0,33	0,28	0,21	0,18

Tabelle 11 (oben) und Tabelle 12 (unten): Standardabweichungen zu Abbildung 25 und Abbildung 26

Im Rahmen der Ig G-Evaluierung sieht man nicht nur den Beginn der Immunglobulinsekretion, den Zeitpunkt der maximal im zirkulierenden Blut erreichten Antikörperspiegel und das auch nach einem Jahr noch deutlich erhöhte Vorhandensein antiadenoviraler Immunglobuline im Vergleich mit den Ausgangswerten, sondern auch einen offensichtlichen Unterschied

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

zwischen den Therapiegruppen (siehe auch Abbildung 25 (links) und Abbildung 26 (rechts): Verlauf der gegen den Vektor gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G)). Die schnellste und stärkste humorale Reaktion tritt in der IFN γ -Gruppe auf, in der Kombination mit IL 2 fällt sie etwas schwächer aus. Die Werte der nur mit IL 2 als Transgen behandelten Gruppe liegen noch deutlich über den Kontrolltieren ohne Viruskontakt und zeigen ihren Peak ebenfalls an Tag 60. Dies sind allerdings nur die Mittelwerte von vier Tieren, weshalb die Kurve auch nach Tag 90 und dem Verbleib nur eines Tieres in der Studie nicht mehr weitergezeichnet wurde. Die gemessene optische Dichte der Kontrolltiere bleibt im Mittel über den gesamten Zeitraum niedrig bei 0,1. Hier sind allerdings die Standardabweichungen mit Extremwerten einer optischen Dichte von 0,4 sehr hoch.

Anti-Ad-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0,376		0,506		0,513	0,495	0,725	
3	Kontrolle			0,167	0,268	0,178	0,149	0,171	0,126		
4	Kontrolle	0,479	0,341	0,552	0,507	0,547	0,461	0,318	0,381	0,455	0,268
5	0,2x10e8 IL2+IFN	0,297	0,294	0,176	0,894	0,615	0,496	0,396	0,288		
6	Kontrolle	1,034	1,012	0,981	1,056	1,247	1,215	1,159	0,995	0,898	
7	Kontrolle	0,356	0,376	0,625	0,552	0,418	0,911	0,970			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	0,475	0,372	0,489	0,592	0,533	0,495		0,359		
9	Kontrolle	0,985	1,001	1,323	1,619	1,447					
10	0,2x10e8 IL2+IFN	0,291	0,261	0,282	0,174	0,330	0,323	0,307	0,274		
11	0,2x10e8 IL2+IFN	0,528	0,469	0,568	0,577	0,593	0,508	0,398			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	0,146	0,132	0,256	0,399	0,412	0,279	0,304	0,314	0,310	0,249
13	1,0x10e8 IL2+IFN	1,530	0,848	1,165	1,066	0,955	1,414	1,235	1,005	0,828	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0,175	0,257	0,544	1,048	0,684	0,551				
15	1,0x10e8 IL2+IFN	0,346	0,423	0,876	0,832	0,633	0,415	0,299	0,203	0,274	0,328
16	5,0x10e8 IL2+IFN	0,161	0,138	0,518	0,501	0,445	0,214	0,131	0,167	0,162	0,162
17	5,0x10e8 IL2+IFN	0,175	0,143	0,449	0,541	0,341	0,139	0,089	0,125	0,059	0,086
18	5,0x10e8 IL2+IFN	0,394	0,272	0,732	0,726	0,678	0,518	0,497	0,371	0,497	0,212
19	5,0x10e8 IL2+IFN	0,341	0,290	0,689	0,899						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0,419	0,361	0,590	0,837	0,779		0,507	0,389	0,394	0,425
21	5,0x10e8 IL2+IFN	0,176	0,151	0,585	0,811	0,838	0,681	0,480	0,290		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0,238	0,198	0,324	0,858	0,328					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0,162	0,196	0,477	0,449	0,380	0,212	0,145	0,132	0,086	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0,860	0,634	1,023	0,910	0,658	0,859	0,700	0,770	0,739	0,549
25	5,0x10e8 IL2+IFN	0,251	0,240	0,611	0,810	0,622	0,362				
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0,321	0,239	0,677	1,750	1,395	1,021	0,949			

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-Ad-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
27	Kontrolle	0,501	0,407	0,634	0,656	0,362	0,699	0,786			
28	Kontrolle	0,445	0,415	0,462	0,526	0,519	0,303	0,527	0,437	0,618	0,444
29	5,0x10e8 IL2+IFN	0,740	0,826	1,654	1,638	1,410		0,985	1,031	1,128	0,971
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0,449	0,305	0,304	0,826	0,600					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	0,423	0,486	0,630	0,906	0,872	0,554	0,590	0,450	0,611	0,471
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0,210	0,127	0,524	0,930	0,596	0,403	0,518	0,393		
33	5x10e8 IFN	0,266	0,223	0,381	0,770	0,458	0,915				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0,246	0,252	0,503	0,730		0,582	0,566	0,595		
35	Kontrolle	0,332	0,260	0,324	0,191	0,268					
36	5,0x10e8 IL2+IFN	0,559	0,496	0,730	1,082	0,752	0,614	0,341			
37	Kontrolle	0,482	0,352	0,375	0,325	0,393	0,407	0,308	0,386		
38	5,0x10e8 IL2	0,294	0,190	0,549	0,875		0,700	0,559			
39	Kontrolle	0,284	0,268	0,295	0,305	0,243	0,333	0,304			
40	Kontrolle	0,168	0,198	0,195	0,207	0,352	0,323	0,417	0,478	0,311	0,342
41	5,0x10e8 IL2	0,184	0,199	0,638	0,516	0,281	0,216	0,155	0,104	0,128	0,156
42	5,0x10e8 IFN	0,516	0,583	0,721	0,690	0,621	0,477	0,515	0,455	0,451	0,341
43	Kontrolle	0,351	0,373	0,329	0,268	0,332	0,481	0,428	0,347	0,445	0,390
44	5,0x10e8 IL2	0,406	0,504	0,844	0,561						
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0,193	0,342	0,843	1,195	0,917	0,795	0,721			
46	Kontrolle	0,498	0,313	0,267	0,217	0,352	0,404	0,321	0,367	0,479	
47	Kontrolle	0,182	0,108	0,116	0,189	0,198	0,285	0,243	0,154		
48	5,0x10e8 IFN	0,124	0,085	0,209	0,563	0,397	0,416	0,387	0,355		
49	Kontrolle	0,176	0,192	0,175	0,166	0,321	0,207	0,160			
50	Kontrolle	0,374	0,582	0,306	0,278						
51	5,0x10e8 IL2+IFN	0,139	0,116	0,948	0,667	0,460	0,168	0,125	0,091	0,214	0,110
52	5,0x10e8 IFN	0,193	0,211	0,438	0,750	0,696	0,609	0,455			
53	Kontrolle	0,157	0,138	0,132							
54	5,0x10e8 IL2	0,259	0,196	0,478	0,461	0,526	0,261	0,296			
55	5,0x10e8 IL2	0,047	0,357	0,711	0,549						
56	5,0x10e8 IL2+IFN	0,327	0,271	0,348	0,475	0,485	0,459	0,355	0,374	0,404	0,424
57	5,0x10e8 IFN	0,191	0,173	0,289	0,489	0,424	0,233				
58	5,0x10e8 IL2	0,310	0,359	0,398	0,492	0,435	0,506	0,156			
59	5,0x10e8 IFN	0,252	0,312	0,626	0,345	0,812	0,595				
60	5,0x10e8 IL2+IFN	0,467	0,315	0,524	0,746	0,696					
61	Kontrolle	0,941	0,427	0,496	0,354	0,628	0,652	0,396			
62	5,0x10e8 IFN	0,843		0,997	1,131	1,218	1,207	1,159	1,034	1,362	1,038
63	5,0x10e8 IFN	0,413	0,430	0,590	0,797	0,868	0,494	0,338	0,351		
64	5,0x10e8 IFN	0,523	0,376	0,625	0,641	0,594	0,543	0,502	0,513	0,583	0,472
65	Kontrolle	0,461	0,327	0,369	0,369	0,317	0,642	0,574	0,551	0,624	0,454
66	Kontrolle	0,430	0,223	0,215	0,326	0,279	0,372	0,511	0,596	1,070	
67	Kontrolle	0,345	0,230	0,195	0,234	0,270					
68	5,0x10e8 IL2+IFN	0,152	0,123	0,599	0,656	0,484	0,246	0,225	0,174	0,467	0,195
69	5,0x10e8 IFN	0,478	0,419	0,641	1,151	0,773	0,696	0,594	0,572	0,430	0,539

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-Ad-Ig M											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
70	5,0x10e8 IL2+IFN	0,736	0,710	0,593	0,782	0,932	1,038	0,765	0,928	0,813	0,834
71	5,0x10e8 IFN	0,251	0,359	0,445	0,467	0,421	0,649	0,407			
72	5,0x10e8 IFN	0,300	0,307	0,599	1,292	0,976	0,889	0,932	0,639	0,618	0,619
73	5,0x10e8 IFN	0,091	0,125	0,542	0,664	0,320	0,302	0,292	0,228	0,284	0,224
74	5,0x10e8 IFN	0,211	0,195	0,241	0,660	0,667	0,682	0,703			
75	5,0x10e8 IL2+IFN	0,395	0,332	0,502	0,754	0,728	0,551				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0,201	0,178	0,364	0,976	0,921	0,684	0,548	0,425	0,562	0,384
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0,399	0,382	0,450	0,826	0,608	0,578	0,467			
78	5,0x10e8 IFN	0,185	0,225	0,877	1,103	0,953	0,692	0,616	0,585	0,506	0,506
79	Kontrolle	0,854	0,933	0,968	0,840	0,845	1,055				
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0,350	0,460	0,423	0,769	0,480	0,626	0,746	0,459	0,535	0,502
81	5,0x10e8 IL2+IFN	0,345	0,449	1,049	1,241	0,573	0,567	0,429	0,471	0,327	0,579
82	Kontrolle	0,074	0,075	0,178	0,213	0,105	0,133	0,087	0,106	0,157	0,171
83	5,0x10e8 IFN	0,337	0,280								
84	Kontrolle	0,195	0,190	0,313	0,138	0,213	0,139				
85	5,0x10e8 IFN	0,341	0,850	0,644	0,821	0,847	0,735	0,762	0,858		
86	5,0x10e8 IFN	0,368	0,337	0,125	0,163	0,532	0,612	0,522	0,456		
87	Kontrolle	0,464	0,195	0,549	0,457	0,246	0,218	0,164	0,198		
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0,555	0,351	0,763	0,868	0,655	0,713	0,443			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	0,327	0,284	0,654	0,998	0,938	0,639	0,639			
90	5,0x10e8 IFN		0,248	0,662	0,944	0,633	0,425	0,277			
91	5,0x10e8 IL2+IFN		0,260	0,803	1,009	1,043	0,651	0,609	0,442	0,379	0,528
92	5,0x10e8 IFN		0,328	0,846	0,902	0,678	0,310	0,495			
93	5,0x10e8 IFN	0,120	0,145	0,552	0,695	0,427	0,197	0,255	0,363	0,316	0,295

Tabelle 13: Untersuchung von Anti-Ad-Ak, optische Dichte der Ig M über die Zeit (Verdünnung 1 : 200)

Anti-Ad-Ig G											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0,054		0,047		0,142	0,054	0,077	
3	Kontrolle			0,016	0,035	0,015	0,015	0,021	0,003		
4	Kontrolle	0,002	0,002	0,015	0,038	0,043	0,023	0,028	0,017	0,027	0,000
5	0,2x10e8 IL2+IFN	0,044	0,024	0,073	0,189	0,243	0,173	0,132	0,068		
6	Kontrolle	0,056	0,036	0,041	0,057	0,069	0,052	0,067	0,047	0,078	
7	Kontrolle	0,040	0,080	0,154	0,141	0,114	0,195	0,217			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	0,078	0,043	0,087	0,113	0,127	0,124		0,067		
9	Kontrolle	0,063	0,084	0,153	0,275	0,201					

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-Ad-Ig G											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
10	0,2x10e8 IL2+IFN	0,057	0,062	0,065	0,046	0,209	0,167	0,144	0,134		
11	0,2x10e8 IL2+IFN	0,101	0,054	0,073	0,106	0,172	0,096	0,076			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	0,030	0,065	0,040	0,173	0,206	0,183	0,121	0,102	0,089	0,081
13	1,0x10e8 IL2+IFN	0,135	0,076	0,082	0,295	0,089	0,422	0,312	0,000	0,149	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0,030	0,022	0,032	0,189	0,361	0,454				
15	1,0x10e8 IL2+IFN	0,052	0,037	0,208	0,191	0,250	0,195	0,138	0,076	0,065	0,042
16	5,0x10e8 IL2+IFN	0,039	0,055	0,430	0,566	0,646	0,274	0,244	0,269	0,399	0,235
17	5,0x10e8 IL2+IFN	0,011	0,020	0,028	0,116	0,329	0,491	0,405	0,411	0,288	0,228
18	5,0x10e8 IL2+IFN	0,203	0,253	0,278	0,365	0,508	0,347	0,246	0,199	0,151	0,144
19	5,0x10e8 IL2+IFN	0,017	0,023	0,091	0,327						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0,042	0,037	0,055	0,169	0,306		0,176	0,121	0,108	0,176
21	5,0x10e8 IL2+IFN	0,276	0,252	0,303	0,571	0,615	0,651	0,442	0,463		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0,022	0,027	0,030	0,483	0,731					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0,059	0,091	0,099	0,219	0,302	0,343	0,119	0,083	0,081	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0,082	0,026	0,111	0,117	0,245	0,202	0,283	0,073	0,176	0,153
25	5,0x10e8 IL2+IFN	0,049	0,026	0,100	0,242	0,402	0,220				
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0,049	0,060	0,125	0,647	0,569	0,680	1,033			
27	Kontrolle	0,121	0,111	0,129	0,126	0,066	0,124	0,104			
28	Kontrolle	0,250	0,267	0,215	0,258	0,232	0,281	0,207	0,188	0,215	0,092
29	5,0x10e8 IL2+IFN	0,005	0,099	0,867	0,410	0,541		0,669	0,383	0,351	0,217
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0,031	0,030	0,061	0,345	0,860					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	0,159	0,129	0,167	0,400	0,338	0,203	0,196	0,152	0,163	0,196
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0,069	0,076	0,095	0,111	0,179	0,152	0,068	0,122		
33	5x10e8 IFN	0,061	0,055	0,085	0,334	0,587	0,646				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0,095	0,066	0,358	0,318		1,197	1,294	1,081		
35	Kontrolle	0,225	0,310	0,297	0,279	0,244					
36	5,0x10e8 IL2+IFN	0,194	0,146	0,149	0,277	0,438	0,442	0,306			
37	Kontrolle	0,058	0,058	0,032	0,057	0,038	0,059	0,023	0,082		
38	5,0x10e8 IL2	0,031	0,346	0,257	0,512		0,976	0,376			
39	Kontrolle	0,020	0,010	0,033	0,028	0,049	0,025	0,050			
40	Kontrolle	0,049	0,064	0,061	0,043	0,034	0,051	0,036	0,049	0,029	0,043
41	5,0x10e8 IL2	0,294	0,292	0,334	0,501	0,520	0,597	0,527	0,669	0,580	0,625
42	5,0x10e8 IFN	0,063	0,055	0,248	0,407	0,580	0,577	0,413	0,393	0,338	0,295
43	Kontrolle	0,091	0,089	0,108	0,096	0,075	0,126	0,104	0,104	0,174	0,148
44	5,0x10e8 IL2	0,059	0,116	0,327	0,478						
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0,101	0,101	0,163	0,511	0,573	0,577	0,353			
46	Kontrolle	0,260	0,224	0,231	0,243	0,212	0,249	0,214	0,191	0,156	
47	Kontrolle	0,053	0,040	0,042	0,036	0,044	0,045	0,028	0,056		
48	5,0x10e8 IFN	0,050	0,034	0,068	0,241	0,524	0,575	0,517	0,489		
49	Kontrolle	0,038	0,030	0,027	0,031	0,047	0,067	0,129			
50	Kontrolle	0,103	0,102	0,160	0,153						
51	5,0x10e8 IL2+IFN	0,023	0,017	0,049	0,114	0,252	0,466	0,418	0,284	0,257	0,154
52	5,0x10e8 IFN	0,012	0,012	0,030	0,346	0,451	0,530	0,492			
53	Kontrolle	0,033	0,029	0,039							
54	5,0x10e8 IL2	0,038	0,025	0,032	0,133	0,244	0,117	0,126			

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anti-Ad-Ig G											
Nummer der Katze		d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
55	5,0x10e8 IL2	0,010	0,023	0,073	0,145						
56	5,0x10e8 IL2+IFN	0,061	0,062	0,259	0,593	0,664	0,445	0,397	0,347	0,319	0,311
57	5,0x10e8 IFN	0,081	0,051	0,097	0,240	0,654	0,779				
58	5,0x10e8 IL2	0,025	0,028	0,053	0,225	0,205	0,142	0,042			
59	5,0x10e8 IFN	0,058	0,050	0,235	0,078	0,610	0,698				
60	5,0x10e8 IL2+IFN	0,033	0,038	0,052	0,290	0,177					
61	Kontrolle	0,114	0,080	0,060	0,089	0,067	0,089	0,057			
62	5,0x10e8 IFN	0,084		0,225	0,773	1,367	1,458	1,419	1,175	1,350	1,371
63	5,0x10e8 IFN	0,066	0,027	0,124	0,227	0,418	0,240	0,163	0,240		
64	5,0x10e8 IFN	0,109	0,074	0,220	0,450	0,575	0,385	0,279	0,202	0,227	0,143
65	Kontrolle	0,151	0,155	0,122	0,185	0,116	0,189	0,131	0,166	0,237	0,178
66	Kontrolle	0,239	0,183	0,170	0,194	0,181	0,175	0,131	0,110	0,168	
67	Kontrolle	0,086	0,045	0,018	0,041	0,051					
68	5,0x10e8 IL2+IFN	0,047	0,043	0,040	0,171	0,459	0,666	0,676	0,323	0,275	0,274
69	5,0x10e8 IFN	0,043	0,046	0,058	0,239	0,329	0,532	0,496	0,209	0,096	0,099
70	5,0x10e8 IL2+IFN	0,091	0,087	0,177	0,486	0,649	0,858	1,027	0,950	0,910	0,846
71	5,0x10e8 IFN	0,075	0,059	0,208	0,329	0,452	0,311	0,160			
72	5,0x10e8 IFN	0,062	0,077	0,103	0,294	0,329	0,622	0,424	0,290	0,226	0,196
73	5,0x10e8 IFN	0,060	0,009	0,060	0,353	0,471	0,927	0,601	0,817	0,734	0,890
74	5,0x10e8 IFN	0,082	0,076	0,149	0,454	0,627	0,833	0,792			
75	5,0x10e8 IL2+IFN	0,021	0,018	0,074	0,240	0,764	0,900				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0,094	0,062	0,114	0,461	0,785	0,804	0,582	0,479	0,551	0,372
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0,082	0,115	0,446	1,047	0,884	0,675	0,546			
78	5,0x10e8 IFN	0,039	0,057	0,110	0,414	0,643	1,147	0,994	0,856	0,656	0,436
79	Kontrolle	0,143	0,120	0,106	0,121	0,165	0,109				
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0,102	0,068	0,233	0,656	0,709	0,537	0,278	0,187	0,152	0,184
81	5,0x10e8 IL2+IFN	0,093	0,043	0,130	0,198	0,406	0,349	0,223	0,127	0,141	0,100
82	Kontrolle	0,010	0,000	0,000	0,004	0,020	0,018	0,023	0,010	0,036	0,030
83	5,0x10e8 IFN	0,087	0,075								
84	Kontrolle	0,106	0,081	0,001	0,010	0,079	0,104				
85	5,0x10e8 IFN	0,152	0,107	0,308	1,247	1,229	0,994	0,621	0,510		
86	5,0x10e8 IFN	0,222	0,055	0,044	0,015	0,877	0,965	0,728	0,728		
87	Kontrolle	0,087	0,032	0,279	0,427	0,021	0,008	0,023	0,028		
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0,051	0,040	0,078	0,189	0,923	1,006	1,009			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	0,053	0,032	0,315	0,750	0,855	0,971	0,994			
90	5,0x10e8 IFN		0,067	0,074	0,324	0,574	0,500	0,600			
91	5,0x10e8 IL2+IFN		0,044	0,102	0,435	0,435	0,965	0,558	0,685	0,506	0,265
92	5,0x10e8 IFN		0,040	0,071	0,294	0,525	0,880	0,721			
93	5,0x10e8 IFN	0,089	0,144	0,565	0,891	1,056	0,964	0,985	0,781	0,564	0,580

Tabelle 14: Untersuchung von Anti-Ad-Ak, optische Dichte der Ig G über die Zeit (Verdünnung 1 : 200)

Die in München therapierten Katzen erhielten eine Dosis von 1×10^9 i. u. / Tier, was bei 20 tp / i. u. einem Wert von 2×10^{10} tp / Tier entspricht. Die den in Lyon untersuchten Katzen verabreichte Dosis lag bei $1,4 \times 10^9$ tp / Tier bis $1,4 \times 10^{11}$ tp / Tier. Die Tiere, die leere Adenoviren erhielten, wurden allerdings mit $1,4 \times 10^{11}$ tp / Tier behandelt. Es zeigte sich dosisabhängig ein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt des Auftretens. Je höher die Dosis, desto früher konnte ein Titeranstieg gesehen werden. In der niedrigsten Dosierung von $1,4 \times 10^9$ tp pro Tier stiegen die antiadenoviralen Ig M erst ab Tag 15 (ebenso die Ig G), in der nächsthöheren Dosis ($1,4 \times 10^{10}$ tp pro Tier) konnte schon ab Tag 8 ein Anstieg beobachtet werden (Ig G ab Tag 15), und in der höchsten Dosierung von $1,4 \times 10^{11}$ tp pro Tier kletterten die Ig M-Werte bereits ab Tag 5. Adenoviren ohne Transgen riefen ab Tag 8 eine Ig M-Antwort sowie ab Tag 15 eine Ig G-Antwort hervor (Dosis $1,4 \times 10^{11}$ tp pro Tier).

3.2.4 Neutralisierende antiadenovirale Antikörper

Das Messen der β -Galaktosidase-Aktivität führt zu absoluten Werten, die in eine prozentuale Neutralisation umgerechnet werden können. Hierzu wird der Wert nicht-infizierter Zellen von dem maximal-infizierter (ohne Zugabe von Serum) abgezogen. Das Ergebnis steht für 100 % Infektion. Hiermit werden alle Probenwerte, die um den Leerwert korrigiert sind, verglichen und auf den Prozentsatz der Neutralisation umgerechnet. Die Ergebnisse der Messung sind durch eine farbliche Abstufung der gefundenen Enzymaktivität, die das Computerprogramm anbietet, auch sehr gut optisch zu erfassen. Abbildung 27 zeigt den Verlauf der Neutralisationskapazität in Proben eines Patienten über ein Jahr in sechs verschiedenen Verdünnungsstufen. Hierbei sind dunkelviolette Felder jene mit einer niedrigen β -Galaktosidase-Aktivität, was ja einer schwachen oder auch nicht-vorhandenen Infektion der Zellen entspricht. In hellrot sieht man Felder hochgradig infizierter Vertiefungen mit hoher Enzymaktivität. Alle Abstufungen sind möglich.

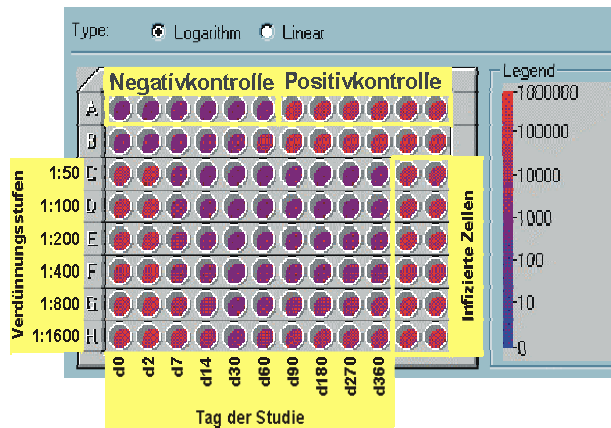


Abbildung 27: Beispielhaftes Ergebnis einer Fluoreszenzmessung: Wellenlänge von 340 nm (System Victor, Wallach)

Nach Umrechnung aller Messergebnisse in Prozentzahlen (siehe auch Tabelle 16: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, Applikation Tumorbett) können diese gemittelt und gruppenweise miteinander verglichen werden. In Abbildung 28 sieht man eine ähnliche Entwicklung wie schon im Nachweis der im ELISA ermittelten antiadenoviralen Immunglobuline. Schon innerhalb der ersten Woche steigt die Möglichkeit der Neutralisation von Viruspartikeln deutlich an und erreicht in einer Verdünnung von 1 : 1600 nach 14 Tagen Werte von ca. 80 %. In einer Verdünnung von z. B. 1 : 400 liegt die gemessene prozentuale Neutralisation schon nach sieben Tagen in jeder Therapiegruppe immer über 80 % und erreicht ab der zweiten Woche Werte von annähernd 100 % Neutralisation, die bis zu drei Monate nach der Therapie konstant hoch bleiben.

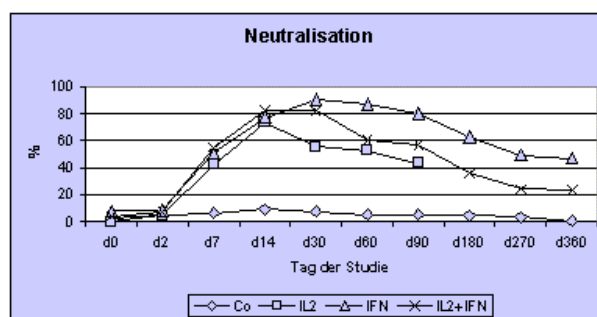


Abbildung 28: Mittelwerte der prozentualen Neutralisationskapazität über den gesamten Untersuchungszeitraum, Applikation Tumorbett, Serumverdünnung 1: 1600

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Standard-abweichung	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
Co	5	8	16	18	17	10	10	11	6	1
IFN	14	13	26	25	6	10	14	22	32	21
IL 2	0	6	31	18	26	31	29			
IL 2 + IFN	13	18	23	10	17	31	35	30	21	18

Tabelle 15: Standardabweichungen zu Abbildung 28

Bis Tag 14 ist der Unterschied zwischen den therapeutischen Gruppen nicht auszumachen, der Abfall neutralisierender Antikörper erfolgt jedoch in der gleichen Abstufung, die man schon in den Kurven der Anti-Ad-Ig G-Entwicklung sehen konnte: Die stärkste humorale Abwehr liegt in der IFN γ -Gruppe vor (Peak Tag 30: 91 %, Verdünnung 1 : 1600), die kombinierte Therapie zweier exprimierter Zytokine führt zu einem kürzeren Verbleib neutralisierender Immunglobuline (Peak Tag 14: 83 %, Verdünnung 1 : 1600), und die Neutralisationskapazität der nur mit Interleukin behandelten Gruppe lässt am schnellsten nach, wobei auch hier wieder nur noch Werte von vier Tieren im angesprochenen Zeitraum gemittelt werden konnten (Peak Tag 14: 73 %, Verdünnung 1 : 1600). Der Prozentsatz neutralisierender Antikörper bei Tieren der Kontrollgruppe verbleibt immer deutlich unter 10 % (Verdünnung 1 : 1600).

Neutralisation, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
2	Kontrolle			0		0		0	0	0	
3	Kontrolle			0	0	0	2	4	0		
4	Kontrolle		5	3	3	3	1	8	0		
5	0,2x10e8 IL2+IFN		2	41	96	91	87	77	58		
6	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	3	0	0	
7	Kontrolle	0	23	24	0	13	7	19			
8	0,2x10e8 IL2+IFN	2	7	50	79	63	46		0		
9	Kontrolle	13	0	1	10	23					
10	0,2x10e8 IL2+IFN		0	1	0	64	28	17	5		
11	0,2x10e8 IL2+IFN		0	52	80	79	50	12			
12	1,0x10e8 IL2+IFN	10	17	81	96	96	95	85	79	71	62
13	1,0x10e8 IL2+IFN		3	74	80	63	84	60	48	43	
14	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	68	82	81	71				
15	1,0x10e8 IL2+IFN		0	70	88	83	64	47	15	0	52
16	5,0x10e8 IL2+IFN		0	68	79	97	26	12	27	28	38

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Neutralisation, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
17	5,0x10e8 IL2+IFN		11	74	82	72	42	21	0	0	0
18	5,0x10e8 IL2+IFN		9	77	79	92	98	90	34	23	16
19	5,0x10e8 IL2+IFN		5	70	84						
20	2,5x10e8 IL2+IFN	0	0	91	75	66		7	0	6	13
21	5,0x10e8 IL2+IFN		10	63	84	97	67	66	60		
22	2,5x10e8 IL2+IFN	0	0	29	81	97					
23	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	44	55	44	15	0	0	8	
24	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	65	62	23	19	13	8	0
25	5,0x10e8 IL2+IFN	8	2	84	90	84	61				
26	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	59	86	80	92	88			
27	Kontrolle		22	42	35	85	44	40			
28	Kontrolle		4	0	0	6	4	7	0	0	3
29	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	72	84	85		50	26	28	30
30	5,0x10e8 IL2+IFN	0	6	71	92	98					
31	5,0x10e8 IL2+IFN	71	100	94	96	64	17	0	2	36	55
32	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	59	84	91	76	66	64		
33	5x10e8 IFN	8	0	7	89	92	89				
34	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	71	80		88	86	81		
35	Kontrolle	0	0	0	0	0					
36	5,0x10e8 IL2+IFN		0	67	89	88	74	88			
37	Kontrolle		0	0	0	0	0	0	0		
38	5,0x10e8 IL2		0	73	97		93	84			
39	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0			
40	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	5,0x10e8 IL2		14	39	85	85	65	57	80	64	2
42	5,0x10e8 IFN		0	0	75	92	81	78	46	0	0
43	Kontrolle	0	0	4	3	0	5	0	0	0	0
44	5,0x10e8 IL2		0	83	75						
45	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	72	78	84	18	56			
46	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	37	0	
47	Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0		
48	5,0x10e8 IFN		13	43	85	83	76	94	93		
49	Kontrolle		0	0	0	0	0	0			
50	Kontrolle		4	3	20						
51	5,0x10e8 IL2+IFN		0	18	70	64	81	81	23	41	31
52	5,0x10e8 IFN		0	40	73	81	83	78			
53	Kontrolle		0	0							
54	5,0x10e8 IL2		0	51	84	59	44	25			
55	5,0x10e8 IL2		0	2	46						
56	5,0x10e8 IL2+IFN		19	14	73	28	31	14	21	2	11
57	5,0x10e8 IFN		13	50	79	100	86				
58	5,0x10e8 IL2		13	6	53	21	9	8			
59	5,0x10e8 IFN		7	76	8	83	90				

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Neutralisation, Applikation Tumorbett											
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180	d270	d360
60	5,0x10e8 IL2+IFN		5	59	78	71					
61	Kontrolle		5	2	0	4	6	0			
62	5,0x10e8 IFN			61	81	91	89	75	69	58	57
63	5,0x10e8 IFN		29	76	89	96	53	36	75		
64	5,0x10e8 IFN		51	82	93	93	80	71	65	34	31
65	Kontrolle		24	0	19	14	15	0	1	13	
66	Kontrolle		23	2	12	7	14	14	22	16	
67	Kontrolle		0	0	0	0					
68	5,0x10e8 IL2+IFN		0	27	78	87	90	91	9	1	0
69	5,0x10e8 IFN		0	67	92	90	98	97	85	68	74
70	5,0x10e8 IL2+IFN		0	44	76	94	97	99	95	72	28
71	5,0x10e8 IFN		0	33	81	84	83	72	70	47	47
72	5,0x10e8 IFN		0	33	81	84	83	72	70	47	47
73	5,0x10e8 IFN		0	77	83	96	94	81	70	88	70
74	5,0x10e8 IFN		0	3	83	92	92	91			
75	5,0x10e8 IL2+IFN		0	10	71	84	41				
76	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	31	79	99	89	80	60	51	56
77	5,0x10e8 IL2+IFN	0	1	52	93	92	24	32			
78	5,0x10e8 IFN	0	0	65	85	94	98	97	3	99	53
79	Kontrolle	2	0	0	0	16	6				
80	5,0x10e8 IL2+IFN	0	0	34	100	92	39	28	15	15	15
81	5,0x10e8 IL2+IFN	12	19	53	98	72	25	7	22	0	8
82	Kontrolle	0	0	1	30	0	0	0	0	0	0
83	5,0x10e8 IFN	0	0								
84	Kontrolle	0	0	4	0	0	0				
85	5,0x10e8 IFN	0	6	74	91	98	86	72	44		
86	5,0x10e8 IFN	0	15	17	1	97	92	87	72		
87	Kontrolle	15	0	70	81	9	0	4	1		
88	5,0x10e8 IL2+IFN	0	10	70	79	99	99	95			
89	5,0x10e8 IL2+IFN	1	11	71	97	93	100	96			
90	5,0x10e8 IFN	50	13	69	94	97	91	77			
91	5,0x10e8 IL2+IFN		0	64	94	96	95	98	85	47	37
92	5,0x10e8 IFN		0	73	83	89	95	94			
93	5,0x10e8 IFN	24	21	68	88	79	96	85	50	0	43

Tabelle 16: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, Applikation Tumorbett (Verdünnung 1 : 1600)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Wenn man die präexistierende Immunität betrachtet, so sieht man in einer Verdünnung des Serums von 1 : 1600 bei 17 % der Patienten eine Neutralisationskapazität von über zehn Prozent. Der Rest hat keine nachweisbaren, das Testvirus neutralisierenden, antiadenoviralen Antikörper vor Beginn der Therapie. Auffällig sind die Katzen Nummer 31 und Nummer 90, die schon vor therapiebedingtem Adenoviruskontakt 71 % bzw. 50 % Neutralisation der Testviren zeigen.

Tabelle 17 listet die Ergebnisse der untersuchten Katze des intratumoralen Applikationsweges auf. Der Vergleich der beiden unterschiedlichen Injektionsorte befindet sich im Kapitel 3.2.5 Vergleich der beiden Applikationswege.

Neutralisation, intratumorale Applikation									
Nummer der Katze	Therapiegruppe	d-14	d-7	d-6	d0	d7	d14	d45	d90
101	5,0x10e8 IL2+IFN			0	34	56		51	36
102	5,0x10e8 IL2+IFN			0	0	27	61	31	0
104	5,0x10e8 IL2+IFN		0	0	0	41	39	7	0
106	5,0x10e8 IL2+IFN		0		32		52	73	85
107	5,0x10e8 IL2+IFN		0	0	43	31	14	0	0
109	5,0x10e8 IL2+IFN			0		0	0	93	34
110	5,0x10e8 IL2+IFN		0	0	52	31	19	2	
111	5,0x10e8 IL2+IFN		0	0	0	0	0	0	0
112	5,0x10e8 IL2+IFN		0				83	87	0
113	5,0x10e8 IL2+IFN		11	1	81				
114	5,0x10e8 IL2+IFN		17		78		54	25	0
115	5,0x10e8 IL2+IFN		22		64				
129	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	83		81	37	0
130	1,0x10e8 IL2+IFN	0	15	11			79	65	64
131	1,0x10e8 IL2+IFN	0	27	36	80		72	44	8
133	1,0x10e8 IL2+IFN	0	0	0	14		1	0	0

Tabelle 17: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, intratumorale Applikation (Verdünnung 1 : 800)

3.2.5 Vergleich der beiden Applikationswege

Der erste Kontakt mit den rekombinanten Adenoviren fand im Tumorbett an Tag 1, dem Tag der Operation statt. Bei präoperativer Therapie wurde die Injektion an den Tagen -7 und -1 durchgeführt, auch hier erfolgte der chirurgische Eingriff an Tag 1. Somit können die Werte Tumorbett d2 / intratumoral d-6 (24 h nach Erstinjektion) und Tumorbett d7 / intratumoral d0 (sechs bzw. sieben Tage nach Erstinjektion) miteinander verglichen werden, wobei die Patienten der Tumorbettapplikation zum zweiten Vergleichstermin schon vier Injektionen erhalten hatten, wohingegen die Tiere der Gruppe mit intratumoraler Behandlung erst zwei Applikationen bekamen. Die vorangegangene Injektion zu diesem Zeitpunkt der Blutentnahme war aber jeweils erst 24 h her.

Es wurden sowohl die Zytokinkonzentrationen als auch das Vorhandensein neutralisierender antiadenoviraler Antikörper im Serum der intratumoral injizierten Katzen gemessen.

3.2.5.1 Interleukin 2-Konzentration

Nach präoperativer intratumoraler Injektion lag trotz gleicher Dosis die Zytokinkonzentration um mehr als das Doppelte über der nach postoperativer Injektion in das subkutane Gewebe (siehe auch Abbildung 29: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der beiden unterschiedlichen Applikationswege bei gleicher Dosis (5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ)). Nach Tumorbettapplikation wurden Werte zwischen 0 pg / ml und 1173 pg / ml bei einem Mittelwert von 286 pg / ml einen Tag nach der Behandlung gemessen (Standardabweichung 282 pg / ml). In der Studie der präoperativen intratumoralen Therapie lag die Spannweite zwischen 133 pg / ml und 1635 pg / ml mit einem arithmetischen Mittel von 716 pg / ml (Standardabweichung 506 pg / ml).

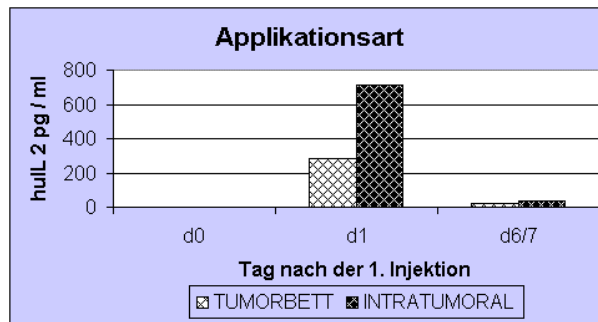


Abbildung 29: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der beiden unterschiedlichen Applikationswege bei gleicher Dosis (5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ)

Standard- abweichung	d0	d1	d6/7
	nach der 1. Injektion		
TUMORBETT	0	282	59
INTRATUMORAL	0	506	57

Tabelle 18: Standardabweichungen zu Abbildung 29

Bei Tieren, bei denen kein IL 2 im Serum nachgewiesen werden konnte, ist mit diesen Methoden keine Transgenexpression zu beweisen. Bei Betrachtung nur der mit der Dosis 5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ behandelten Tiere, da diese bei beiden Applikationsarten eingesetzt wurde, konnte intratumoral bei allen Patienten Interleukin nachgewiesen werden, während das nicht der Fall war nach Injektion ins Tumorbett. Hier bleiben 28 % der Tiere ohne im Serum nachgewiesenes humanes Interleukin. Abbildung 30 zeigt den prozentualen Vergleich von Tieren mit nachweisbarem und nicht-nachweisbarem IL 2 im Blut in den Gruppen mit präoperativer intratumoraler Injektion und postoperativer Applikation ins Tumorbett in einer Dosis von 5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ . So wird der Unterschied der beiden Applikationsarten nicht nur in der Höhe des Zytokinspiegels, sondern auch in der Häufigkeit der Nachweismöglichkeit deutlich. Aus der vorangegangenen Studie von Quintin-Colonna wurde die Überlegung abgeleitet, dass für eine erfolgreiche Therapie Werte von über 200 pg im Serum erreicht werden sollten. Dies gilt also als erhofftes unteres Limit. Der huIL 2-Nachweis liegt in 59 % der Fälle nach Applikation ins Tumorbett über 200 pg / ml, also im erwünschten Bereich, wohingegen dies nach intratumoraler Injektion sogar bei 88 % der Patienten der Fall ist.

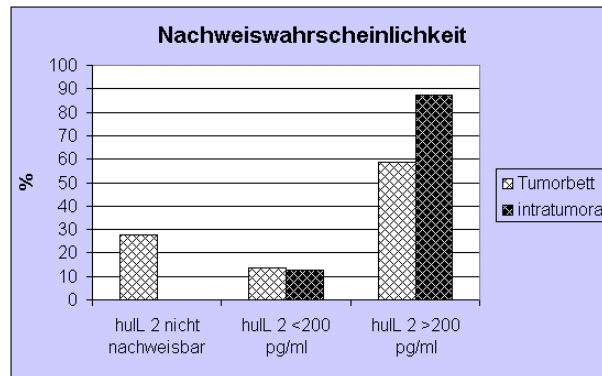


Abbildung 30: Prozent der Tiere, bei denen IL 2 im Serum nicht nachweisbar war, unter dem erhofften Limit lag oder darüber im erwünschten Bereich - im Vergleich der beiden Applikationsarten

3.2.5.2 Neutralisierende antiadenovirale Antikörper

Im Vergleich der beiden Gruppen zeigt sich eine etwas früher einsetzende und klar stärker ausfallende Antwort auf das Virus bei postoperativer Injektion in Gewebe, das sich in einem inflammatorischen Zustand befindet, im Vergleich mit der präoperativen, intratumoralen Applikation. Die Neutralisationskapazität erreicht nach einem Monat fast dreimal so hohe Werte (94 % bei Applikation ins Tumorbett im Vergleich zu 36 % bei intratumoraler Applikation), wenn man eine Verdünnung des Serums von 1 : 800 betrachtet (siehe auch Abbildung 31: Vergleich neutralisierender antiadenoviraler Antikörper zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlicher Applikationsart). In diesem Fall liegen die Standardabweichungen bei 7 % (Tumorbett) bzw. 27 % (intratumoral). Nach weiteren zwei Monaten bei leicht abfallender Neutralisationsfähigkeit verschiebt sich das Verhältnis der prozentualen Kapazität sogar auf 4,4 : 1 mit Standardabweichungen von 26 % bzw. 28 %.

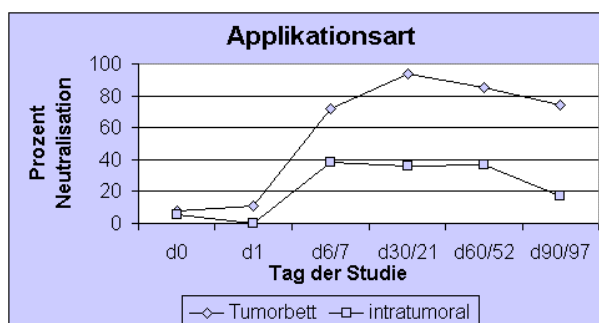


Abbildung 31: Vergleich neutralisierender antiadenoviraler Antikörper zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlicher Applikationsart, Verdünnung 1 : 800

Standard-abweichung	d0	d1	d6/7	d30/21	d60/52	d90/97
	nach der 1. Injektion					
Tumorbett	15	10	17	7	15	26
intratumoral	8	0	30	27	35	28

Tabelle 19: Standardabweichungen zu Abbildung 31

3.2.6 In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen

Im Vorversuch der Zellkulturinfektion ausschließlich mit AdhuIL 2 mit verschiedenen MOI zeigte sich eine deutliche Unterscheidung der Höhe der Transgenexpression in Abhängigkeit des Verhältnisses von Vektoren zu Zellen. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h stieg der IL 2-Spiegel im Überstand noch steil an. Tabelle 20 zeigt die gemessenen Konzentrationen in pg / ml, die in Abbildung 32 veranschaulicht werden. Zur Übersichtlichkeit werden nicht alle MOI graphisch dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	0 h nach der Infektion	24 h nach der Infektion	48 h nach der Infektion	72 h nach der Infektion
MOI 0	0	0	0	0
MOI 1	0	0	0	0
MOI 5	0	0	53	125
MOI 10	0	0	144	346
MOI 25	0	0	324	659
MOI 50	0	0	818	1442
MOI 100	0	84	3350	7641
MOI 500	0	264	13500	28950
MOI 1000	0	1656	65350	81150

Tabelle 20: IL 2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand des Vorversuchs (in pg / ml)

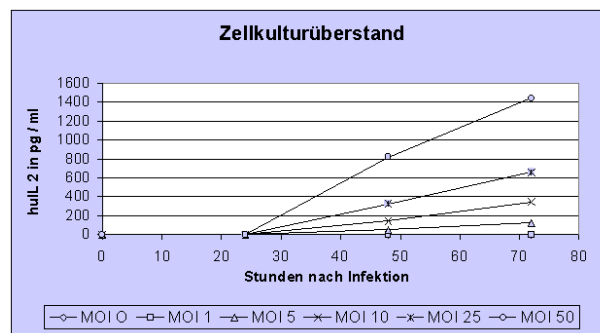


Abbildung 32: Vergleich unterschiedlicher MOI im Zellkulturvorversuch

Eine Untersuchung über einen Zeitraum von 22 Tagen im Vergleich der Infektion mit AdhuIL 2 oder demselben in der Kombination mit AdfeIFN γ zeigte einen Abfall der Transgenexpression ab Tag 5, der bei höheren MOI offensichtlicher in Erscheinung trat. Bei einer MOI von 5 übertraf die Interleukinproduktion der kombiniert infizierten Zellen die der nur einfach transduzierten um ein Mehrfaches, während sich dieser Effekt bei einer MOI von 10 schon tendenziell umkehrte und sich bei noch größeren Verhältnissen der Viren im Vergleich zu den Zellen ins Gegenteil verwandelte. Nur mit AdhuIL 2 infizierte Kulturen produzierten in einer MOI von 25 am sechsten Tag zehnfach so hohe Werte wie kombiniert infizierte Zellen. Diese Entwicklung lässt sich in den folgenden Abbildungen studieren, die die Werte aus Tabelle 21 über die ersten zehn Tage nach der Infektion illustrieren (siehe auch Abbildung 33 (links oben) und Abbildung 34 (rechts oben) und Abbildung 35 (links unten))

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

und Abbildung 36 (rechts unten): Vergleich der Genexpression von AdhuIL 2 oder Adhu-IL 2 + AdfeIFN γ bei verschiedenen MOI über die Zeit).

IL 2	nach der Infektion										
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11
MOI 0	51	49	0	0	0	0	0	0	0	0	
MOI 5	0	100	236	72	136	101	58	43	51	403	123
MOI 10	0	228	782	667	1007	623	448	225	218	979	118
MOI 25	31	1771	3368	3802	4139	3963	3106	1888	1798	1612	410
MOI 50	84	2457	6516	4417	5849	2024	1260	543	553	711	

IL 2	nach der Infektion										
	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22
MOI 0						0				0	0
MOI 5	86	104	57	0	84	48	0	0	0	0	0
MOI 10	86	83	38	99	56	40	0	0	0	0	0
MOI 25	329	914	807	719	674	638	366	310	205	227	177
MOI 50			210						139		48

IL 2 +IFN	nach der Infektion										
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11
MOI 0	0	34	0	0	0	0	0	0	0	0	
MOI 5	0	75	310	439	531	560	496		420	422	252
MOI 10	0	171	501	571	324	281	312	243	292	261	227
MOI 25	0	124	455	488	565	405	506	290	347	156	390
MOI 50	0	1052	3568	3452	1557	920	836	574	414	320	

IL 2 +IFN	nach der Infektion										
	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22
MOI 0						0			0		0
MOI 5	274	244	248	341	264	218	327	82	327	66	0
MOI 10	337	189			149		111	92	0	0	0
MOI 25	317	265	242	169	222	246	116	0	0	66	0
MOI 50			223						36		

Tabelle 21 (oben) und Tabelle 22 (unten): IL 2-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich verschiedener MOI und der einfachen mit der kombinierten Transduktion über 22 Tage (in pg / ml)

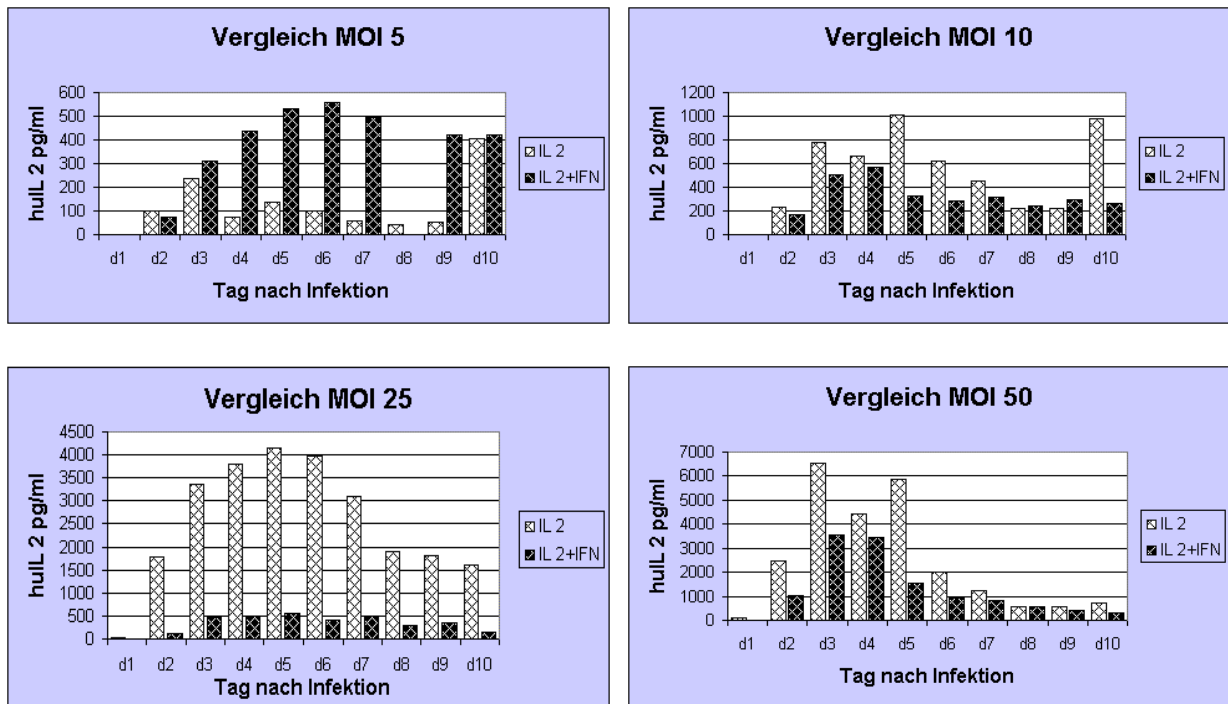


Abbildung 33 (links oben) und Abbildung 34 (rechts oben) und Abbildung 35 (links unten) und Abbildung 36 (rechts unten): Vergleich der Genexpression von AdhuIL 2 oder AdhuIL 2 + AdfeIFN γ bei verschiedenen MOI über die Zeit

3.2.7 Statistische Auswertung

Aus Gründen, die in der Gesamtstudie bedingt sind, wurden in den statistischen Berechnungen nicht immer alle zum jeweiligen Zeitpunkt im Rahmen des immunologischen Monitorings erhobenen Daten mitberücksichtigt. Hier konnten nur Tiere integriert werden, von denen über 180 Tage eine komplette Messstrecke von Daten vorlag.

Es wurden verschiedene Korrelationen, die hypothetisch bestehen könnten, untersucht. Sowohl ein möglicher Zusammenhang zwischen antiadenoviralen Antikörpern mit Leukozyten- oder Lymphozytenwerten als auch mit den Titern von Anti-huIL 2-Antikörpern scheint interessant ebenso wie ein Vergleich der Ig G-Titer mit den Ig M-Titern sowohl bei Immunglobulinen gegen den Vektor wie auch gegen das Transgen.

Es wurde untersucht, ob zwischen der Therapiegruppe, die das IFN γ -Gen erhielt, und der, die zwei Vektoren mit unterschiedlichen zytokinkodierenden Genen bekam, eine Signifikanz des Unterschiedes bestand in der Ausbildung antiviraler Antikörper.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180
S	0,760	0,827	0,654	0,632	0,890	0,626	0,675	0,543

Tabelle 23: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): ELISA Anti-Ad-Ig M

	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180
S	0,521	0,802	0,631	0,363	0,099	0,161	0,408	0,322

Tabelle 24: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): ELISA Anti-Ad-Ig G

Wie auch in der graphischen Darstellung der Antikörperverläufe sichtbar (siehe auch Abbildung 25 (links) und Abbildung 26 (rechts): Verlauf der gegen den Vektor gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G)), wird der Unterschied ab Tag 30 deutlich. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Ig G-Werten beträgt hier 9,9 %, die Wahrscheinlichkeit also, dass diese Unterschiede bei verschiedenen Therapien nicht zufällig auftreten liegt bei 90,1 % (siehe auch Tabelle 23: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): ELISA Anti-Ad-Ig M und Tabelle 24: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): ELISA Anti-Ad-Ig G).

	d0	d2	d7	d14	d30	d60	d90	d180
S	0,982	0,968	0,375	0,479	0,063	0,044	0,094	0,164

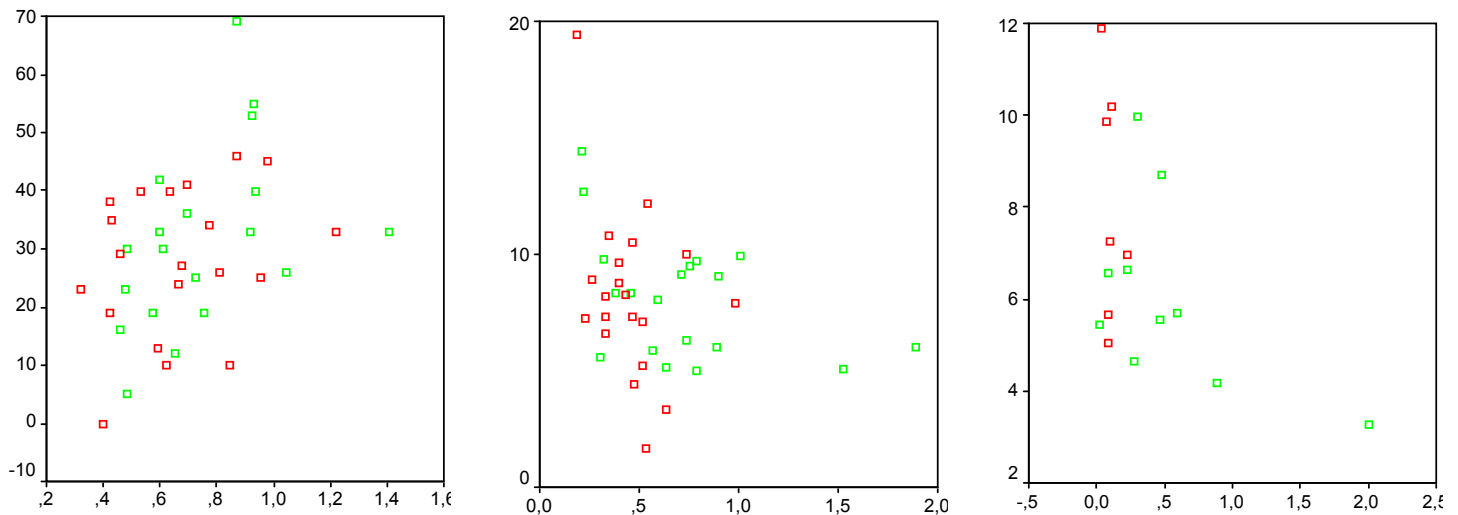
Tabelle 25: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): Neutralisationstest

Bei den neutralisierenden Antikörpern gibt es bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen zwischen Tag 30 und Tag 90 eine Signifikanz von unter 10 % (siehe

auch Tabelle 25: Signifikanzniveau (S) des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (AdfeIFN γ versus AdhuIL 2 + AdfeIFN γ): Neutralisationstest). Die Tendenz ist also: Tiere, die nur mit IFN γ in Kontakt kamen bilden mehr antivektorische Immunglobuline als die der Gruppe mit kombinierter Therapie (siehe auch Abbildung 28: Mittelwerte der prozentualen Neutralisationskapazität über den gesamten Untersuchungszeitraum, Applikation Tumorbett, Serumverdünnung 1: 1600).

Bei der Betrachtung verschiedener Werte der Gruppen IFN γ und IL 2 + IFN γ (nicht nach Therapiegruppen getrennt untersucht) fand sich keine Abhängigkeit nach Pearson (zweiseitige Signifikanz) zwischen antiadenoviralen und Anti-IL 2-Antikörpern genauso wenig wie eine Korrelation von antiviralen Immunglobulinen mit der gemessenen Leukozytenzahl. An Tag 30 korrelieren die antiadenoviralen Ig M mit der evaluierten Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut (Korrelation von 0,378; Signifikanz von 0,05), ebenso wie die Leukozytenwerte an Tag 14 mit Anti-IL 2-Ig M (Korrelation von 0,328; Signifikanz von 0,05) und an Tag 360 mit Anti-IL 2-Ig G (Korrelation von 0,507; Signifikanz von 0,05) eine signifikante Korrelation aufwiesen (siehe auch Abbildung 37 (links): Korrelation an Tag 30, x-Achse: OD Anti-Ad-Ig M, y-Achse: Lymphozyten (in %), Abbildung 38 (Mitte): Korrelation an Tag 14, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig M, y-Achse: Leukozyten (in Tausend) und Abbildung 39 (rechts): Korrelation an Tag 360, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig G, y-Achse: Leukozyten (in Tausend)).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN



grün: Therapiegruppe IL 2 + IFN γ ; **rot:** Therapiegruppe IFN γ (Streudiagramme von Stefan Krieger)

Abbildung 37 (links): Korrelation an Tag 30, x-Achse: OD Anti-Ad-Ig M, y-Achse: Lymphozyten (in %)

Abbildung 38 (Mitte): Korrelation an Tag 14, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig M, y-Achse: Leukozyten (in Tausend)

Abbildung 39 (rechts): Korrelation an Tag 360, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig G, y-Achse: Leukozyten (in Tausend)

Weiterhin ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit der Ausprägung antiadenoviraler Ig M und Ig G, die an Tag 2 (Korrelation von 0,406; Signifikanz von 0,05), Tag 7 (Korrelation von 0,445; Signifikanz von 0,01) und Tag 270 (Korrelation von 0,540; Signifikanz von 0,05) statistisch signifikant wird. Ebenso korrelieren Anti-IL 2-Ig G und Anti-IL 2-Ig M an Tag 14 (Korrelation von 0,378; Signifikanz von 0,05). Hiervon sind keine Streudiagramme abgebildet.

Alle angegebenen Korrelationskoeffizienten geben den Prozentsatz der Streuung der Werte an, die durch den jeweils anderen Wert erklärt wird. So werden z. B. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % an Tag 7 in beiden Therapiegruppen gemeinsam betrachtet 44,5 % der Anti-Ad-Ig M-Werte durch die Streuung der Anti-Ad-Ig G-Werte erklärt.

4 DISKUSSION

Ziel all der vorgestellten Untersuchungen im Rahmen der adenoviralen Gentherapie des Fibrosarkoms ist das Kennenlernen eines kleinen Teils der immunologischen Abläufe im Patientenorganismus während der Therapie. Dies soll zu einer verbesserten Durchführung der klinischen Studie mit aussagekräftigen und begründeten Ergebnissen führen.

Unser Ziel ist die lokale Interleukin- und Interferonproduktion, messbar allerdings bleibt nur die systemische IL 2-Abschwemmung. Für eine Messung am Ort der Transfektion müssten Biopsien aus dem Tumorbett bzw. aus dem Tumor genommen werden. Dieses Vorgehen hielten wir aus ethischen Gründen bei Patienten für nicht zu rechtfertigen. So müssen wir aus den systemisch gewonnenen Blutproben versuchen, Rückschlüsse zu ziehen auf die Expression im Tumorbereich und die Induktion systemischer Immunität.

Die antineoplastische Wirkung von IL 2 ist umgekehrt proportional zu der Tumorgröße (256). Dies kann mit der prozentual größeren Transduktionsrate zusammenhängen oder auch damit, dass das Malignom bei fortgeschrittener Größe meistens schon länger besteht und seine eigene Tolerierung vorantreiben konnte. Auch die möglicherweise schlechtere Durchblutung besonders der inneren Tumorbereiche kann eine Rolle spielen. Dieser Zusammenhang sollte in der zur Zeit durchgeführten Studie bei intratumoraler Applikation untersucht und vielleicht bestätigt werden.

Durch eine starke Streuung der Werte wurde in den meisten Fällen eine sehr große Standardabweichung errechnet. Diese große Spannweite der individuellen Reaktionen ist sehr vielschichtig und kann nicht mit einer Ursache begründet werden. Das Zusammenspiel vieler erwähnter Faktoren von der Art des Tumors, seiner Größe und der schon vergangenen Zeit des voranschreitenden Wachstums über den Immunstatus der Katze, abhängig vom Alter und den bisherigen Herausforderungen an das Immunsystem wie dem vorangegangenen Kontakt mit Adenoviren, hin zu Begleiterkrankungen, die durch ihr Vorhandensein oder ihre Therapie das Geschehen beeinflussen, ist verantwortlich für die in manchen Fällen nur schwer vergleichbaren Werte. Sicher wäre dies in einer Studie an Labortieren mit einer vergleichbaren Ausgangssituation im Sinne eines kontrollierten Kontaktes mit Krankheitserregern, rechtzeitigem Erkennen des Tumors und einer daraus folgenden Behandlung zum gleichen Entwick-

DISKUSSION

lungszeitpunkt anders. Die Grundlage wäre ähnlicher, die Werte homogener und vergleichbarer. Die hier gewählte klinische Studie ist jedoch viel näher an der Realität, bringt aber im Sinne extrahierbarer Ergebnisse einige Nachteile mit sich. Durch die große individuelle Variabilität der Zytokinproduktion oder der Antikörperbildung ist eine große Menge an therapierten Katzen nötig, um einen zuverlässigen Eindruck der Einflussfaktoren bekommen zu können.

4.1 Adenoviren

Um die Funktion eines Transgens wirklich beurteilen zu können, ist ein Vektor wünschenswert, der die biologischen Prozesse nicht beeinflusst. Sonst ist nicht klar abgrenzbar, welche Wirkung welche Ursache hat. Diese Voraussetzung ist allerdings bei Verwendung des Adenovirus als Vektor nicht gegeben. Selbst durch ein „leeres“ Virus ohne Transgen, das sich nicht repliziert, werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in der Folge die Expression einer Reihe von inflammatorischen Genen induzieren. Hierzu gehören z. B. das „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1) oder das „vascular cell adhesion molecule“ (VCAM-1) ebenso wie verschiedenen Zytokine (TNF α , IL 1 β , IL 6, IL 8). Es wird keine adenovirale Genexpression benötigt, auch bei Stimulation mit UV-inaktivierten Viren kann dieser Effekt beobachtet werden (40), ebenso wie bei unvollständigen Viren und inaktivierten viralen Partikeln (165). Dies ist ein klarer Nachteil in der Beurteilung der Zytokinwirkungen, die als Transgen in die Zellen eingeschleust wurden. Die entstehenden Wechselwirkungen sind zu komplex, um sie in-vivo beurteilen oder etwa in-vitro nachstellen zu können. Für die Wirksamkeit der Therapie jedoch stellt dieser Effekt nicht unbedingt einen Nachteil dar. Wie schon in Kapitel 2.7.4 Immunstimulierende Tumorthherapie dargestellt, ist die Induktion einer Entzündung in diesem Zusammenhang kein Nachteil sondern vielleicht sogar notwendig und der alleinige Effekt des Vektors nicht zu unterschätzen.

Allein die Tatsache der induzierten Entzündung durch Injektion von Adenoviren kann zu einer verstärkten antitumoralen Antwort führen, da für den Körper die Präsenz und die Gefahr vorhandener Antigene deutlich wird und infiltrierende Entzündungszellen nicht nur gegen den Vektor, sondern auch gegen entartete Zellen wirksam werden. Beim Fibrosarkom als Malignom, dessen Ursache unter anderem in einer unspezifischen Entzündung liegt oder liegen kann (151), muss dieser Ansatz jedoch gleichzeitig als zusätzliches Risiko gelten. Während einer inflammatorischen Reaktion freigesetzte Sauerstoffverbindungen und -radikale wie O, O₂, OH und H₂O₂ führen zu DNA-Schäden und Mutationen. Die Rolle der Entzündung in der Tumorentstehung ist dadurch nicht nur bei der Katze anerkannt. Die Stadien der Zellaktivierung und die benötigten Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF α , TGF β oder PDGF (platelet-derived growth factor) stimmen überein, egal, ob es sich um die Ausheilung einer entzündlichen Reaktion oder das beginnende Tumorwachstum handelt. In letzterem Fall bleibt die zelluläre Aktivität nur über die Heilung hinaus gesteigert, die Zellfunktionen kehren nicht in den Normalzustand zurück. Granulomatöse Entzündung und Fibroblastenproliferation können Übergänge zwischen Entzündung und Tumorwachstum darstellen (54, 155, 101, 167).

DISKUSSION

Durch eine Verminderung der Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle kann die Virusmenge, die dem Immunsystem korrekt präsentiert wird, stark reduziert werden, die Abwehr mit der Bildung von Immunglobulinen wird dadurch stark verringert (110). Dies trifft auch auf unseren Vergleich der unterschiedlichen Applikationswege zu (siehe auch Kapitel 4.6 Vergleich der beiden Applikationswege). Die Immunantwort gegen den Vektor wird von vielen Parametern beeinflusst, wie z. B. dem Immunstatus des Patienten zum Zeitpunkt der Applikation, dem Applikationsort und auch dem Transgenprodukt und den dagegen gerichteten Abwehrmechanismen (11, 231, 168).

Bei den Katzen wurde die gleiche Dosis Adenoviren eingesetzt wie sie bei Mäusen bei intratumoraler Injektion im Einsatz ist. Jedoch entsprechen 5×10^8 i. u. bei einer 4 kg schweren Katze nur $1,25 \times 10^8$ i. u. / kg oder $2,5 \times 10^9$ tp / kg, während die um den Faktor 200 leichteren Mäuse (ca. 20 g) Dosen von 25×10^9 i. u. / kg oder 500×10^9 tp / kg problemlos tolerieren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass feline Zellen sich ebenso gut wie humane mit dem Adenovirus vom Typ 5 transduzieren lassen, wohingegen zumindest die Genexpression bei Infektion mit demselben Vektor bei murinen Zellen deutlich darunter liegt (102) (siehe auch Abbildung 40: Genexpression unterschiedlicher Zelllinien verschiedener Spezies nach Transduktion durch Adenoviren). Im dargestellten Versuch wurden humane, feline und drei verschiedene murine Zelllinien mit Interleukingen-tragenden Adenoviren infiziert, und die Genexpression wurde gemessen. Die Expression der von der Katze stammenden Kulturen ist ebenso hoch wie die der menschlichen Zellen, bei den Mäusezelllinien gibt es deutliche Unterschiede, wobei einige nur eine minimale Expression beobachten lassen. Dies könnte die Begrenzung nicht durch die Virustoxizität, aber in bezug auf die Transgenotoxizität erklären.

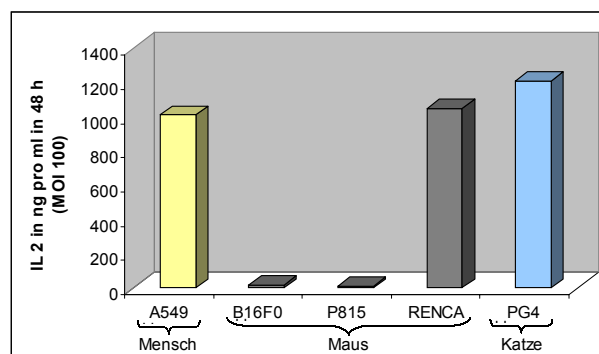


Abbildung 40: Genexpression unterschiedlicher Zelllinien verschiedener Spezies nach Transduktion durch Adenoviren

4.2 Statistische Auswertung

Im Rahmen der Gesamtstudie wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit nicht alle Katzendaten ausgewertet. So konnten die von mir generierten Daten nicht vollständig statistisch ausgewertet werden. Es wurden im Vergleich der antiadenoviralen Antikörper (sowohl bei der Untersuchung im ELISA als auch im Neutralisationstest) zu den verschiedenen Zeitpunkten nur die Unterschiede zwischen der mit IFN γ therapierten Gruppe und der Gruppe berücksichtigt, die eine Kombination zweier Gene erhielt. Die Kontrollgruppe sowie die Interleukin-Gruppe fielen in der Berechnung weg, sodass die Frage nach der Signifikanz der Unterschiede zu diesen Gruppen ungeklärt bleibt. Unklar bleibt auch, ob z. B. der leichte Anstieg der antiadenoviralen Ig M zu Tag 14 in den Therapiegruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe eindeutig ist.

Für die Höhe des Interleukinspiegels an Tag 2 ist es nicht relevant, ob sich die Neoplasie im Nachhinein histologisch nicht als Fibrosarkom bestätigt. Diese Tiere konnten den Einschlusskriterien der Studie gemäß nicht aufgenommen werden, die immunologischen Daten jedoch wurden von mir analysiert. Auch wird die Ausbildung gegen den Vektor gerichteter Immunglobuline in den ersten 60 Tagen in der statistischen Auswertung nicht mehr berücksichtigt, wenn die Katze an Tag 70 ein Rezidiv bekommt oder einen Autounfall erleidet. Dementsprechend müssten in einer erweiterten Auswertung alle 92 untersuchten Katzen mit postoperativer Gentherapie und alle 16 Katzen mit präoperativem Einsatz mitberücksichtigt werden. Es wurden für die Auswertung im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nur Tiere einbezogen, von denen über 180 Tage komplette Messwerte vorlagen.

In der Untersuchung der Korrelationen von hohen Leuko- oder Lymphozytenwerten im peripheren Blut sowie einer Erhöhung der Leberenzymwerte mit dem Auftreten von antiadenoviralen Antikörpern wurden im Rahmen der statistischen Auswertung des Projektes zunächst nur Werte des gleichen Studientages miteinander verglichen. Es stellt sich aber die Frage, ob z. B. Tiere, die an Tag 2 eine Erhöhung der Leberwerte zeigen, vielleicht an Tag 14 oder 30 besonders hohe Antikörpertiter aufweisen, da in diesem Fall eine vermehrte systemische Streuung mit Schwerpunkt in die Leber stattgefunden hat.

Des Weiteren können Hypothesen zum Zusammenhang weiterer Messwerte aufgestellt und evtl. durch eine erweiterte statistische Analyse beantwortet werden:

DISKUSSION

Kann ein Zusammenhang vermutet werden zwischen einer erhöhten Anzahl von Entzündungszellen im Blut oder einer Leberschädigung mit gestreuten Vektoren? Werden diese dann systemisch effektiver bekämpft als die lokal verbleibenden? Wird die Genexpression in diesem Fall vermindert?

Genauso müssen die Interleukinspiegel an Tag 2 mit den Anti-Interleukin-Antikörpertitern verglichen werden, die mehrere Wochen und Monate später gemessen wurden, da das Auftreten der Antikörper selbstverständlich nicht zeitgleich mit dem Ansteigen des Zytokinspiegels gesehen werden kann. Selbst eine Auswertung, ob Tiere, die eine starke antivektorielle Antwort zeigen, auch verstärkt gegen das Zytokin agieren, ist möglicherweise nicht nur im Vergleich des gleichen Studientages aussagekräftig. Und zeigen Tiere mit starker antiviraler Abwehr durch die schnelle Zerstörung der Vektoren verminderte IL 2-Spiegel?

Weitere Fragen, die untersuchenswert scheinen, sind die Auswertung eines Zusammenhanges zwischen der Größe des Tumors und der Interleukinexpression bei intratumoraler Applikation sowie die statistische Signifikanz von schon im Ergebnisteil ausgeführten Fragestellungen wie den gemessenen Unterschieden der Zytokinspiegel in Gruppen mit unterschiedlich hohen Dosen oder der Aussagekraft der Dauer der Interleukinexpression mit und ohne das Vorhandensein gentherapeutisch induzierten Interferons. Diese statistischen Analysen liegen nicht vor.

4.3 Interleukin 2-Konzentration

4.3.1 Dosis

Leider wissen wir zuwenig über die genauen Abläufe der Genexpression und der Zytokinkonzentration im Tumor selbst. Wie viele Zellen wirklich transduziert werden, welche Mengen an Zytokin gebildet werden, wie schnell dieses durch Antikörper inaktiviert wird und welche Wechselwirkungen es zwischen den beiden Transgenen gibt, bleibt weitestgehend im Dunklen. Deshalb ist auch die Abschätzung, ob die lokalen Zytokinkonzentrationen sich im optimal wirksamen Bereich bewegen, nur anhand der klinischen Erfolge und der verminderten Rezidivraten möglich. Erwünscht wäre allerdings ein Verhältnis von IL 2 zu IFN γ von vier zu eins, vorausgesetzt, man kann dies als nachgewiesenermaßen gut wirksame Kombination von der Maus auf die Katze übertragen. Nicht nur zu niedrige Dosen verfehlten die Wirksamkeit, auch zu hohe Dosen führten nicht zum gewünschten Ergebnis, ganz abgesehen von der möglichen systemischen Toxizität. Aus unbekanntem Gründen wird die Generierung tumorspezifischer CTL bei hohen Konzentrationen dieses Zytokins stark beeinträchtigt oder sogar ganz unterbunden, eine Immunitätsentwicklung fehlt (208, 130).

Slos konnte bei Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass die Effizienz eines IL 2-Gen-tragenden Vektors direkt korreliert ist mit der intratumoral produzierten Menge des Interleukins in den ersten 24 h bis 48 h nach der Erstinjektion. Hier ließ sich nach der Therapie mit einem E1⁻/E3⁻-Adenovirus vom Typ 5 mit CMV-Promoter über einen Zeitraum von sieben bis zehn Tagen am Ort der Injektion eine Expression deutlich nachweisen, während der Serumpeak ähnlich unserer Untersuchung nur nach 24 h über der Nachweisgrenze lag. Slos konnte aber eine rechnerische Beziehung zwischen diesen beiden Werten aufstellen, da sie sich zueinander proportional verhalten, sodass sich aus dem Serumwert die IL 2-Menge am Ort der Injektion schätzen lässt. Wenn man die Interleukinkonzentration pro ml auf das Gesamtblutvolumen umrechnet und das Ganze mit dem Faktor zehn multipliziert, erhält man den ungefähren Wert des intratumoral vorhandenen Zytokinspiegels pro mg Tumormasse (216).

Bei einer Katze von 4 kg mit einem Blutvolumen von 7 % ihres Körpergewichts und einem IL 2-Serumspiegel von 286 pg / ml (Durchschnitt der Therapiegruppe IL 2 + IFN γ an Tag 2)

ergibt diese Rechnung eine lokale Konzentration von 801 ng pro mg Tumorgewebe. Bei dieser Rechnung wird vorausgesetzt, dass die Art der Abhängigkeit und der verwendete Faktor von einer Tierart auf die andere übertragen werden können.

4.3.2 Weitere Betrachtungen

Auch wenn mit dem gentherapeutischen Ansatz eine Zytokinexpression über einen verlängerten Zeitraum angestrebt wurde im Vergleich mit der direkten Applikation des rekombinanten Proteins mit seiner sehr kurzen Halbwertszeit, so zeigt sich im Serum unserer Patienten nur ein sehr kurzer Peak. Dies spiegelt nicht zwangsläufig den Ablauf im transduzierten Gewebe selbst wieder. Zu dem Zeitpunkt, an dem kein Interleukin mehr nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob die Proteinexpression lokal nicht mehr vorhanden ist oder ob vielleicht entstehende Antikörper gegen das Produkt Komplexe mit demselben bilden, wodurch die systemische Nachweisbarkeit im ELISA nicht mehr gegeben ist (168).

Die Injektion des Fremdgen-transportierenden Vektors und die darauffolgende Zelltransduktion und Transgenexpression führen nur bei der Erstapplikation zu einem im Serum nachweisbaren Interleukinpeak. Weder die erneute Therapie nach einem Tag in der ersten Studie noch die um sechs Tage versetzte Zweitinjektion bei der intratumoralen Applikation erbringen messbare Ergebnisse. Eine Bestimmung des Interleukinspiegels am Tag nach der Erstinjektion transgentragender Vektoren könnte eine prognostische Aussage machen über die Wahrscheinlichkeit des auftretenden Rezidivs innerhalb des ersten Jahres nach der Operation. Wenn diese Beziehung gefestigt und bestätigt wird, kann daraus folgend die Entscheidung für das weitere Vorgehen fallen.

Ein großes Problem in der Betrachtung der Ergebnisse stellen die immensen Standardabweichungen durch die starke Streuung der Werte dar. Viele Tiere in jeder Gruppe zeigen überhaupt keine messbaren systemischen huIL 2-Werte. Ein systemisch gemessener Wert von 75 pg / ml, der unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Messverfahrens liegt, würde immerhin noch eine lokale Konzentration von 210 ng / mg Tumorgewebe widerspiegeln, wenn man die von Slos postulierte Abhängigkeit zugrundelegt. Möglich wäre eine Untersuchung der intratumoralen Transgenaktivität nach Exstirpation in der Studie mit präoperativer, intratumoraler Transduktion, sodass einerseits die lokalen Abläufe genauer

DISKUSSION

evaluiert werden könnten und andererseits auch eine weitere Korrelation gefunden werden könnte zwischen Serumwerten und Gewebekonzentrationen mit der Antwort auf die Frage, ob niedrige oder nicht-vorhandene Serumlevel auch eine minimale Transfektionsrate und Genexpression bedeuten.

In den Ergebnissen der Toxizitätsstudie aus Lyon konnte der Einsatz der auch von uns verwendeten Dosis als wirksam und tolerabel bestätigt werden. Die in München injizierten 5×10^8 i. u. pro Tier entsprechen 2×10^{10} tp pro Katze. Serumlevel zwischen 274 pg / ml und 609 pg / ml wurden in Lyon bei einer Dosis von $1,4 \times 10^{10}$ tp pro Tier gefunden. Eine weitere Dosiserhöhung war hier mit den physiologischen Abläufen im Katzenorganismus nicht mehr vereinbar. Allerdings stieg der Interleukinspiegel der Versuchstiere erst nach der zweiten Injektion auf maximale Werte an. Dies entspricht nicht unseren Ergebnissen.

4.4 Immunantwort gegen das Transgen

Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Anti-huIL 2-Antikörpern bei der Katze ist hoch. Der Einsatz von feline Interleukin könnte unter dieser Voraussetzung ein Vorteil sein. Eine mögliche Erklärung auf die Frage, warum das Anti-huIL 2-Ig G in der huIL 2 + IFN γ -Therapiegruppe erst so spät auftritt, könnte ein deutlich verzögerter Immunglobulinswitch von Ig M zu Ig G sein, ausgelöst durch den Einfluss des IFN γ .

In der humanmedizinischen Therapie des Nierenzellkarzinoms mit Proleukin® bilden rund 90 % der Patienten Antikörper gegen das nicht körpereigene, aber doch der eigenen Gensequenz entsprechende IL 2. Allerdings sind nur 5 % dieser Immunglobuline in der Lage, das Medikament zu neutralisieren (113). Dieser Test steht in unserer Studie noch aus (siehe auch Kapitel 4.4.1 Kreuzreaktion und Autoimmunität).

Selbst Adenoviren der ersten Generation, die eine starke gegen sie gerichtete Immunantwort hervorrufen, können auch für eine Therapie mit länger anhaltender Expression oder Reapplikation genutzt werden, wenn das Transgen keine oder nur minimale immunogene Eigenschaften besitzt (235).

4.4.1 Kreuzreaktion und Autoimmunität

Es ist durchaus möglich und für den Einsatz rekombinanter, humaner, myeloopoetischer Faktoren beim domestizierten Fleischfresser auch bewiesen, dass sich aufgrund der Unterschiede in der Proteinstruktur bildende Antikörper auch das entsprechende körpereigene Protein erkennen können. Im Fall einer Neutralisierung ist dieses Zytokin für das Individuum überhaupt nicht mehr verfügbar, der Faktor wird vollständig eliminiert (146).

Bei der adenoviralen Gentherapie von Katzen mit dem humanen Lipoproteinlipase-Gen entwickelten die Individuen Antikörper gegen das exprimierte Fremdprotein. Diese waren in der Lage, beim Menschen, aber auch bei Mäusen und Rindern sowie in feline Serumproben die spezieeigene LPL-Aktivität zu verringern, wenn nicht gar vollständig zu hemmen (144).

Bei TNF α wurde die Korrelation der antigenen Kreuzreaktivität mit der Ähnlichkeit der Aminosäurestruktur zwischen den Spezies nachgewiesen (201). Khanna fand allerdings keinen Einfluss caniner Immunglobuline gegen IL 2 auf die Immunlage des Organismus, es

DISKUSSION

wurde keine Immunsuppression ausgelöst, aber die sich vermindernde Aktivität der lysierenden Effektorzellen könnte in Zusammenhang stehen mit dem Anstieg der Antikörper (127).

Neutralisierende Immunglobuline, die sich beim Menschen nach Therapie mit rekombinantem Interleukin bilden, sind zwar selten, aber bei drei von vier Patienten waren diese in der Lage, das körpereigene Zytokin zu erkennen und auch zu eliminieren. Dieser Verlust endogener Botenstoffe stellt ein Risiko dar, wobei allerdings die klinische Relevanz aufgrund bisher nicht vorhandener Daten über hiermit in ursächlichem Zusammenhang stehende Pathologien unklar bleibt (113).

Wichtig für die Erkennung und Neutralisierung ist ja nicht nur die Aminosäuresequenz (Sequenzdeterminante), sondern insbesondere die dreidimensionale Anordnung des Proteins mit ihren Konformationsdeterminanten, die in der Sekundärstruktur, also der Faltung des Proteins begründet sind.

Nach einer zukünftigen Herstellung von felinem IL 2 wäre es wahrscheinlich ohne größere Probleme möglich, im ELISA die Fähigkeit der Bindung feline anti-huIL 2-Antikörper an felines IL 2 nachzuweisen. Die Platte könnte mit dem rekombinanten, der Sequenz der Katze entsprechenden Protein beschichtet werden. Dann würde Serum dazugegeben, inkubiert und die Platte gewaschen, sodass evtl. feline anti-huIL 2-Antikörper an feIL 2 gebunden sind. Diese wiederum würden durch peroxidasegekoppelte Antikörper gegen feline Immunglobuline (z. B. von der Ziege) quantifizierbar gemacht.

Um nicht nur die Bindung, sondern gleichzeitig auch die inhibitorische Funktion nachzuweisen, ist ein biologischer Test notwendig. Man könnte z. B. T-Zellen in-vitro durch Zugabe von feIL 2 zur Proliferation bewegen und dieses messen, um im Vergleich dazu eine Zellkultur mit feIL 2 und Katzenserum zu versetzen, das Antikörper gegen humanes IL 2 enthält. Die verminderte Proliferationskapazität entspricht dann dem Funktionsverlust des katzeigenen Zytokins durch Immunglobuline gegen das speziesfremde Eiweiß.

Im Fall einer Elimination von feIL 2 durch kreuzreagierende Antikörper wird eine allgemeine Immunsuppression der Katze erwartet. Auch die antiadenovirale Abwehr ist in diesem Fall nicht mehr möglich. Dies wurde klinisch in unserer Studie nicht beobachtet.

4.5 Immunantwort gegen den Vektor

Die gegen den Vektor gerichtete Abwehr ist lokal förderlich, die Bildung von Antikörpern und das Ausbilden einer zellulären Immunität jedoch bleibt im Sinne einer anhaltenden Genexpression transduzierter Zellen und im Rahmen der Frage einer eventuellen Reapplikation unerwünscht. Insbesondere aber kann aus der gut messbaren Antwort auf das Virus ein Rückschluss auf die Reaktion gegen das nachweisbare Transgen erfolgen.

Die Immunantwort eines Individuums auf den verwendeten Vektor ist abhängig von vielen Faktoren wie dem Vektor selbst, der Dosis und dem Weg, auf dem er angewandt wird, dem Immunstatus des Patienten im Hinblick auf bestehende lokale und systemische Immunsuppressionen und bereits vorhandene Immunitäten sowie auch dem Einfluss des Transgens. Die Immunogenität desselben beeinflusst stark die Reaktion auch gegen den transportierenden Vektor (231, 57, 119, 168).

Dies kommt auch in den Ergebnissen unserer Studie zum Ausdruck. Mit Interferon behandelte Tiere zeigen eine deutlich verstärkte Immunantwort gegen den Vektor. Dies sieht man zuallererst in der IFN γ -Gruppe, aber fortgesetzt dann auch in der Gruppe der kombinierten Zytokine. Als Erklärungsmöglichkeit bietet sich die heraufgesetzte MHC-Ausprägung, die durch IFN γ induziert wird an, sodass infizierte Zellen häufiger und schneller erkannt und effektiver bekämpft werden können.

Ein Vergleich mit der Reaktion auf die Injektion „leerer“ Adenoviren ohne Transgen wäre wünschenswert und erforderlich, um den Einfluss des Transgens abzuschätzen. Dies ist bei Patientenkatten jedoch aus ethischen Gründen nicht durchführbar. An Versuchstieren wurde diese Applikation praktiziert, die Ergebnisse sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar. Es wurden $1,4 \times 10^{11}$ tp pro Tier verabreicht, was dem siebenfachen der von uns verwendeten Dosis entspricht.

Wenn man die präexistierende Immunität betrachtet, so sieht man in einer Verdünnung des Serums von 1 : 1600 bei 17 % der Patienten eine Neutralisationskapazität von über zehn Prozent. Der Rest hat keine nachweisbaren, das Testvirus neutralisierenden, antiadenoviralen Antikörper vor Beginn der Therapie.

DISKUSSION

Schon die ersten auftretenden Antikörper vom Typ Ig M sind nach den im Neutralisationstest ermittelten Ergebnissen in der Lage, das Virus vollständig unwirksam zu machen. Sie werden dann längerfristig von Ig G unterstützt.

Aus immunologischen Gedächtniszellen erfolgt bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen die zweite Immunreaktion von einem höheren Zellniveau aus als die erste, denn diese haben den Klassenswitch bereits vollzogen, die Mehrzahl beginnt sofort mit der Sekretion von Ig G.

Neben den detektierten neutralisierenden Antikörpern ist auch das Vorkommen nicht-neutralisierender antiadenoviraler Antikörper möglich. Diese wiederum können der Opsonisierung und der Komplementfixierung dienen und somit indirekt viruseliminierend sein (199).

4.6 Vergleich der beiden Applikationswege

Im Fall der Injektion ins Tumorbett wurde jeweils kurzzeitig nach der Operation die Injektion in die direkte Umgebung des Operationsgebietes durchgeführt. Dadurch ist durchaus eine große Wahrscheinlichkeit dafür gegeben, dass ein Teil des rekombinanten Vektors die Blutbahn erreicht und abgeschwemmt wird, sodass Zellen anderer Organe wie z. B. der Leber oder der Lunge transduziert werden. Hier können durch die lokal hohe Zytokinproduktion pathologische Prozesse ausgelöst werden.

Die verstärkte Immunantwort (Höhe der Titer virusneutralisierender Antikörper) nach Applikation ins Tumorbett im Vergleich zur intratumoralen Injektion lässt sich hauptsächlich durch die erhöhte Abschwemmung von Vektoren und die nachfolgende Transduktion von Zellen anderer Organe erklären. Aus der verstärkten Immunantwort und der damit schnelleren Elimination der Viren sowie der transduzierten Zellen erklärt sich dann die verminderte IL 2-Expression bei postoperativer Applikation ins Tumorbett.

Bei der zur Zeit laufenden Phase II der intratumoralen, präoperativen Gentherapie wird die Dosis verwendet ($1,0 \times 10^8$ i. u.), die keine messbaren Interleukinwerte im Serum in der Dosisfindungsstudie erbrachte. Lokal können selbstverständlich ausreichende Level erreicht werden, die Toxizität für den Gesamtorganismus sollte jedoch geringer ausfallen. Auch bei Patienten mit einem Prostatakarzinom konnten die PSA-Werte (prostate specific antigen) trotz im Serum nicht messbarer Interleukinwerte positiv beeinflusst werden, die Therapie hatte Erfolg (171, 28).

4.7 In-vitro-Transfektion von Fibrosarkomzellen

Murine, in-vitro transduzierte Fibrosarkomzellen zeigten innerhalb eines Tages nach einer Infektion mit einer MOI 100 eine IL 2-Produktion von 10 ng / 10⁶ Zellen. Nach Verzehnfachung der MOI (MOI 1000) stieg auch die Zytokinsekretion um den gleichen Faktor an (100 ng / 10⁶ Zellen nach 24 h) (229).

Menschliche Zellen sezernierten 1-2 µg IL 2 pro 10⁶ Zellen über einen Zeitraum von drei bis vier Tagen nach Infektion mit einer MOI von 10. In der gleichen Versuchsreihe transfizierte Mäusezellen blieben um das 50fache bis 100fache unter diesem Wert (2).

In unseren Versuchen handelt es sich um eine feline Mischkultur aus Tumorzellen, normalen Fibrozyten und auch eingewanderten Zellen des Immunsystems. Die Teilungsrate ist nicht vergleichbar mit der im Patienten, da durch ausreichend Platz in der Petrischale und optimale Wachstumsbedingungen durch Zugabe von Glucose und weiteren Nährstoffen sowie dem Fehlen der körpereigenen Abwehr wahrscheinlich eine deutlich bessere Entwicklung gegeben sein dürfte. Durch den fehlenden inflammatorischen Kontext ist die Zell- und Zytokinreaktion nicht vergleichbar mit der Situation im Tier, jegliche Mediatorenwechselwirkungen fehlen vollständig.

Der Interleukinspiegel im Versuch liegt - sowohl was die absolute Höhe als auch was die Dauer der Nachweisbarkeit betrifft - vermutlich höher als in-vivo, da einerseits das Tier transduzierte Zellen bekämpft und die Fremdgenexpression unterdrückt, zweitens aber auch das Interleukin abschwemmt und abbaut oder ausscheidet.

In der Zellkultur wachsen vermutlich insbesondere verstärkt die nicht-infizierten Zellen, sodass transfizierte zurückgedrängt werden. So kommt es nach einigen Tagen zur Verminderung der Transgenexpression und zum Abfall des IL 2-Spiegels.

Es ist nicht möglich, die MOI in-vivo anzugeben. Sie liegt möglicherweise im Stichkanal bei 50000, einige Millimeter daneben nur noch bei 1 und in der Umgebung bei 0 (siehe auch Kapitel 2.5.4 Der Bystander-Effekt). Insofern ist es in dem Bereich nicht denkbar, Rückschlüsse aus der optimalen MOI und der Größe und somit Zellzahl des Tumors auf die Vektorendosis zuzulassen.

4.8 Interferon γ

Unter der Annahme, dass der Verlauf der lokalen und systemischen Konzentration von IFN γ der des Interleukins entspricht, da sie gleichzeitig an gleicher Stelle unter gleichen Bedingungen mit dem gleichen Vektor in gleicher Dosierung demselben Tier injiziert wurden, kann man annehmen, dass auch dieses Zytokin einen Serumpeak an Tag zwei zeigt und über neun Tage im Tumor und dem umliegenden Gewebe in verstärktem Maße nachweisbar wäre. Nach Puisieux und Lollini ist dies vielleicht eine zu kurze Wirkdauer und könnte im Gegenteil sogar dem Tumorwachstum Vorschub leisten, da zu Beginn eine erhöhte Malignität transformierter Zellen auftreten kann, während anhaltende IFN-Spiegel die Immunogenität erhöhen (siehe auch Kapitel 2.4 Interferon γ) (145).

Weiterhin zeigt sich in unserer Studie in-vitro bei bestimmten MOI und in-vivo der Effekt des verminderten IL 2-Spiegels bei gleichzeitiger Therapie mit IFN γ . Schon Kircheis konnte das frühe Abfallen der IL 2-Expression in-vitro im Rahmen der Koexpression mit IFN γ zeigen (130). Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze:

- Möglich ist die Konkurrenz der rekombinanten Adenoviren um zu infizierende Zellen, die sich nach Infektion einer Zelle mit zwei Viren, die unterschiedliche Transgene tragen, fortsetzt.
- Bekannt ist der negative regulatorische Effekt von IFN γ auf den CMV-Promoter, sodass die Transkription gehemmt wird (siehe auch Kapitel 2.4.2 Einfluss auf den Gentransfer). Eine Interferonexpression führt also durch Inhibition zu einer niedrigeren Interleukinexpression. Möglicherweise ist dieser Vorgang begründet in einer verstärkten Aktivierung von NK-Zellen durch IFN γ , die wiederum den Level an TNF α erhöhen, was als proinflammatorisches Zytokin die Hemmung des viralen Promoters bedingt.
- Der antiproliferative und antivirale Effekt des IFN γ kann indirekt durch Reduktion der Vektoren sowie der transduzierten Zellen zu einer verminderten IL 2-Produktion führen.

So können zwar durch Hemmung eines Lymphokins, Antikörpergabe oder in Tierversuchen auch bei Knock-Out-Tieren einzelne Zytokine unterdrückt und dadurch ein Teil der Therapie oder der Expression beeinflusst werden, aber es ist schwierig, den ganzen Prozess so zu

lenken, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt ein definiertes Zytokinmuster im Körper bzw. in bestimmten Körperregionen entsteht. Bedingt durch das Fehlen eines Zytokins in der Kaskade fehlt dann auch die Induktion weiterer Komponenten des Systems. Botenstoffe oder von ihnen induzierte Lymphokine fehlen möglicherweise an anderer Stelle für die antineoplastische Wirkung oder in der Regulation der Immunantwort.

Gentragende Vektoren werden häufig in einem zytokinreichen (da entzündlichen) Kontext eingesetzt, der durch eine lokale Erkrankung, einen chirurgischen Eingriff, die Injektion und die Viren selbst und zusätzlich durch die transferierten und exprimierten Zytokingene hervorgerufen oder unterhalten wird. Die Wege der Informationsübertragung durch diese zwischen den Zellen vermittelnden Eiweißstoffe sind nur bruchstückhaft oder gar nicht bekannt.

Die Überlebenskurven der IL 2-Gruppe und der Therapiegruppe, die die beiden kombinierten Zytokine erhielt, liegen noch nicht ausgewertet vor. Es zeigen die nun gemessenen Zytokinwerte aber, dass ein Rezidiv bei hohem gemessenen Interleukinspiegel im Serum, also auch hoher lokaler Genexpression, unwahrscheinlicher wird. Dieser Zusammenhang ist zunächst statistisch nicht verifiziert worden. Um aber mit einer entsprechenden Dosis des Vektors möglichst viele Zellen transduzieren zu können, ohne die tolerable Toxizitätsgrenze zu überschreiten, wird die Schutzwirkung des Interferons benötigt.

Für IFN γ wird ein Mitwirken an der Ausbildung autoimmuner Krankheiten vermutet. Bei Patienten mit multipler Sklerose schreitet die Krankheit nach Gabe von Interferon schneller fort, bei Diabetes Typ 1 spielt das Vorhandensein IFN γ -produzierender Lymphozyten in der Bauchspeicheldrüse eine wichtige Rolle in der Pathogenese (51) (siehe auch Kapitel 4.9 Gefahren der zytokinvermittelten Immunstimulation). Ob bei den in dieser Studie mit dem IFN γ -Gen behandelten Katzen eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krankheiten mit autoimmuner Komponente nachgewiesen werden kann, ist Gegenstand der Dissertation von Jenny Ludwig (Phase II-Studie einer adjuvanten immunstimulierenden Genterapie nach chirurgischer Entfernung feliner Fibrosarkome (in Vorbereitung)).

4.9 Gefahren der zytokinvermittelten Immunstimulation

Am Beispiel des IFN γ wurde gezeigt, dass die verstärkte Expression von MHC-Molekülen zu einer Prädisposition führt, autoimmune Erkrankungen auszubilden (170). Fentiman konnte besonders eine Häufung von primärem Hypothyreoidismus nach Interferonbehandlung bei Brustkrebs beobachten (63). Aber auch IL 2 steht im Verdacht, Autoimmunkrankheiten auszulösen (7). Unspezifische Gelenk- und Muskelschmerzen gehören zu den häufigsten Begleiterscheinungen einer solchen Zytokintherapie, manchmal führen sie zu dem Symptomenkomplex der rheumatoiden Arthritis mit morgendlicher Steifheit und vermehrt gefüllten Gelenken, besonders der Finger- und Handgelenke, sowie im Serum nachweisbaren Rheumafaktoren (153). Auch aus dermatologischer Sicht lässt sich sagen, dass der Auslöser unspezifischer, pruriginöser Dermatitis und Fälle von Psoriasis und Pemphigus oder bullösem Pemphigoid auf eine Interleukinbehandlung zurückzuführen sind (170). Einige Morbus Crohn-Patienten erlebten im Rahmen der Zytokintherapie einen erneuten heftigen Krankheits Schub (217). Heath konnte zeigen, dass autoreaktive T-Zellen, die der Selektion im Thymus entkommen konnten, aus unklaren Gründen erst im Organismus verblieben, ohne eine Reaktion auszulösen. Nach Kontakt mit IL 2 allerdings, das aus pankreatischen Zellen sezerniert wurde, lösten die T-Zellen mit dieser Zytokinhilfe sofort eine autoimmune Diabeteserkrankung bei Mäusen aus (93).

4.10 Immunität und Weiterführung der Therapie

Auch wenn hohe Antikörpertiter eine erneute Applikation der intratumoralen Gentherapie bei der Maus auszuschließen scheinen (216), so kann doch nicht von humoralen Parametern auf die Immunität des Gesamtorganismus geschlossen werden, ohne die zelluläre Komponente und auch lokale Mechanismen wie die Mukosaprotektion zu betrachten. Die Gewichtung der verschiedenen lokalen und systemischen Komponenten kann bei Infektionskrankheiten je nach Erreger unterschiedlich sein.

Während bei der felines Panleukopenie die Serumantikörperspiegel exakt mit dem Schutz gegen eine Infektion korrelieren, braucht die Katze gegen das feline Coronavirus wegen der Replikation in der Mukosa hier eher den lokalen Ig A-Schutz. Bei der viralen Rhinotracheitis sind fast ausschließlich zelluläre Abwehrmechanismen gefragt, die gemessenen Antikörpertiter haben keine Aussagekraft bezüglich des Verlaufes der Erkrankung. Bei der Bekämpfung der Caliciviren müssen humorale und zelluläre Abwehr gemeinsam agieren. Dies zeigt nur, wie differenziert serologische Daten betrachtet werden müssen, um die Stärke und Dauer einer Immunität bestimmen zu können (44). Weitergehende Untersuchungen sind erforderlich, wobei die zelluläre Immunität insbesondere durch Belastungstests gut charakterisiert werden kann.

Vorhandene Antikörper führen beim Ablauf einer Infektion sowohl zu einer stark reduzierten Zellinfektionsrate als auch zu einer verbesserten Bekämpfung bereits infizierter Zellen. Im Rahmen einer viralen Gentherapie heben jedoch mehrere Gründe die zelluläre Komponente im Rahmen der Verminderung der Transgenexpression in den Vordergrund: Unabhängig davon, ob Antikörper schon vorhanden waren oder nicht, fällt die Expression schon in der zweiten Woche nach Applikation deutlich ab. Umgekehrt können beim Neonaten erzeugte Antikörper durch die induzierte T-Zell-Toleranz ihre Wirkung nicht entfalten. Weiterhin führt die Cyclosporinbehandlung durch T-Zell-Blockade zu einer verlängerten Genexpression nach adenoviralem Gentransfer (72).

Michou leitete aus einem Mausmodell die Aussage ab, dass bei der Auslöschung der Transgenexpression die zelluläre Abwehr gegen virale Antigene nur eine untergeordnete Rolle spielt im Vergleich mit dem Einfluss sowohl zellulärer als auch humoraler Mechanismen, die gegen Transgenprodukte gerichtet sind (168).

DISKUSSION

Im Sinne einer Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunität über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinaus, kann an eine mögliche weiterführende Therapie gedacht werden. Da im Rahmen einer intratumoralen Adenovirusapplikation die neutralisierenden Antikörper für die lokale Wirksamkeit keine große Rolle spielen, die systemischen Nebenwirkungen aber verhindern oder wenigstens vermindern, sind gute Voraussetzungen gegeben, eine erneute adenovirale Gentherapie nach einigen Monaten durchzuführen. Dadurch, dass die Streuung von Viren behindert wird, verändert sich in Untersuchungen von Wildner die Enzymkonzentration z. B. der Serumamylase nicht, und es entstehen keine systemischen Blutwertveränderungen im Sinne einer Neutrophilie (243).

Außerdem ist beispielsweise zur Weiterführung einer Immuntherapie des feline Fibrosarkoms eine Behandlung mit bestrahlten, modifizierten Fibrosarkomzellen denkbar. Die Voraussetzungen für die Herstellung einer solchen Tumorkvakzine wurden durch den Nachweis der Produktion einer definierten Zytokinmenge durch kultivierte und adenoviral transfizierte Fibrosarkomzellen der Katze im Rahmen dieser Arbeit geschaffen.

Möglich wäre auch eine Induktion oraler Toleranz gegenüber dem verwendeten Transgen. Eine Fütterung mit rekombinantem, inaktiviertem, humanem IL 2 könnte die gegen das Transgen gerichtete Abwehr vermindern, transduzierte Zellen blieben länger erhalten und könnten die Phase der wirksamen Genexpression verlängern.

4.11 Schlussbetrachtung und Ausblick

Es bleiben noch viele Möglichkeiten offen, durch weitere Laboruntersuchungen mehr Informationen über die Reaktionen des Immunsystems, ihre Spezifität und Dauer zu bekommen. In Durchflusszytometrie-Analysen können Subpopulationen feline Lymphozyten unterschieden und so quantifiziert werden, um den prozentualen Anteil von CD 4⁺- und CD 8⁺-Zellen zu bestimmen und ihr sich möglicherweise mit der Zeit veränderndes Verhältnis zueinander zu charakterisieren (52).

Auch feline Zytokine können inzwischen mit Hilfe einer PCR auf der Basis des mRNA-Levels nachgewiesen werden, nachdem eine Quantifizierung vorher schon auf dem Proteinlevel über ELISAs, ELISPOTs oder biologische Funktionstests möglich war. Nachdem die Sequenzen wichtiger Zytokine wie IL 4, IL 10, IL 12, IL 16 und auch IFN γ bekannt sind und katzenspezifische Primer zur Verfügung stehen, kann so auch in kleinen Probenmengen nach mehrjähriger Tiefgefrierung noch mit guter Genauigkeit die Zytokin-Genexpression bestimmt werden. Die Fehlerquote bei Verwendung nicht-speziesspezifischer Primer liegt bei 22facher bis 4200facher Fehlmessung. Unklar bleibt aber die Korrelation zwischen der Expression der mRNA und der Produktion des funktionalen Proteins (204, 139).

Wichtiger als die Verbesserung aller messbaren Parameter, die Steigerung der Anzahl aktivierter T-Lymphozyten, die Verlängerung der Dauer der Genexpression oder die Frage der tolerablen Zytokindosis ist allerdings das Endergebnis klinischer Studien, die Heilungsrate, die im Idealfall auch in fortgeschrittenem Krankheitsstadium erzielt werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen einer adenoviralen Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze nutzten wir das humane Interleukin 2 (huIL 2)-Gen und das feline Interferon γ (feIFN γ)-Gen einzeln oder in Kombination. Das Ziel der Studien bestand darin, das Toxizitätsrisiko und das therapeutische Potential mehrfacher Injektionen von Adenoviren (Typ 5), die zur Expression immunstimulierender Gene führen, als adjuvante Therapie bei Katzen mit spontan auftretender Neoplasie zu ermitteln.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene immunologische Parameter untersucht wie die Zytokinkonzentration, Antikörper unterschiedlicher Klassen gegen Vektor und Transgen und deren Neutralisationsfähigkeit im Zusammenhang mit der Frage nach dem Auftreten von Adenoviren bei Katzen, einer präexistierenden Immunität und dem Einfluss entzündlicher Verhältnisse sowie der Applikationsart.

Die Kinetik der IL 2-Produktion in unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen wurde untersucht. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit. Die Level, die bei Tieren gemessen wurden, die mit einer Kombination beider Gene behandelt wurden, waren niedriger als die der Tiere, die nur AdhuIL 2 erhielten. Erklärungsmöglichkeiten sind das Herunterregulieren des viralen CMV-Promoters durch das Vorhandensein von Interferon, die Konkurrenz der zwei Transgene, eine Zelle zu transduzieren, und der antiproliferative und antivirale Effekt von IFN γ , der direkt zu einer Reduktion des Vektors und der infizierten Zellen führt und hierdurch indirekt die IL 2-Produktion vermindert. Außerdem spielte die Applikationsart eine wichtige Rolle: Die Zytokinkonzentration im Serum war nach intratumoraler Injektion doppelt so hoch wie nach postoperativer Anwendung im Tumorbett.

Der Serumpeak 24 Stunden nach der Vektorapplikation, der schnell wieder abfiel, ist nicht der entscheidende Faktor für die Beurteilung des Verlaufes der Zytokinkonzentration, die lokal am Ort des Tumors beobachtet werden kann. In der Literatur finden sich eher Angaben über eine konstante lokale Produktion über neun Tage mit einer Intensität, die um das Zehnfache über der im Blut gemessenen liegt. Es gibt Hinweise, dass der IL 2-Serumlevel am Tag nach dem ersten Gentransfer eine Prognose für das Auftreten eines Rezidivs innerhalb des ersten Jahres ermöglicht.

ZUSAMMENFASSUNG

Es zeigt sich ebenfalls die Tendenz in-vitro-infizierter Zellen, ohne die Gegenwart von IFN γ mehr IL 2 zu produzieren. Es gibt derzeit keine Möglichkeit, feIFN γ per ELISA zu bestimmen.

Weiterhin wurde die Entwicklung von Anti-huIL 2-Antikörpern für den Zeitraum eines Jahres nach gentransportierender Vektorapplikation überwacht. In der nur mit IL 2 behandelten Gruppe traten die Immunglobuline früh auf (Tag 30), wohingegen ein später Anstieg der Ig G in der zusätzlich mit IFN γ -therapierten Gruppe beobachtet wurde (Tag 90 bis 180).

Durch ELISAs und biologische Tests zur Messung der Antikörper, die fähig sind, das applizierte Adenovirus zu erkennen oder auch zu neutralisieren, konnte der Einfluss des Transgens auf die antiadenovirale Immunantwort genauso wie die Abhängigkeit vom Applikationsort, in den der Vektor injiziert wird, gezeigt werden. Antivirale Ig M treten ab Tag 14, Ig G ab Tag 30 in Erscheinung, wobei ihr Auftreten bei mit Interferon behandelten Tieren (alleinig oder in der Zytokinkombination) ausdrücklich häufiger war. Selbst in starken Serumverdünnungen erreicht die Neutralisationskapazität schon nach einer Woche sehr hohe Prozentsätze. Außerdem hängt die Immunantwort auf den Vektor ebenso von der Applikationsart ab, was sich in stark reduziertem Vorkommen neutralisierender Antikörper nach intratumoraler Injektion zeigt im Vergleich mit der postoperativen Gabe ins tumorumgebende Gewebe. Die gleichzeitig auch verminderte Abwehr gegen das Transgen darf in diesem Fall vermutet werden.

Insgesamt sind die immunologischen Methoden geeignet, ein immunologisches Monitoring von veterinärmedizinischen Patienten während einer adenoviralen Gentherapie zu gewährleisten und die Reaktionen auf den applizierten viralen Vektor und das exprimierte Transgen zu dokumentieren.

6 SUMMARY

Immunological monitoring in the context of gene therapy of feline fibrosarcomas

Cytokine kinetics and humoral response to vector and transgene

In the context of an adenoviral gene therapy of the fibrosarcoma of the cat we introduced the human interleukin 2 (huIL 2)-gene and the feline Interferon γ (feIFN γ)-gene, one or the other or a combination of both. The aim of these studies is to evaluate the toxic risk and the therapeutic potential of multiple injections of two adenoviral vectors (type 5) expressing immunostimulating genes as adjuvant therapy in cats with spontaneous cancers.

Several immunological parameters such as cytokine concentration, antibodies of different classes against vector and transgene and their neutralizing capacity were examined in the thesis at hand in connexion with the questions of adenoviruses in cats, pre-existing immunity and influence of inflammatory context and way of application.

The kinetic of the production of IL 2 in different therapeutic approaches was evaluated. A dose-dependency was shown. The levels found in the group treated with a combination of both genes were lower than in the group treated with just AdhuIL 2. Prospects of explanations are the shutdown of the viral CMV-Promoter due to the presence of interferon, the rivalry of the two transgenes to transduce a cell and the antiproliferative and antiviral effect of IFN γ which directly reduces vectors and infected cells and indirectly lowers the IL 2-production by this means. More than that the application mode played an important role: The plasmic cytokine concentration was more than doubled after intratumoral injection compared to a postoperative use to the tumour's bed.

The serum peak 24 hours after vector application, which quickly redescended, is no decisive factor for the course of cytokine concentration observed locally at the tumor site. Literature shows rather a consistent local secretion for a period of nine days with intensity ten times higher than measured in blood circulation. There are indices that the serum level of IL 2 the day after the first gene transfer may be predictive for the appearance of recidivism within the first year.

The tendency of infected cells in-vitro to express more IL 2 without the presence of IFN γ is the same. The possibility to dose feIFN γ per ELISA is presently not given.

SUMMARY

Furthermore the development of anti-huIL 2-antibodies was surveyed for a period of one year following the gene-carrying vector application. The immunoglobulins appeared early in the group of treatment with IL 2 alone (day 30), and a tardily rise of Ig G was detected in the therapeutic group with association to IFN γ (day 90 to 180).

By measuring the existing antibodies capable to detect or to neutralize as well the used adenovirus in ELISAs and biological assays the influence of the transgene on the antiadenoviral immune response could be proofed as well as the influence of the lieu of administration in which the vector is applied. Antiviral Ig M showed up day 14 and Ig G day 30, but their occurrence was much higher in animals treated with interferon (solitary or in association). The neutralizing capacity reached high percentages even in elevated dilutions after just one week. Moreover the immunological response to the vector depends on the application mode in terms of considerably reduced neutralizing antibodies after intratumoral injection compared to the postoperative inoculation to the tumor-surrounding tissues. The parallel-lessened defence to the transgene in this case may be assumed.

Altogether the described methods are convenient to ensure an immunological monitoring of veterinary patients during an adenoviral gene therapy and to document the reactions to the applied viral vector and the expressed transgene.

7 RESUME

Surveillance immunologique du chat lors de la thérapie génique du fibrosarcome félin

Cinétique des cytokines et réponse humorale contre vecteur et transgène

Dans le contexte d'une thérapie génique adénovirale du fibrosarcome du chat nous avons introduit les gènes de l'interleukine 2 humaine (huIL 2) ou de l'interféron γ félin (feIFN γ), seuls ou en combinaison. Le but de ces études est d'évaluer le risque toxique et le potentiel thérapeutique d'injections multiples de deux vecteurs adénoviraux (type 5), contenant des gènes immunostimulateurs, comme thérapie adjuvante dans des cancers spontanés des chats.

Plusieurs paramètres immunologiques comme la concentration des cytokines, des anticorps de classes différentes contre le vecteur ou le transgène et leur capacité de neutralisation ont été examinés dans la thèse présentée en rapport avec la question d'adénovirus chez le chat pour déterminer l'impact de l'immunité anti-adénovirale préexistante, l'influence d'un contexte inflammatoire et le mode d'administration.

La cinétique de la production d'IL 2 dans différentes approches thérapeutiques a été évaluée. Une relation dose-réponse a été démontrée. Les niveaux trouvés dans le groupe traité avec une combinaison de deux gènes étaient plus bas que dans le groupe traité avec AdhuIL 2 seul. Ces résultats peuvent être expliqués par la coupure du promoteur viral CMV due à la présence de l'interféron dans le tissu, la compétition des deux vecteurs à transgènes différents à transcrire une cellule et l'effet antiprolifératif et antiviral de l'IFN γ qui limite la persistance de l'infection et engendre de ce fait une baisse de la production d'IL 2. De plus, le mode d'administration joue un rôle important: La concentration de cytokines dans le sérum a plus que doublé après une injection intratumorale, contrairement à une application postopératoire dans le lit tumoral.

Le pic de concentration de cytokines dans le sérum, qui apparaît 24 heures après l'administration du vecteur et qui disparaît très vite, n'est pas un facteur décisif pour l'évolution de la concentration de cytokine observée localement au site de la tumeur. La littérature montre plutôt une sécrétion locale continue pour une période de neuf jours, avec une intensité dix fois plus élevée que celle mesurée dans la circulation sanguine. Certaines

RÉSUMÉ

indications montrent que le niveau d'IL 2 dans le sérum, un jour après le premier transfert génétique, peut refléter les risques d'une récurrence au cours de la première année.

La tendance des cellules infectées in-vitro d'exprimer plus d'IL 2 sans la présence d'IFN γ est la même. La possibilité de doser feIFN γ par ELISA n'est actuellement pas donnée.

En outre l'apparition d'anticorps anti-huIL 2 a été surveillée pendant un an, après administration du vecteur porteur des gènes. Ces immunoglobulines se produisent tôt dans le groupe de traitement avec l'IL 2 seul (jour 30), et une hausse tardive des Ig G a été détectée dans le groupe thérapeutique avec l'association d'IFN γ (jour 90 à 180).

En mesurant la quantité d'anticorps capables de détecter ou de neutraliser même l'adénovirus utilisé, par des tests d'ELISA et biologiques, l'influence du transgène sur la réponse immunitaire anti-adéovirale et aussi l'influence de l'endroit de l'application dans lesquels les vecteurs sont injectés ont été démontrées. Les Ig M antiviraux se manifestaient jour 14 et les Ig G jour 30, mais étaient, en l'occurrence, beaucoup plus forte chez des animaux traités avec l'interféron (seul ou en association). La capacité de neutralisation atteint des pourcentages élevés à des dilutions importantes après une semaine de traitement. De plus, la réponse immunologique contre le vecteur dépend de la voie d'administration: la quantité d'anticorps neutralisants est nettement réduite après injection intratumorale, contrairement à une inoculation postopératoire dans les tissus autour de la tumeur. La défense contre le transgène peut être soupçonnée d'être diminuée en parallèle.

En tout, les méthodes décrites sont adéquates pour garantir une surveillance immunologique des patients vétérinaires lors d'une thérapie génique adéovirale et pour témoigner les réactions au vecteur viral appliqué et au transgène exprimé.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. ACSADI, G., O'HAGAN, D., LOCHMULLER, H., PRESCOTT, S., LAROCHELLE, N., NALBANTOGLU, J., JANI, A., KARPATI, G. **(1998)**
Interferons impair early transgene expression by adenovirus-mediated gene transfer in muscle cells
J Mol Med, 76, 442-450
2. ADDISON, C.L., BRACIAK, T., RALSTON, R., MULLER, W.J., GAULDIE, J., GRAHAM, F.L. **(1995)**
Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model
Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 8522-8526
3. ADDISON, C.L., BRAMSON, J.L., HITT, M.M., MULLER, W.J., GAULDIE, J., GRAHAM, F.L. **(1998)**
Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors
Gene Ther, 5, 1400-1409
4. AMIN, R., WILMOTT, R., SCHWARZ, Y., TRAPNELL, B., STARK, J. **(1995)**
Replication-deficient adenovirus induces expression of interleukin-8 by airway epithelial cells in vitro
Hum Gene Ther, 6, 145-153
5. ARYA, S.K., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C. **(1984)**
Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA
J Immunol, 133, 273-276
6. ATCC **(2002)**
Catalog: Cell lines - Product information
7. ATKINS, M.B. **(1993)**
Autoimmune disorders induced by interleukin-2 therapy
In: Atkins, M.B., J.W. Mier (Hrsg.): *Therapeutic applications of interleukin-2*, Ausgabe, Marcel Dekker
New York: 389-408
8. BADOVINAC, V.P., TVINNEREIM, A.R., HARTY, J.T. **(2000)**
Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma
Science, 290, 1354-1358
9. BAILEY, A., MAUTNER, V. **(1994)**
Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes
Virology, 205, 438-452
10. BARNES, P.J. **(1997)**
Current therapies for asthma. Promise and limitations
Chest, 111, 17-26
11. BARR, D., TUBB, J., FERGUSON, D., SCARIA, A., LIEBER, A., WILSON, C., PERKINS, J., KAY, M.A. **(1995)**
Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains
Gene Ther, 2, 151-155
12. BAUER, R.M., OLSEN, R.G. **(1988)**
Parameters of production and partial characterization of feline interleukin 2
Vet Immunol Immunopathol, 19, 173-183

LITERATURVERZEICHNIS

13. BAUVOIS, B., WIETZERBIEN, J. (2002)
Interferone: Biologische Aktivitäten und klinische Anwendungen
In: Virbac (Hrsg.): *Interferone in der Kleintiermedizin*, 1. Ausgabe, Virbac: 8-27
14. BAYER, GESCHÄFTSBEREICH VETERINÄR, LEVERKUSEN
Baypamun(R) - Product information
15. BEALL, C.J., PHIPPS, A.J., MATHES, L.E., STROMBERG, P., JOHNSON, P.R. (2000)
Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector
Gene Ther, 7, 534-539
16. BEIER, D.C., COX, J.H., VINING, D.R., CRESSWELL, P., ENGELHARD, V.H. (1994)
Association of human class I MHC alleles with the adenovirus E3/19K protein
J Immunol, 152, 3862-3872
17. BENIHOUD, K., SAGGIO, I., OPOLON, P., SALONE, B., AMIOT, F., CONNAULT, E.,
CHIANALE, C., DAUTRY, F., YEH, P., PERRICAUDET, M. (1998)
Efficient, repeated adenovirus-mediated gene transfer in mice lacking both tumor necrosis factor alpha
and lymphotoxin alpha
J Virol, 72, 9514-9525
18. BENIHOUD, K., SALONE, B., ESSELIN, S., OPOLON, P., POLI, V., DI GIOVINE, M.,
PERRICAUDET, M., SAGGIO, I. (2000)
The role of IL-6 in the inflammatory and humoral response to adenoviral vectors
J Gene Med, 2, 194-203
19. BENIHOUD, K., YEH, P., PERRICAUDET, M. (1999)
Adenovirus vectors for gene delivery
Curr Opin Biotechnol, 10, 440-447
20. BENNETT, J., PAKOLA, S., ZENG, Y., MAGUIRE, A. (1996)
Humoral response after administration of E1-deleted adenoviruses: immune privilege of the subretinal
space
Hum Gene Ther, 7, 1763-1769
21. BERG, G., RÜSSE, M. (1994)
Der Einsatz von Baypamun HK(R) in der Mammatumorbildung der Hündin
Tierarztl Umschau, 8, 476-480
22. BLANAS, E., CARBONE, F.R., ALLISON, J., MILLER, J.F., HEATH, W.R. (1996)
Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen
Science, 274, 1707-1709
23. BÖTTCHER, E. (1994)
Clinical trials and field experience with parapoxvirus-based immunostimulants in companion animals
Symposium about Immunomodulators of the W.A.V.M.I., Perugia, Italy: 28-33
24. BOUMPAS, D.T., ANASTASSIOU, E.D., OLDER, S.A., TSOKOS, G.C., NELSON, D.L., BALOW,
J.E. (1991)
Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at
the level of nuclear transcription
J Clin Invest, 87, 1739-1747
25. BRAMSON, J.L., HITT, M., ADDISON, C.L., MULLER, W.J., GAULDIE, J., GRAHAM, F.L. (1996)
Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-
lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12
Hum Gene Ther, 7, 1995-2002
26. BRAMSON, J.L., HITT, M., GAULDIE, J., GRAHAM, F.L. (1997)
Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral
administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination
Gene Ther, 4, 1069-1076

LITERATURVERZEICHNIS

27. BRENNER, M. (1999)
Gene transfer by adenovectors
Blood, 94, 3965-3967
28. BRILL, T. (2002)
Persönliche Mitteilung, München Januar 2002
29. BRODY, S.L., METZGER, M., DANIEL, C., ROSENFELD, M.A., CRYSTAL, R.G. (1994)
Acute responses of non-human primates to airway delivery of an adenovirus vector containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA
Hum Gene Ther, 5, 821-836
30. BYRNES, A.P., RUSBY, J.E., WOOD, M.J., CHARLTON, H.M. (1995)
Adenovirus gene transfer causes inflammation in the brain
Neuroscience, 66, 1015-1024
31. CHEN, L., LINSLEY, P.S., HELLSTROM, K.E. (1993)
Costimulation of T cells for tumor immunity
Immunol Today, 14, 483-486
32. CHEN, P., KOVESDI, I., BRUDER, J.T. (2000)
Effective repeat administration with adenovirus vectors to the muscle
Gene Ther, 7, 587-595
33. CHEN, P., TIAN, J., KOVESDI, I., BRUDER, J.T. (1998)
Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis
J Biol Chem, 273, 5815-5820
34. CHEN, Y., YU, D.C., CHARLTON, D., HENDERSON, D.R. (2000)
Pre-existent adenovirus antibody inhibits systemic toxicity and antitumor activity of CN706 in the nude mouse LNCaP xenograft model: implications and proposals for human therapy
Hum Gene Ther, 11, 1553-1567
35. CHRIST, M., LOUIS, B., STOECKEL, F., DIETERLE, A., GRAVE, L., DREYER, D., KINTZ, J., ALI HADJI, D., LUSKY, M., MEHTALI, M. (2000)
Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products
Hum Gene Ther, 11, 415-427
36. CHRIST, M., LUSKY, M., STOECKEL, F., DREYER, D., DIETERLE, A., MICHOUE, A.I., PAVIRANI, A., MEHTALI, M. (1997)
Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response
Immunol Lett, 57, 19-25
37. CHROBOCZEK, J., BIEBER, F., JACROT, B. (1992)
The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2
Virology, 186, 280-285
38. CIPPITELLI, M., SICA, A., VIGGIANO, V., YE, J., GHOSH, P., BIRRER, M.J., YOUNG, H.A. (1995)
Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun
J Biol Chem, 270, 12548-12556
39. CLAY, T.M., HOBEIKA, A.C., MOSCA, P.J., LYERLY, H.K., MORSE, M.A. (2001)
Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer
Clin Cancer Res, 7, 1127-1135

LITERATURVERZEICHNIS

40. CLESHAM, G.J., ADAM, P.J., PROUDFOOT, D., FLYNN, P.D., EFSTATHIOU, S., WEISSBERG, P.L. (1998)
High adenoviral loads stimulate NF kappaB-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells
Gene Ther, 5, 174-180
41. COLOMBO, M.P., RODOLFO, M. (1995)
Tumor cells engineered to produce cytokines or cofactors as cellular vaccines: do animal studies really support clinical trials?
Cancer Immunol Immunother, 41, 265-270
42. COUCH, R.B., CATE, T.R., FLEET, W.F., GERONE, P.J., KNIGHT, V. (1966)
Aerosol-induced adenoviral illness resembling the naturally occurring illness in military recruits
Am Rev Respir Dis, 93, 529-535
43. COX, J.H., BENNINK, J.R., YEWDELL, J.W. (1991)
Retention of adenovirus E19 glycoprotein in the endoplasmic reticulum is essential to its ability to block antigen presentation
J Exp Med, 174, 1629-1637
44. COYNE, M.J., BURR, J.H., YULE, T.D., HARDING, M.J., TRESNAN, D.B., MCGAVIN, D. (2001)
Duration of immunity in cats after vaccination or naturally acquired infection
Vet Rec, 149, 545-548
45. COZZI, P.J., PADRID, P.A., TAKEDA, J., ALEGRE, M.L., YUHKI, N., LEFF, A.R. (1993)
Sequence and functional characterization of feline interleukin 2
Biochem Biophys Res Commun, 194, 1038-1043
46. CRYSTAL, R.G. (1995)
Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success
Science, 270, 404-410
47. CRYSTAL, R.G., MCELVANEY, N.G., ROSENFELD, M.A., CHU, C.S., MASTRANGELI, A., HAY, J.G., BRODY, S.L., JAFFE, H.A., EISSA, N.T., DANIEL, C. (1994)
Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis
Nat Genet, 8, 42-51
48. CUSACK, J.C., SPITZ, F.R., NGUYEN, D., ZHANG, W.W., CRISTIANO, R.J., ROTH, J.A. (1996)
High levels of gene transduction in human lung tumors following intralesional injection of recombinant adenovirus
Cancer Gene Ther, 3, 245-249
49. DAI, Y., SCHWARZ, E.M., GU, D., ZHANG, W.W., SARVETNICK, N., VERMA, I.M. (1995)
Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression
Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 1401-1405
50. DALGLEISH, A.G. (1994)
The role of IL-2 in gene therapy
Gene Ther, 1, 83-87
51. DE MAEYER, E., DE MAEYER-GUIGNARD, J. (1998)
Interferon-Gamma
In: Mire-Sluis, A.R., Thorpe, R. (Hrsg.): *Cytokines*, 1. Ausgabe, Academic Press San Diego: 391-400
52. DEAN, G.A., QUACKENBUSH, S.L., ACKLEY, C.D., COOPER, M.D., HOOVER, E.A. (1991)
Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats
Vet Immunol Immunopathol, 28, 327-335

LITERATURVERZEICHNIS

53. DEMATTEO, R.P., RAPER, S.E., AHN, M., FISHER, K.J., BURKE, C., RADU, A., WIDERA, G., CLAYTOR, B.R., BARKER, C.F., MARKMANN, J.F. (1995)
Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus
Ann Surg, 222, 229-239
54. DODDY, F.D., GLICKMAN, L.T., GLICKMAN, N.W., JANOVITZ, E.B. (1996)
Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites
J Comp Pathol, 114, 165-174
55. DOW, S.W., ELMSLIE, R.E., WILLSON, A.P., ROCHE, L., GORMAN, C., POTTER, T.A. (1998)
In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma
J Clin Invest, 101, 2406-2414
56. DRANOFF, G., JAFFEE, E., LAZENBY, A., GOLUMBEK, P., LEVITSKY, H., BROSE, K., JACKSON, V., HAMADA, H., PARDOLL, D., MULLIGAN, R.C. (1993)
Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity
Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 3539-3543
57. ELMSLIE, R.E., DOW, S.W. (1997)
Genetic immunotherapy for cancer
Semin Vet Med Surg (Small Anim), 12, 193-205
58. ENGELHARDT, J.F., SIMON, R.H., YANG, Y., ZEPEDA, M., WEBER-PENDLETON, S., DORANZ, B., GROSSMAN, M., WILSON, J.M. (1993)
Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study
Hum Gene Ther, 4, 759-769
59. ENGELHARDT, J.F., YE, X., DORANZ, B., WILSON, J.M. (1994)
Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver
Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 6196-6200
60. EUN, H.M., MÄHL, P., LEBREUX, B. (2002)
Wirksamkeit von Omega-Interferon felinen Ursprungs bei der Behandlung der Parvovirose des Hundes
In: Virbac (Hrsg.): *Interferone in der Kleintiermedizin*, 1. Ausgabe, Virbac: 28-38
61. FALLAUX, F.J., BOUT, A., VAN DER VELDE, I., VAN DEN WOLLENBERG, D.J., HEHIR, K.M., KEEGAN, J., AUGER, C., CRAMER, S.J., VAN ORMONDT, H., VAN DER EB, A.J., VALERIO, D., HOEBEN, R.C. (1998)
New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses
Hum Gene Ther, 9, 1909-1917
62. FARRAR, M.A., SCHREIBER, R.D. (1993)
The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor
Annu Rev Immunol, 11, 571-611
63. FENTIMAN, I.S., THOMAS, B.S., BALKWILL, F.R., RUBENS, R.D., HAYWARD, J.L. (1985)
Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer
Lancet, 1, 1166
64. FENWICK, B.W., SCHORE, C.E., OSBURN, B.I. (1988)
Human recombinant interleukin-2(125) induced in vitro proliferation of equine, caprine, ovine, canine and feline peripheral blood lymphocytes
Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 11, 51-60

65. FORNI, G., GIOVARELLI, M., CAVALLO, F., CONSALVO, M., ALLIONE, A., MODESTI, A., MUSIANI, P., COLOMBO, M.P. (1993)
Cytokine-induced tumor immunogenicity: from exogenous cytokines to gene therapy
J Immunother, 14, 253-257
66. FREEMAN, S.M., ABOUD, C.N., WHARTENBY, K.A., PACKMAN, C.H., KOEPLIN, D.S., MOOLTEN, F.L., ABRAHAM, G.N. (1993)
The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified
Cancer Res, 53, 5274-5283
67. FRIEDMAN, A., AL-SABBAGH, A., SANTOS, L.M., FISHMAN-LOBELL, J., POLANSKI, M., DAS, M.P., KHOURY, S.J., WEINER, H.L. (1994)
Oral tolerance: a biologically relevant pathway to generate peripheral tolerance against external and self antigens
Chem Immunol, 58, 259-290
68. GADIENT, R.A., PATTERSON, P.H. (1999)
Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury
Stem Cells, 17, 127-137
69. GAHERY-SEGARD, H., MOLINIER-FRENKEL, V., LE BOULAIRE, C., SAULNIER, P., OPOLON, P., LENGAGNE, R., GAUTIER, E., LE CESNE, A., ZITVOGEL, L., VENET, A., SCHATZ, C., COURTNEY, M., LE CHEVALIER, T., TURSZ, T., GUILLET, J.G., FARACE, F. (1997)
Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study of the immune responses to transgene and viral products
J Clin Invest, 100, 2218-2226
70. GARDEY, L., DE MARI, K., MAYNARD, L. (2002)
Behandlung feliner Retrovirusinfektionen: Aktuelle Therapien und Möglichkeiten der Anwendung von Omega-Interferon
In: Virbac (Hrsg.): *Interferone in der Kleintiermedizin*, 1. Ausgabe, Virbac: 57-75
71. GHOSH, A.K., DAZZI, H., THATCHER, N., MOORE, M. (1989)
Lack of correlation between peripheral blood lymphokine-activated killer (LAK) cell function and clinical response in patients with advanced malignant melanoma receiving recombinant interleukin 2
Int J Cancer, 43, 410-414
72. GILGENKRANTZ, H., DUBOC, D., JUILLARD, V., COUTON, D., PAVIRANI, A., GUILLET, J.G., BRIAND, P., KAHN, A. (1995)
Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response
Hum Gene Ther, 6, 1265-1274
73. GINSBERG, H.S., MOLDAWER, L.L., SEHGAL, P.B., REDINGTON, M., KILIAN, P.L., CHANOCK, R.M., PRINCE, G.A. (1991)
A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia
Proc Natl Acad Sci U S A, 88, 1651-1655
74. GINSBERG, H.S., PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C., WILCOX, W.C. (1966)
A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits
Virology, 28, 782-783
75. GLITZ, F. (2002)
Wirkungen und Einsatzmöglichkeiten eines Immunmodulators (Baypamun) bei Nutztieren
Tierärztl Umschau, 57, 142-151
76. GONIN, P., FOURNIER, A., OUALIKENE, W., MORAILLON, A., ELOIT, M. (1995)
Immunization trial of cats with a replication-defective adenovirus type 5 expressing the ENV gene of feline immunodeficiency virus
Vet Microbiol, 45, 393-401

LITERATURVERZEICHNIS

77. GONSALVES, S.F., LANDGRAF, B.E., CIARDELLI, T.L., BORISON, H.L. (1991)
Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats
Arch Int Pharmacodyn Ther, 310, 175-185.
78. GOOD, R.A., HARAGUCHI, S., LORENZ, E., DAY, N.K. (1991)
In vitro immunomodulation and in vivo immunotherapy of retrovirus-induced immunosuppression
Int J Immunopharmacol, 13 Suppl 1, 1-7
79. GRIBAUDO, G., RAVAGLIA, S., GABOLI, M., GARIGLIO, M., CAVALLO, R., LANDOLFO, S. (1995)
Interferon-alpha inhibits the murine cytomegalovirus immediate-early gene expression by down-regulating NF-kappa B activity
Virology, 211, 251-260
80. GRIMM, E.A., MAZUMDER, A., ZHANG, H.Z., ROSENBERG, S.A. (1982)
Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes
J Exp Med, 155, 1823-1841
81. GRIMM, E.A., MUUL, L.M., WILSON, D.J. (1985)
The differential inhibitory effects exerted by cyclosporine and hydrocortisone on the activation of human cytotoxic lymphocytes by recombinant interleukin-2 versus allospecific CTL
Transplantation, 39, 537-540
82. GUERETTE, B., VILQUIN, J.T., GINGRAS, M., GRAVEL, C., WOOD, K.J., TREMBLAY, J.P. (1996)
Prevention of immune reactions triggered by first-generation adenoviral vectors by monoclonal antibodies and CTLA4Ig
Hum Gene Ther, 7, 1455-1463
83. GUPTA, P.P. (1978)
Inclusion body hepatitis in a black panther (*Panthera pardus pardus*)
Zentralbl Veterinarmed [B], 25, 858-860
84. HANK, J.A., KOHLER, P.C., WEIL-HILLMAN, G., ROSENTHAL, N., MOORE, K.H., STORER, B., MINKOFF, D., BRADSHAW, J., BECHHOFFER, R., SONDEL, P.M. (1988)
In vivo induction of the lymphokine-activated killer phenomenon: interleukin 2-dependent human non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity generated in vivo during administration of human recombinant interleukin 2
Cancer Res, 48, 1965-1971
85. HARADA, Y., YAHARA, I. (1993)
Pathogenesis of toxicity with human-derived interleukin-2 in experimental animals
Int Rev Exp Pathol, 34, 37-55
86. HARMS, J.S., SPLITTER, G.A. (1995)
Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter
Hum Gene Ther, 6, 1291-1297
87. HARRIS, C., PIERCE, K., KING, G., YATES, K.M., HALL, J., TIZARD, I. (1991)
Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms
Mol Biother, 3, 207-213
88. HARROD, K.S., HERMISTON, T.W., TRAPNELL, B.C., WOLD, W.S., WHITSETT, J.A. (1998)
Lung-specific expression of adenovirus E3-14.7K in transgenic mice attenuates adenoviral vector-mediated lung inflammation and enhances transgene expression
Hum Gene Ther, 9, 1885-1898
89. HARTMANN, K., BLOCK, A., FERK, G., BEER, B., VOLLMAR, A., LUTZ, H. (1999)
Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection
Vet Microbiol, 69, 111-113

LITERATURVERZEICHNIS

90. HARVEY, B.G., HACKETT, N.R., EL-SAWY, T., ROSENGART, T.K., HIRSCHOWITZ, E.A., LIEBERMAN, M.D., LESSER, M.L., CRYSTAL, R.G. (1999)
Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs
J Virol, 73, 6729-6742
91. HARVEY, B.G., MARONI, J., O'DONOGHUE, K.A., CHU, K.W., MUSCAT, J.C., PIPPO, A.L., WRIGHT, C.E., HOLLMANN, C., WISNIVESKY, J.P., KESSLER, P.D., RASMUSSEN, H.S., ROSENGART, T.K., CRYSTAL, R.G. (2002)
Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions
Hum Gene Ther, 13, 15-63
92. HARVEY, B.G., WORGALL, S., ELY, S., LEOPOLD, P.L., CRYSTAL, R.G. (1999)
Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3-adenovirus gene transfer vector
Hum Gene Ther, 10, 2823-2837
93. HEATH, W.R., ALLISON, J., HOFFMANN, M.W., SCHONRICH, G., HAMMERLING, G., ARNOLD, B., MILLER, J.F. (1992)
Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2
Nature, 359, 547-549
94. HELFAND, S. (2000)
Hematopoietic Cytokines: The Interleukin Array
In: Bonagura, J.D. (Hrsg.): *Current Veterinary Therapy*, 13. Ausgabe, W. B. Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania: 408-414
95. HELFAND, S. (2000)
Immunomodulation as adjunctive anticancer therapy
ESVIM Congress 2000, Neuchâtel: 46-48
96. HELFAND, S.C., SOERGEL, S.A., MACWILLIAMS, P.S., HANK, J.A., SONDEL, P.M. (1994)
Clinical and immunological effects of human recombinant interleukin-2 given by repetitive weekly infusion to normal dogs
Cancer Immunol Immunother, 39, 84-92
97. HELFAND, S.C., SOERGEL, S.A., MODIANO, J.F., HANK, J.A., SONDEL, P.M. (1994)
Induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in canine lymphocytes with low dose human recombinant interleukin-2 in vitro
Cancer Biother, 9, 237-244
98. HERSHEY, A.E., SORENMO, K.U., HENDRICK, M.J., SHOFER, F.S., VAIL, D.M. (2000)
Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996)
J Am Vet Med Assoc, 216, 58-61
99. HIERHOLZER, J.C. (1973)
Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination
J Infect Dis, 128, 541-550
100. HIGGINBOTHAM, J.N., SETH, P., BLAESE, R.M., RAMSEY, W.J. (2002)
The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid
Hum Gene Ther, 13, 129-141
101. HOFER, S.O., MOLEMA, G., HERMENS, R.A., WANEBO, H.J., REICHNER, J.S., HOEKSTRA, H.J. (1999)
The effect of surgical wounding on tumour development
Eur J Surg Oncol, 25, 231-243
102. HOHMANN, H. (2002)
Persönliche Mitteilung, Strasbourg Januar 2002

LITERATURVERZEICHNIS

- 103.** HORBER, D.F.-M., B, MAYR, B. (1991)
Paramunisierung FeLV-positiver Katzen mit PIND-AVI
Tierärztl Prax, 19, 311-314
- 104.** HORNICK, J.L., KHAWLI, L.A., HU, P., SHARIFI, J., KHANNA, C., EPSTEIN, A.L. (1999)
Pretreatment with a monoclonal antibody/interleukin-2 fusion protein directed against DNA enhances the delivery of therapeutic molecules to solid tumors
Clin Cancer Res, 5, 51-60
- 105.** HUARD, J., LOCHMULLER, H., ACSADI, G., JANI, A., MASSIE, B., KARPATI, G. (1995)
The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants
Gene Ther, 2, 107-115
- 106.** HUI, K., GROSVELD, F., FESTENSTEIN, H. (1984)
Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation
Nature, 311, 750-752
- 107.** HUSBY, S., MESTECKY, J., MOLDOVEANU, Z., HOLLAND, S., ELSON, C.O. (1994)
Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding
J Immunol, 152, 4663-4670
- 108.** ILAN, Y. (1999)
Oral tolerance: a new tool for the treatment of gastrointestinal inflammatory disorders and liver-directed gene therapy
Can J Gastroenterol, 13, 829-835
- 109.** ILAN, Y., ATTAVAR, P., TAKAHASHI, M., DAVIDSON, A., HORWITZ, M.S., GUIDA, J., CHOWDHURY, N.R., CHOWDHURY, J.R. (1996)
Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats
J Clin Invest, 98, 2640-2647
- 110.** ILAN, Y., DROGUETT, G., CHOWDHURY, N.R., LI, Y., SENGUPTA, K., THUMMALA, N.R., DAVIDSON, A., CHOWDHURY, J.R., HORWITZ, M.S. (1997)
Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression
Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 2587-2592
- 111.** ILAN, Y., PRAKASH, R., DAVIDSON, A., JONA, D., DROGUETT, G., HORWITZ, M.S., CHOWDHURY, N.R., CHOWDHURY, J.R. (1997)
Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors
J Clin Invest, 99, 1098-1106
- 112.** JANEWAY, C., TRAVERS, P. (1997)
Die T-Zell-vermittelte Immunität
In: (Hrsg.): *Immunologie*, 2. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg: 241-284
- 113.** JEAL, W., GOA, K.L. (1997)
Aldesleukin (Rekombinant Interleukin-2)
BioDrugs, 7, 285-317
- 114.** JOOSS, K., YANG, Y., WILSON, J.M. (1996)
Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung
Hum Gene Ther, 7, 1555-1566
- 115.** JUILLARD, V., VILFROY, P., GODFRIN, D., PAVIRANI, A., VENET, A., GUILLET, J.G. (1995)
Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector
Eur J Immunol, 25, 3467-3473

LITERATURVERZEICHNIS

116. JUNGI, T.W. (2000)
Einführung in die Grundlagen der Immunologie
In: Jungi, T.W. (Hrsg.): *Klinische Veterinärimmunologie*, 1. Ausgabe, Enke Stuttgart: 3-33
117. JUNGI, T.W. (2000)
Grundlagen der Immunstörungen
In: Jungi, T.W. (Hrsg.): *Klinische Veterinärimmunologie*, 1. Ausgabe, Enke Stuttgart: 34-62
118. KAFRI, T., MORGAN, D., KRAHL, T., SARVETNICK, N., SHERMAN, L., VERMA, I. (1998)
Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy
Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 11377-11382
119. KAPLAN, J.M., ARMENTANO, D., SPARER, T.E., WYNN, S.G., PETERSON, P.A., WADSWORTH, S.C., COUTURE, K.K., PENNINGTON, S.E., ST GEORGE, J.A., GOODING, L.R., SMITH, A.E. (1997)
Characterization of factors involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung
Hum Gene Ther, 8, 45-56
120. KAPLAN, J.M., ST GEORGE, J.A., PENNINGTON, S.E., KEYES, L.D., JOHNSON, R.P., WADSWORTH, S.C., SMITH, A.E. (1996)
Humoral and cellular immune responses of nonhuman primates to long-term repeated lung exposure to Ad2/CFTR-2
Gene Ther, 3, 117-127
121. KARP, S.E., FARBER, A., SALO, J.C., HWU, P., JAFFE, G., ASHER, A.L., SHILONI, E., RESTIFO, N.P., MULE, J.J., ROSENBERG, S.A. (1993)
Cytokine secretion by genetically modified nonimmunogenic murine fibrosarcoma. Tumor inhibition by IL-2 but not tumor necrosis factor
J Immunol, 150, 896-908
122. KASAHARA, T., HOOKS, J.J., DOUGHERTY, S.F., OPPENHEIM, J.J. (1983)
Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets
J Immunol, 130, 1784-1789
123. KASS-EISLER, A., FALCK-PEDERSEN, E., ELFENBEIN, D.H., ALVIRA, M., BUTTRICK, P.M., LEINWAND, L.A. (1994)
The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer
Gene Ther, 1, 395-402
124. KASS-EISLER, A., LEINWAND, L., GALL, J., BLOOM, B., FALCK-PEDERSEN, E. (1996)
Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene therapy
Gene Ther, 3, 154-162
125. KENNEDY, F.A., MULLANEY, T.P. (1993)
Disseminated adenovirus infection in a cat
J Vet Diagn Invest, 5, 273-276
126. KESSLER, M., HAMMER, A.S., BAILEY, M.Q., TEMPEL, K.H., MATIS, U. (1996)
Effects of human interferons and 60cobalt radiation on canine and feline tumour cells-preclinical studies
Zentralbl Veterinarmed [A], 43, 599-609
127. KHANNA, C., ANDERSON, P.M., HASZ, D.E., KATSANIS, E., NEVILLE, M., KLAUSNER, J.S. (1997)
Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases
Cancer, 79, 1409-1421

LITERATURVERZEICHNIS

128. KHANNA, C., HASZ, D.E., KLAUSNER, J.S., ANDERSON, P.M. (1996)
Aerosol delivery of interleukin 2 liposomes is nontoxic and biologically effective: canine studies
Clin Cancer Res, 2, 721-734
129. KHOO, N.K., CHAN, F.P., SAARLOOS, M.N., LALA, P.K. (1992)
Immunotherapy of mammary adenocarcinoma metastases in C3H/HeN mice with chronic administration of cyclo-oxygenase inhibitors alone or in combination with IL-2
Clin Exp Metastasis, 10, 239-252
130. KIRCHEIS, R., KUPCU, Z., WALLNER, G., WAGNER, E. (1998)
Cytokine gene-modified tumor cells for prophylactic and therapeutic vaccination: IL-2, IFN-gamma, or combination IL-2 + IFN-gamma
Cytokines Cell Mol Ther, 4, 95-103
131. KLEINSCHUSTER, S.J., RAPP, H.J., GREEN, S.B., BIER, J., VAN KAMPEN, K. (1981)
Efficacy of intratumorally administered mycobacterial cell walls in the treatment of cattle with ocular carcinoma
J Natl Cancer Inst, 67, 1165-1171
132. KOHLER, P.C., HANK, J.A., MOORE, K.H., STORER, B., BECHHOFFER, R., HONG, R., SONDEL, P.M. (1989)
Phase 1 clinical trial of recombinant interleukin-2: a comparison of bolus and continuous intravenous infusion
Cancer Invest, 7, 213-223
133. KONERU, B., JAFFE, R., ESQUIVEL, C.O., KUNZ, R., TODO, S., IWATSUKI, S., STARZL, T.E. (1987)
Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients
J A M A, 258, 489-492
134. LAKATOS, B., FARKAS, J., ADAM, E. (1996)
Data to the adenovirus infection of European cats
Hung Vet J (Magy Állato Lapja), 118, 543-545
135. LAKATOS, B., FARKAS, J., ADAM, E., DOBAY, O., JENEY, C., NASZ, I., ONGRADI, J. (2000)
Serological evidence of adenovirus infection in cats
Arch Virol, 145, 1029-1033
136. LAKATOS, B., FARKAS, J., EGBERINK, H.F., VENNEMA, H., HORZINEK, M.C., BENKO, M. (1999)
Detection of adenovirus hexon sequence in a cat by polymerase chain reaction (short communication)
Acta Vet Hung, 47, 493-497
137. LEI, D., LEHMANN, M., SHELLITO, J.E., NELSON, S., SIEGLING, A., VOLK, H.D., KOLLS, J.K. (1996)
Nondepleting anti-CD4 antibody treatment prolongs lung-directed E1-deleted adenovirus-mediated gene expression in rats
Hum Gene Ther, 7, 2273-2279
138. LEROY, P., SLOS, P., HOMANN, H., ERBS, P., POITEVIN, Y., REGULIER, E., COLONNA, F.Q., DEVAUCHELLE, P., ROTH, C., PAVIRANI, A., MEHTALI, M. (1998)
Cancer immunotherapy by direct in vivo transfer of immunomodulatory genes
Res Immunol, 149, 681-684
139. LEUTENEGGER, C.M., MISLIN, C.N., SIGRIST, B., EHRENGRUBER, M.U., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H. (1999)
Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA
Vet Immunol Immunopathol, 71, 291-305
140. LI, Q., KAY, M.A., FINEGOLD, M., STRATFORD-PERRICAUDET, L.D., WOO, S.L. (1993)
Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy
Hum Gene Ther, 4, 403-409

LITERATURVERZEICHNIS

141. LIEBERMANN, H. (1992)
Adenoviridae
In: (Hrsg.): *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie*, 1. Ausgabe, Gustav Fischer Verlag Jena: 217-225
142. LIEBERS, U., KUHN, H., ARNOLD, W., SCHMIDT, B., WOLFF, G., WITT, C. (2001)
Gene transfer into solid tumours--is a special application device beneficial?
Eur J Cancer, 37, 2493-2499
143. LIN, D.S. (1992)
Change in interleukin 2 production by lymphocytes during maturation of young cats
Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 15, 301-304
144. LIU, G., ASHBOURNE EXCOFFON, K.J., WILSON, J.E., MCMANUS, B.M., ROGERS, Q.R., MIAO, L., KASTELEIN, J.J., LEWIS, M.E., HAYDEN, M.R. (2000)
Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer
Hum Gene Ther, 11, 21-32
145. LOLLINI, P.L., BOSCO, M.C., CAVALLO, F., DE GIOVANNI, C., GIOVARELLI, M., LANDUZZI, L., MUSIANI, P., MODESTI, A., NICOLETTI, G., PALMIERI, G. (1993)
Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene
Int J Cancer, 55, 320-329
146. LONDON, C. (2000)
Hematopoietic Cytokines: The Myelopoietic Factors
In: Bonagura, J.D. (Hrsg.): *Current Veterinary Therapy*, 13. Ausgabe, W. B. Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania: 403-408
147. LOTZE, M.T., MATORY, Y.L., ETTINGHAUSEN, S.E., RAYNER, A.A., SHARROW, S.O., SEIPP, C.A., CUSTER, M.C., ROSENBERG, S.A. (1985)
In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2
J Immunol, 135, 2865-2875
148. LUSKY, M., CHRIST, M., RITTNER, K., DIETERLE, A., DREYER, D., MOUROT, B., SCHULTZ, H., STOECKEL, F., PAVIRANI, A., MEHTALI, M. (1998)
In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted
J Virol, 72, 2022-2032
149. MAASS, G., SCHWEIGHOFFER, T., BERGER, M., SCHMIDT, W., HERBST, E., ZATLOUKAL, K., BUSCHLE, M., BIRNSTIEL, M.L. (1995)
Tumor vaccines: effects and fate of IL-2 transfected murine melanoma cells in vivo
Int J Immunopharmacol, 17, 65-73
150. MACK, C.A., SONG, W.R., CARPENTER, H., WICKHAM, T.J., KOVESDI, I., HARVEY, B.G., MAGOVERN, C.J., ISOM, O.W., ROSENGART, T., FALCK-PEDERSEN, E., HACKETT, N.R., CRYSTAL, R.G., MASTRANGELI, A. (1997)
Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype
Hum Gene Ther, 8, 99-109
151. MACY, D.W., HENDRICK, M.J. (1996)
The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats
Vet Clin North Am Small Anim Pract, 26, 103-109
152. MARINI, F.C.R., CANNON, J.P., BELMONT, J.W., SHILLITOE, E.J., LAPEYRE, J.N. (1995)
In vivo marking of spontaneous or vaccine-induced fibrosarcomas in the domestic house cat, using an adenoviral vector containing a bifunctional fusion protein, GAL-TEK
Hum Gene Ther, 6, 1215-1223

LITERATURVERZEICHNIS

153. MASSAROTTI, E.M., LIU, N.Y., MIER, J., ATKINS, M.B. (1992)
Chronic inflammatory arthritis after treatment with high-dose interleukin-2 for malignancy
Am J Med, 92, 693-697
154. MASTRANGELI, A., HARVEY, B.G., YAO, J., WOLFF, G., KOVESDI, I., CRYSTAL, R.G.,
FALCK-PEDERSEN, E. (1996)
"Sero-switch" adenovirus-mediated in vivo gene transfer: circumvention of anti-adenovirus humoral
immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype
Hum Gene Ther, 7, 79-87
155. MAULDIN, G.N. (1997)
Soft tissue sarcomas
Vet Clin North Am Small Anim Pract, 27, 139-148
156. MAYNARD, L. (2000)
Efficacy of a recombinant feline omega interferon in the treatment of symptomatic FeLV or FeLV and
FIV positive cats
ESVIM Congress 2000, Neuchâtel: 122a
157. MAYR, A. (1993)
The paraspecific immune defense: possibilities and limits
Tierarztl Prax, 21, 1-9
158. MAYR, A. (1999)
Paraspezifische Vaccinen aus Pockenviren (Paramunitätsinducer): eine neue Art von Impfstoff
Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren, 8, 550-557
159. MAYR, A. (2001)
Entwicklung einer nicht immunisierenden, paraspezifischen Vaccine aus attenuierten Pockenviren: Eine
neue Art von Vaccinen
Berl Münch Tierärztl Wschr, 114, 184-187
160. MAYR, A., BUTTNER, M., WOLF, G., MEYER, H., CZERNY, C. (1989)
Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses
Zentralbl Veterinarmed [B], 36, 81-99
161. MAYR, A., HERLYN, M., MAHNEL, H., DANCO, A., ZACH, A., BOSTEDT, H. (1981)
Control of ecthyma contagiosum (pustular dermatitis) of sheep with a new parenteral cell culture live
vaccine
Zentralbl Veterinarmed [B], 28, 535-552
162. MAYR, B., DEININGER, S., BUTTNER, M. (1991)
Treatment of chronic stomatitis of cats by local paramunization with PIND-ORF
Zentralbl Veterinarmed [B], 38, 78-80
163. MCCAWE, D.L., BOON, G.D., JERGENS, A.E., KERN, M.R., BOWLES, M.H., JOHNSON, J.C.
(2001)
Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection
J Am Anim Hosp Assoc, 37, 356-363
164. MCCLANE, S.J., CHIRMULE, N., BURKE, C.V., RAPER, S.E. (1997)
Characterization of the immune response after local delivery of recombinant adenovirus in murine
pancreas and successful strategies for readministration
Hum Gene Ther, 8, 2207-2216
165. MCCOY, R.D., DAVIDSON, B.L., ROESSLER, B.J., HUFFNAGLE, G.B., JANICH, S.L., LAING,
T.J., SIMON, R.H. (1995)
Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles
Hum Gene Ther, 6, 1553-1560

LITERATURVERZEICHNIS

166. MCCOY, R.D., DAVIDSON, B.L., ROESSLER, B.J., HUFFNAGLE, G.B., SIMON, R.H. (1995)
Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: effects on vector-induced inflammation
Gene Ther, 2, 437-442
167. MCNIEL, E.A. (2001)
Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancer model
Clinical Orthopaedics and Related Research, 21-27
168. MICHOU, A.I., SANTORO, L., CHRIST, M., JULLIARD, V., PAVIRANI, A., MEHTALI, M. (1997)
Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression
Gene Ther, 4, 473-482
169. MIER, J.W., VACHINO, G., KLEMPNER, M.S., ARONSON, F.R., NORING, R., SMITH, S., BRANDON, E.P., LAIRD, W., ATKINS, M.B. (1990)
Inhibition of interleukin-2-induced tumor necrosis factor release by dexamethasone: prevention of an acquired neutrophil chemotaxis defect and differential suppression of interleukin-2-associated side effects
Blood, 76, 1933-1940
170. MIER, J.W.F.-A., M B, ATKINS, M.B. (1993)
Mechanisms of action and toxicity of immunotherapy with cytokines
Current Opinion in Oncology, 5, 1067-1072
171. MILES, B.J., SHALEV, M., AGUILAR-CORDOVA, E., TIMME, T.L., LEE, H.M., YANG, G., ADLER, H.L., KERNEN, K., PRAMUDJI, C.K., SATOH, T., GDOR, Y., REN, C., AYALA, G., WHEELER, T.M., BUTLER, E.B., KADMON, D., THOMPSON, T.C. (2001)
Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy
Hum Gene Ther, 12, 1955-1967
172. MILLER, E. (1997)
Immunosuppression - an overview.
Semin Vet Med Surg (Small Anim), 12, 144-149
173. MOFFATT, S., HAYS, J., HOGENESCH, H., MITTAL, S.K. (2000)
Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy
Virology, 272, 159-167
174. MOLINIER-FRENKEL, V., GAHERY-SEGARD, H., MEHTALI, M., LE BOULAIRE, C., RIBAUT, S., BOULANGER, P., TURSZ, T., GUILLET, J.G., FARACE, F. (2000)
Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes
J Virol, 74, 7678-7682
175. MORRAL, N., O'NEAL, W., RICE, K., LELAND, M., KAPLAN, J., PIEDRA, P.A., ZHOU, H., PARKS, R.J., VELJI, R., AGUILAR-CORDOVA, E., WADSWORTH, S., GRAHAM, F.L., KOCHANNEK, S., CAREY, K.D., BEAUDET, A.L. (1999)
Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons
Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 12816-12821
176. MULEYA, J.S., NAKAICHI, M., TAURA, Y., YAMAGUCHI, R., NAKAMA, S. (1999)
In-vitro anti-proliferative effects of some anti-tumour drugs on feline mammary tumour cell lines.
Res Vet Sci, 66, 169-174
177. MURRAY, H.W. (1988)
Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge
Ann Intern Med, 108, 595-608

178. MURUVE, D.A., BARNES, M.J., STILLMAN, I.E., LIBERMANN, T.A. (1999)
Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo
Hum Gene Ther, 10, 965-976
179. NORRBY, E., BARTHA, A., BOULANGER, P., DREIZIN, R.S., GINSBERG, H.S., KALTER, S.S., KAWAMURA, H., ROWE, W.P., RUSSELL, W.C., SCHLESINGER, W., WIGAND, R. (1976)
Adenoviridae
Intervirology, 7, 117-125
180. OGILVIE, G.K. (2001)
Recent advances in the treatment of vaccine-associated sarcomas
Vet Clin North Am Small Anim Pract, 31, 525-533
181. ONGRADI, J. (1999)
Identification of a feline adenovirus isolate that replicates in monkey and human cells in vitro
Am J Vet Res, 60, 1463
182. OTAKE, K., ENNIST, D.L., HARROD, K., TRAPNELL, B.C. (1998)
Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses
Hum Gene Ther, 9, 2207-2222
183. PAGLIA, P., GUZMAN, C.A. (1998)
Keeping the immune system alerted against cancer
Cancer Immunol Immunother, 46, 88-92
184. PAILLARD, F. (1998)
The search for the "best" cytokine to induce antitumor immunity
Hum Gene Ther, 9, 2457-2458
185. PAK, A.S., WRIGHT, M.A., YOUNG, M.R. (1995)
Treating tumor-bearing mice with low-dose gamma-interferon plus tumor necrosis factor alpha to diminish immune suppressive granulocyte-macrophage progenitor cells increases responsiveness to interleukin 2 immunotherapy
Cancer Res, 55, 885-890
186. PALIOGIANNI, F., RAPTIS, A., AHUJA, S.S., NAJJAR, S.M., BOUMPAS, D.T. (1993)
Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT
J Clin Invest, 91, 1481-1489
187. PARDOLL, D.M. (1995)
Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy
Annu Rev Immunol, 13, 399-415
188. PARKS, R., EVELEGH, C., GRAHAM, F. (1999)
Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration
Gene Ther, 6, 1565-1573
189. PARMIANI, G. (1998)
Immunological approach to gene therapy of human cancer: improvements through the understanding of mechanism(s)
Gene Ther, 5, 863-864
190. PARMIANI, G., RODOLFO, M., MELANI, C. (2000)
Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and a reappraisal
Hum Gene Ther, 11, 1269-1275
191. PAUL, S. (2001)
Vecteurs viraux pour la thérapie génique du cancer
Virologie, 5, 53-69

LITERATURVERZEICHNIS

192. PEKAREK, L.A., WEICHSELBAUM, R.R., BECKETT, M.A., NACHMAN, J., SCHREIBER, H. (1993)
Footprinting of individual tumors and their variants by constitutive cytokine expression patterns
Cancer Res, 53, 1978-1981
193. PHILLIPS, J.H., LANIER, L.L. (1986)
Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity
J Exp Med, 164, 814-825
194. PILEWSKI, J.M., SOTT, D.J., WILSON, J.M., ALBELDA, S.M. (1995)
ICAM-1 expression on bronchial epithelium after recombinant adenovirus infection
Am J Respir Cell Mol Biol, 12, 142-148
195. PUCETTI, P., BIANCHI, R., FIORETTI, M.C., AYROLDI, E., UYTENHOVE, C., VAN PEL, A., BOON, T., GROHMANN, U. (1994)
Use of a skin test assay to determine tumor-specific CD8+ T cell reactivity
Eur J Immunol, 24, 1446-1452
196. PUISIEUX, I., ODIN, L., POUJOL, D., MOINGEON, P., TARTAGLIA, J., COX, W., FAVROT, M. (1998)
Canarypox virus-mediated interleukin 12 gene transfer into murine mammary adenocarcinoma induces tumor suppression and long-term antitumoral immunity
Hum Gene Ther, 9, 2481-2492
197. QIN, L., DING, Y., PAHUD, D.R., CHANG, E., IMPERIALE, M.J., BROMBERG, J.S. (1997)
Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression
Hum Gene Ther, 8, 2019-2029
198. QUINTIN-COLONNA, F., DEVAUCHELLE, P., FRADELIZI, D., MOUROT, B., FAURE, T., KOURILSKY, P., ROTH, C., MEHTALI, M. (1996)
Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2
Gene Ther, 3, 1104-1112
199. RAHMAN, A., TSAI, V., GOUDREAU, A., SHINODA, J.Y., WEN, S.F., RAMACHANDRA, M., RALSTON, R., MANEVAL, D., LAFACE, D., SHABRAM, P. (2001)
Specific depletion of human anti-adenovirus antibodies facilitates transduction in an in vivo model for systemic gene therapy
Mol Ther, 3, 768-778
200. RASMUSSEN, U.B., BENCHAIABI, M., MEYER, V., SCHLESINGER, Y., SCHUGHART, K. (1999)
Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells
Hum Gene Ther, 10, 2587-2599
201. RIMSTAD, E., REUBEL, G.H., DEAN, G.A., HIGGINS, J., PEDERSEN, N.C. (1995)
Cloning, expression and characterization of biologically active feline tumor necrosis factor-alpha
Vet Immunol Immunopathol, 45, 297-310
202. ROCHLITZ, C., JANTSCHKEFF, P., BONGARTZ, G., DIETRICH, P.Y., QUIQUEREZ, A.L., SCHATZ, C., MEHTALI, M., COURTNEY, M., TARTOUR, E., DORVAL, T., FRIDMAN, W.H., HERRMANN, R. (1999)
Gene therapy study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-interleukin-2) in patients with metastatic solid tumors
Cancer Gene Ther, 6, 271-281
203. ROSENTHAL, F.M., CRONIN, K., BANNERJI, R., GOLDE, D.W., GANSBACHER, B. (1994)
Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon-gamma cDNAs
Blood, 83, 1289-1298

LITERATURVERZEICHNIS

204. ROTTMAN, J.B., FREEMAN, E.B., TONKONOGY, S., TOMPKINS, M.B. (1995)
A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes
Vet Immunol Immunopathol, 45, 1-18
205. RUSSELL, W.C. (2000)
Update on adenovirus and its vectors
J Gen Virol, 81, 2573-2604
206. SATO, Y., ROMAN, M., TIGHE, H., LEE, D., CORR, M., NGUYEN, M.D., SILVERMAN, G.J., LOTZ, M., CARSON, D.A., RAZ, E. (1996)
Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization
Science, 273, 352-354
207. SCHIEDNER, G., MORRAL, N., PARKS, R.J., WU, Y., KOOPMANS, S.C., LANGSTON, C., GRAHAM, F.L., BEAUDET, A.L., KOCHANNEK, S. (1998)
Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity
Nat Genet, 18, 180-183
208. SCHMIDT, W., SCHWEIGHOFFER, T., HERBST, E., MAASS, G., BERGER, M., SCHILCHER, F., SCHAFFNER, G., BIRNSTIEL, M.L. (1995)
Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect
Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 4711-4714
209. SCHMUTZLER, C., KOEHRLE, J. (2000)
Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer
Eur J Endocrinol, 143, 15-24
210. SCHNELL, M.A., ZHANG, Y., TAZELAAR, J., GAO, G.P., YU, Q.C., QIAN, R., CHEN, S.J., VARNAVSKI, A.N., LECLAIR, C., RAPER, S.E., WILSON, J.M. (2001)
Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors
Mol Ther, 3, 708-722
211. SCHULTHEIß, U. (2002)
Persönliche Mitteilung, Seeheim 12.06.2002
212. SHARP, J.M., MCFERRAN, J.B., RAE, A. (1974)
A new adenovirus from sheep
Res Vet Sci, 17, 268-269
213. SHENK, T. (1996)
Adenoviridae: The viruses and their replication
In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Hrsg.): *Fields Virology*, 3. Ausgabe, Lippincott-Raven Publishers Philadelphia: 2111-2148
214. SIEGEL, J.P., PURI, R.K. (1991)
Interleukin-2 toxicity
J Clin Oncol, 9, 694-704
215. SIMON, R.H., ENGELHARDT, J.F., YANG, Y., ZEPEDA, M., WEBER-PENDLETON, S., GROSSMAN, M., WILSON, J.M. (1993)
Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study
Hum Gene Ther, 4, 771-780
216. SLOS, P., DE MEYER, M., LEROY, P., ROUSSEAU, C., ACRES, B. (2001)
Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8(+) T-cell immunity and NK activity
Cancer Gene Ther, 8, 321-332

LITERATURVERZEICHNIS

217. SPARANO, J.A., BRANDT, L.J., DUTCHER, J.P., DUBOIS, J.S., ATKINS, M.B. (1993)
Symptomatic exacerbation of Crohn disease after treatment with high-dose interleukin-2
Ann Intern Med, 118, 617-618
218. STEWART, A.K., LASSAM, N.J., QUIRT, I.C., BAILEY, D.J., ROTSTEIN, L.E., KRAJDEN, M.,
DESSUREAULT, S., GALLINGER, S., CAPPE, D., WAN, Y., ADDISON, C.L., MOEN, R.C.,
GAULDIE, J., GRAHAM, F.L. (1999)
Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results
of a phase 1 clinical trial
Gene Ther, 6, 350-363
219. STICKL, H., MAYR, A. (1979)
Effectiveness of a new "paramunity" inducer (PIND-AVI) for human beings and animals
Fortschr Med, 97, 1781-1788
220. STRATFORD-PERRICAUDET, L.D., MAKEH, I., PERRICAUDET, M., BRIAND, P. (1992)
Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart
J Clin Invest, 90, 626-630
221. STUDDERT, M.J. (2000)
Veterinary perspective on gene therapy with adenoviruses
Science, 287, 973-974
222. SUNG, R.S., QIN, L., BROMBERG, J.S. (2001)
TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-
mediated transgene expression
Mol Ther, 3, 757-767
223. TAPSCOTT, S.J., MILLER, A.D., OLSON, J.M., BERGER, M.S., GROUDINE, M., SPENCE, A.M.
(1994)
Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug
selection
Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 8185-8189
224. THOMAS, C.E., SCHIEDNER, G., KOCHANNEK, S., CASTRO, M.G., LOWENSTEIN, P.R. (2000)
Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals
injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward
realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases
Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 7482-7487
225. THOMAS, C.E., SCHIEDNER, G., KOCHANNEK, S., CASTRO, M.G., LOWENSTEIN, P.R. (2001)
Preexisting antiadenoviral immunity is not a barrier to efficient and stable transduction of the brain,
mediated by novel high-capacity adenovirus vectors
Hum Gene Ther, 12, 839-846
226. TIZARD, I. (1991)
Use of immunomodulators as an aid to clinical management of feline leukemia virus-infected cats
J Am Vet Med Assoc, 199, 1482-1485
227. TIZARD, I. (2000)
Dendritic cells and antigen processing
In: Tizard, I. (Hrsg.): *Veterinary Immunology: An Introduction*, 6. Ausgabe, W.B. Saunders Company
Philadelphia, Pennsylvania: 58-68
228. TIZARD, I. (2000)
Resistance to tumors
In: Tizard, I. (Hrsg.): *Veterinary Immunology: An Introduction*, 6. Ausgabe, W.B. Saunders Company
Philadelphia, Pennsylvania: 295-306

LITERATURVERZEICHNIS

229. TOLOZA, E.M., HUNT, K., SWISHER, S., MCBRIDE, W., LAU, R., PANG, S., RHOADES, K., DRAKE, T., BELLDEGRUN, A., GLASPY, J., ECONOMOU, J.S. (1996)
In vivo cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector
Cancer Gene Ther, 3, 11-17
230. TOMPKINS, M.B., OGILVIE, G.K., FRANKLIN, R.A., KELLEY, K.W., TOMPKINS, W.A. (1987)
Induction of IL-2 and lymphokine activated killer cells in the cat
Vet Immunol Immunopathol, 16, 1-10
231. TRIPATHY, S.K., BLACK, H.B., GOLDWASSER, E., LEIDEN, J.M. (1996)
Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors
Nat Med, 2, 545-550
232. URBA, W.J., STEIS, R.G., LONGO, D.L., KOPP, W.C., MALUISH, A.E., MARCON, L., NELSON, D.L., STEVENSON, H.C., CLARK, J.W. (1990)
Immunomodulatory properties and toxicity of interleukin 2 in patients with cancer
Cancer Res, 50, 185-192
233. VAN KAMPEN, K.R. (1997)
Immunotherapy and cytokines
Semin Vet Med Surg (Small Anim), 12, 186-192
234. VIRBAC (2002)
Virbagen(R) Omega - Rekombinantes felines Interferon für die Veterinärmedizin - Product information
235. WADSWORTH, S.C., ZHOU, H., SMITH, A.E., KAPLAN, J.M. (1997)
Adenovirus vector-infected cells can escape adenovirus antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte killing in vivo
J Virol, 71, 5189-5196
236. WECKER, E. (1990)
Zellkooperationen bei den Immunreaktionen
In: (Hrsg.): *Immunologie kurzgefasst*, 1. Ausgabe, Bibliographisches Institut Mannheim: 79-96
237. WEIGENT, D.A., STANTON, G.J., JOHNSON, H.M. (1983)
Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon
Infect Immun, 41, 992-997
238. WEINER, H.L. (1994)
Oral tolerance
Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 10762-10765
239. WEINER, H.L. (1997)
Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases
Immunol Today, 18, 335-343
240. WEN, P.Y., LAMPSON, M.A., LAMPSON, L.A. (1992)
Effects of gamma-interferon on major histocompatibility complex antigen expression and lymphocytic infiltration in the 9L gliosarcoma brain tumor model: implications for strategies of immunotherapy
J Neuroimmunol, 36, 57-68
241. WHITLEY, E.M., BIRD, A.C., ZUCKER, K.E., WOLFE, L.G. (1995)
Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines
Anticancer Res, 15, 923-929
242. WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A., NEMEROW, G.R. (1993)
Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment
Cell, 73, 309-319

LITERATURVERZEICHNIS

243. WILDNER, O., MORRIS, J.C. (2002)
Subcutaneous Administration of a Replication-Competent Adenovirus Expressing HSV-tk to Cotton Rats: Dissemination, Persistence, Shedding, and Pathogenicity
Hum Gene Ther, 13, 101-112
244. WILLIMZIK, H.F., KALTER, S.S., LESTER, T.L., WIGAND, R. (1981)
Immunological relationship among adenoviruses of humans, simians, and nonprimates as determined by the neutralization test
Intervirology, 15, 28-36
245. WOHLFART, C. (1988)
Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms
J Virol, 62, 2321-2328
246. WORGALL, S., WOLFF, G., FALCK-PEDERSEN, E., CRYSTAL, R.G. (1997)
Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration
Hum Gene Ther, 8, 37-44
247. YANG, Y., GREENOUGH, K., WILSON, J.M. (1996)
Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver
Gene Ther, 3, 412-420
248. YANG, Y., JOOSS, K.U., SU, Q., ERTL, H.C., WILSON, J.M. (1996)
Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo
Gene Ther, 3, 137-144
249. YANG, Y., LI, Q., ERTL, H.C., WILSON, J.M. (1995)
Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses
J Virol, 69, 2004-2015
250. YANG, Y., NUNES, F.A., BERENCSI, K., FURTH, E.E., GONCZOL, E., WILSON, J.M. (1994)
Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy
Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 4407-4411
251. YANG, Y., SU, Q., WILSON, J.M. (1996)
Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs
J Virol, 70, 7209-7212
252. YAO, S.N., FARJO, A., ROESSLER, B.J., DAVIDSON, B.L., KURACHI, K. (1996)
Adenovirus-mediated transfer of human factor IX gene in immunodeficient and normal mice: evidence for prolonged stability and activity of the transgene in liver
Viral Immunol, 9, 141-153
253. YEI, S., MITTEREDER, N., TANG, K., O'SULLIVAN, C., TRAPNELL, B.C. (1994)
Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung
Gene Ther, 1, 192-200
254. ZABNER, J., PETERSEN, D.M., PUGA, A.P., GRAHAM, S.M., COUTURE, L.A., KEYES, L.D., LUKASON, M.J., ST GEORGE, J.A., GREGORY, R.J., SMITH, A.E. (1994)
Safety and efficacy of repetitive adenovirus-mediated transfer of CFTR cDNA to airway epithelia of primates and cotton rats
Nat Genet, 6, 75-83

LITERATURVERZEICHNIS

- 255.** ZHANG, H.G., LIU, D., HEIKE, Y., YANG, P., WANG, Z., WANG, X., CURIEL, D.T., ZHOU, T., MOUNTZ, J.D. (1998)
Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells
Nat Biotechnol, 16, 1045-1049
- 256.** ZHANG, R., STRAUS, F.H., DEGROOT, L.J. (1999)
Effective genetic therapy of established medullary thyroid carcinomas with murine interleukin-2: dissemination and cytotoxicity studies in a rat tumor model
Endocrinology, 140, 2152-2158

9 **TABELLENVERZEICHNIS**

<i>Tabelle 1: Übersicht über die vier Therapiegruppen (Tierzahl, Vektoren und Dosis) der Phase II der Zytokingentherapie nach Injektion rekombinanter Adenoviren ins Tumorbett.....</i>	61
<i>Tabelle 2: IL 2-Konzentrationen aller gentherapeutisch behandelten Katzen der Phase I und der Phase II an allen Kontrolluntersuchungsterminen bei Applikation ins Tumorbett (in pg / ml).....</i>	84
<i>Tabelle 3: Standardabweichungen zu Abbildung 16.....</i>	85
<i>Tabelle 4: Standardabweichungen zu Abbildung 17.....</i>	86
<i>Tabelle 5: Standardabweichungen zu Abbildung 18.....</i>	87
<i>Tabelle 6: IL 2-Konzentrationen behandelter Katzen der Dosisfindungsphase bei intratumoraler Applikation (in pg / ml).....</i>	88
<i>Tabelle 7: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig M über die Zeit (Verdünnung 1 : 200).....</i>	92
<i>Tabelle 8: Untersuchung von Anti-huIL 2-Ak, optische Dichte der Ig G über die Zeit (Verdünnung 1 : 200).....</i>	94
<i>Tabelle 9 (oben) und Tabelle 10 (unten): Standardabweichungen zu Abbildung 20 und Abbildung 21.....</i>	96
<i>Tabelle 11 (oben) und Tabelle 12 (unten): Standardabweichungen zu Abbildung 25 und Abbildung 25.....</i>	98
<i>Tabelle 13: Untersuchung von Anti-Ad-Ak, optische Dichte der Ig M über die Zeit (Verdünnung 1 : 200).....</i>	101
<i>Tabelle 14: Untersuchung von Anti-Ad-Ak, optische Dichte der Ig G über die Zeit (Verdünnung 1 : 200).....</i>	103
<i>Tabelle 15: Standardabweichungen zu Abbildung 28.....</i>	106
<i>Tabelle 16: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, Applikation Tumorbett (Verdünnung 1 : 1600).....</i>	108
<i>Tabelle 17: Prozentwerte der Neutralisation über die Zeit, intratumorale Applikation (Verdünnung 1 : 800).....</i>	109
<i>Tabelle 18: Standardabweichungen zu Abbildung 29.....</i>	111
<i>Tabelle 19: Standardabweichungen zu Abbildung 31.....</i>	113
<i>Tabelle 20: IL 2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand des Vorversuchs (in pg / ml).....</i>	115
<i>Tabelle 21 (oben) und Tabelle 22 (unten): IL 2-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich verschiedener MOI und der einfachen mit der kombinierten Transduktion über 22 Tage (in pg / ml).....</i>	115
<i>Tabelle 23: Signifikanz des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (S): ELISA Anti-Ad-Ig M.....</i>	117
<i>Tabelle 24: Signifikanz des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (S): ELISA Anti-Ad-Ig G.....</i>	117
<i>Tabelle 25: Signifikanz des Unterschieds zwischen den beiden Therapiegruppen (S): Neutralisationstest.....</i>	117

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Adenovirus</i>	4
<i>Abbildung 2: IL 2-Sequenz im Vergleich verschiedener Spezies</i>	34
<i>Abbildung 3: FACS-Analyse: MHC I-Expression nach Kultivierung von PG 4-Zellen im Überstand AdfeIFN γ-transduzierter Zellen (AdTG 13273).....</i>	42
<i>Abbildung 4: Struktur der in der Studie verwendeten Vektoren (CMV - Zytomegalievirus, ITR - inverted terminal repeats, PA - Polyadenylierungssignal)</i>	62
<i>Abbildung 5: Schema der ELISA-Komponenten: IL 2-Konzentration</i>	65
<i>Abbildung 6: ELISA-Platte: IL 2-Konzentration im Serum</i>	66
<i>Abbildung 7: Vom Programm Genesis aus den Werten der IL 2-Standardlösung erzeugte Standardkurve (x-Achse: Interleukinkonzentration, y-Achse: optische Dichte).....</i>	67
<i>Abbildung 8: Schema der ELISA-Komponenten: Antikörper gegen Interleukin 2</i>	69
<i>Abbildung 9: Schema der ELISA-Komponenten: Gesamtheit antiadenoviraler Antikörper ...</i>	71
<i>Abbildung 10 (links) und Abbildung 11 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig G, vor und nach Beenden der Nachweisreaktion, jeweils Katze Nummer 31</i>	72
<i>Abbildung 12: PER.C6®-Zellkultur, Vergrößerung 200fach</i>	73
<i>Abbildung 13: Schema der aufeinander folgenden Arbeitsschritte: Neutralisierende antiadenovirale Antikörper.....</i>	75
<i>Abbildung 14 (links) und Abbildung 15 (rechts): AdβGal-infizierte PER.C6®-Zellen, koloriert, Vergrößerung 200fach (links: MOI 0,5, rechts: MOI 5)</i>	76
<i>Abbildung 16: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum bei Injektion unterschiedlicher Vektordosen (0,2 oder 1,0 oder 2,5 oder $5,0 \times 10^8$ i. u.).....</i>	85
<i>Abbildung 17: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der vier therapeutischen Gruppen.....</i>	86
<i>Abbildung 18: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum von Tieren mit (15 Tiere) und ohne (13 Tiere) Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn im Vergleich (nur Therapiegruppe 5×10^8 i. u. IL 2 + IFN γ (28 Tiere))</i>	87
<i>Abbildung 19: Prozentuale Abweichung der optischen Dichte in verschiedenen Verdünnungsstufen nach Erhitzen der Proben</i>	89
<i>Abbildung 20 (links) und Abbildung 21 (rechts): Verlauf der gegen das Transgen gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G).....</i>	95
<i>Abbildung 22 (links) und Abbildung 23 (rechts): ELISA-Platte: Nachweis gegen humanes, rekombinantes IL 2-gerichteter Antikörper, jeweils Katze Nummer 18 (links: Ig M, rechts: Ig G).....</i>	96
<i>Abbildung 24: ELISA-Platte: Nachweis antiadenoviraler Ig M, Katze Nummer 31</i>	97
<i>Abbildung 25 (links) und Abbildung 26 (rechts): Verlauf der gegen den Vektor gerichteten Antikörper, Mittelwerte der Therapiegruppen der optischen Dichte über die Zeit, Verdünnung 1 : 200 (links: Ig M, rechts: Ig G).....</i>	98
<i>Abbildung 27: Beispielhaftes Ergebnis einer Fluoreszenzmessung: Wellenlänge von 340 nm (System Victor, Wallach)</i>	105
<i>Abbildung 28: Mittelwerte der prozentualen Neutralisationskapazität über den gesamten Untersuchungszeitraum, Applikation Tumorbett, Serumverdünnung 1: 1600</i>	105
<i>Abbildung 29: Mittelwerte der Interleukinkonzentrationen im Serum im Vergleich der beiden unterschiedlichen Applikationswege bei gleicher Dosis (5×10^8 AdhuIL 2 + 5×10^8 AdfeIFN γ).....</i>	111

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 30: Prozent der Tiere, bei denen IL 2 im Serum nicht nachweisbar war, unter dem erhofften Limit lag oder darüber im erwünschten Bereich - im Vergleich der beiden Applikationsarten</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 31: Vergleich neutralisierender antiadenoviraler Antikörper zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlicher Applikationsart, Verdünnung 1 : 800</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 32: Vergleich unterschiedlicher MOI im Zellkulturvorversuch</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 33 (links oben) und Abbildung 34 (rechts oben) und Abbildung 35 (links unten) und Abbildung 36 (rechts unten): Vergleich der Genexpression von AdhuIL 2 oder AdhuIL 2 + AdfeIFN γ bei verschiedenen MOI über die Zeit.....</i>	<i>116</i>
<i>Abbildung 37 (links): Korrelation an Tag 30, x-Achse: OD Anti-Ad-Ig M, y-Achse: Lymphozyten (in %)</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 38 (Mitte): Korrelation an Tag 14, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig M, y-Achse: Leukozyten (in Tausend)</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 39 (rechts): Korrelation an Tag 360, x-Achse: OD Anti-IL 2-Ig G, y-Achse: Leukozyten (in Tausend)</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 40: Genexpression unterschiedlicher Zelllinien verschiedener Spezies nach Transduktion durch Adenoviren</i>	<i>123</i>

11 **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
τ	tau
ω	omega
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Ab	antibody
Ad	Adenovirus
ADCC	antibody dependant cellular cytotoxicity
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
BAV	bovines Adenovirus
BRMP	Biologic Response Modifiers Program
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	cell(s) / Zelle(n)
ca.	zirka
CAV	canines Adenovirus
CD	cluster of differentiation
CF	cystic fibrosis
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratcentimeter
cm^3	Kubikcentimeter
CMV	cytomegalovirus / Zytomegalievirus
Co	Kontrolle
COX	Zyklooxygenase
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d	day(s) / Tag(e)
d. h.	das heißt
DMD	Duchenne´s muscular dystrophy
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
DOS	disc operating system
Dr. med.	Doctor medicinae
Dr. med. vet.	Doctor medicinae veterinariae
DTH	delayed-type hypersensitivity
E	early region
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
enz. Akt.	enzymatische Aktivität
EPO	Erythropoetin
et al.	et alii
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
fe	felin(es)
FeLV	Felines Leukosevirus
FeSV	Felines Sarkomvirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
GALT	gut-associated lymphoid tissue
geb.	Geborene
GFP	green fluorescent protein
GM	Granulozyten-Makrophagen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HER	human embryonic retinoblasts
HRPO	horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
Hrsg.	Herausgeber
hu	human(es)
i. u.	infectious unit(s)
ICAM	intercellular adhesion molecule
IE	Internationale Einheit(en)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin(e)
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
ITR	inverted terminal repeats
IU	Internationale Einheit(en)
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	late region
l	Liter
LAK-Zellen	lymphokinaktivierte Killerzellen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPL	Lipoproteinlipase
M	molar
m ²	Quadratmeter
max.	maximal
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
min.	minimal

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	Milliliter
mM	Millimol
MMH	Marei Müller-Heidelberg
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleid acid
MTK	Medizinische Tierklinik
mu	murin(es)
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natural killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OID	optimale immunmodulierende Dosis
p.f.u.	plaque-forming unit
PA	Polyadenylierungssignal
PBL	peripheral blood lymphocyte(s)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
Prof.	Professor
PSA	prostate specific antigen
RCA	replication-competent adenovirus(es)
RDA	replication-deficient adenovirus (es)
RNA	ribonucleid acid
rt-PCR	real-time / reverse transcription polymerase chain reaction
S	Signifikanzniveau
S2	Sicherheitsstufe 2
SA	société anonyme / Aktiengesellschaft
sog.	sogenannt(en)
SPF	spezifisch pathogenfrei
Std.	Stunde(n)
t	Zeitpunkt
TCR	T-Zell-Rezeptor
TG	TRANSGENE SA, Strasbourg
TGF	transforming growth factor
T _H 1, T _H 2	T-Helfer-Zelle, Subpopulation 1 oder 2
TiHo	Tierärztliche Hochschule
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
tp	total particles
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel
ZPE	zytopathischer Effekt

12 ANHANG

12.1 Allgemeine Angaben zu Material und Reagenzien

- Alle selbst beschichteten ELISA-Platten stammten von Nalge Nunc International, Rochester (**Nunc-Immuno Module MaxiSorp®**).
- Alle **Verbrauchsmaterialien** (Pipetten, Kulturflaschen, weiteres Plastikmaterial) stammten von Falcon, Franklin Lakes, und Nalge Nunc International, Rochester.
- **2-Mercaptoethanol** (C₂H₆OS) von Merck, Darmstadt
- **TMB** (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin: C₁₆H₂₀N₂) von Sigma Chemical Co., St. Louis; gelöst in DMSO (100 mg in 10 ml)
- **FCS** (mit γ -Strahlen behandelt, steril gefiltert), **PBS** (getestet auf Endotoxine, steril gefiltert, ohne Kalzium- und Magnesiumchlorid), **Tween 20** (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat), **Triton X-100** (t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol), **X-Gal** (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid: C₁₄H₁₅BrClNBO₆), **TMB** (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin: C₁₆H₂₀N₂), **MUG** (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid: C₁₆H₁₈O₈) von Sigma Chemical Co., St. Louis
- **DMEM** (mit 3 g / l Glukose und 3,7 g / l Bikarbonat) von Life Technology, Raisley
- **Karbonatpuffer:** 4,2 g NaHCO₃ in 50 ml H₂O

5,3 g Na₂CO₃ in 50 ml H₂O

22,65 ml der NaHCO₃-Lösung und 9,1 ml der Na₂CO₃-Lösung in 500 ml H₂O, sterile Filtration

- **PBS:**

NaCl	8 g / l
KCl	0,2 g / l
Na ₂ PO ₄	1,15 g / l
KH ₂ PO ₄	0,2 g / l
EDTA	50 mM

- **BSA** von Sigma Chemical Co., St. Louis, 1 % oder 3 % gelöst in PBS, sterile Filtration
- Die **Filter**, um selbst hergestellte Pufferlösungen von eventueller Bakterienkontamination zu befreien hatten eine Porengröße von 0,2 µm und kamen von Nalge Nunc International, Rochester.
- Anti-Immunglobulin-Ak
 1. **Goat anti feIg G (H+L)** von Southern Biotechnology Associates, Birmingham
Antiserum aus Ziegen, die mit felinem Ig G hyperimmunisiert wurden, erkennt spezifisch schwere (H, heavy) und leichte (L, light) Ketten feliner Ig G und evtl. unspezifisch leichte Ketten anderer feliner Immunglobuline, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (HRPO)
 2. **Goat anti feIg M** von Bethyl Laboratories, Montgomery
Antiserum aus Ziegen, die mit felinem Ig M hyperimmunisiert wurden, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (HRPO)
 3. **Goat anti muIg G+M (H+L)** von Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
Antiserum aus Ziegen, die mit murinem Ig G und Ig M hyperimmunisiert wurden, erkennt spezifisch schwere Ketten muriner Ig G und Ig M sowie evtl. unspezifisch leichte Ketten anderer muriner Immunglobuline, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (HRPO)
 4. **Goat anti muIg G (H+L)** von Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
Antiserum aus Ziegen, die mit murinem Ig G hyperimmunisiert wurden, erkennt spezifisch schwere und leichte Ketten muriner Ig G sowie evtl. unspezifisch leichte Ketten anderer muriner Immunglobuline, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (HRPO)

12.2 Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Serum

Alle Reagenzien aus QUANTIKINE® (R&D-Systems, Minneapolis, Catalog Number D2050) auf Raumtemperatur, Proben 4 °C

Standardlösung und Serum werden in der Pufferlösung RD 6 E verdünnt

- 100 µl Pufferlösung RD 1 A pro Vertiefung
- 100 µl huIL 2-Standard oder verdünntes Serum pro Vertiefung
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 200 µl Antikörperlösung pro Vertiefung
polyklonale anti-huIL 2-Ak, peroxidasegekoppelt
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 200 µl Revelationslösung pro Vertiefung:
Tetramethylbenzidin als Farbstoff, gemischt mit H₂O₂ (Color Reagent A und B 1 : 1 gemischt)
- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 50 µl H₂SO₄ (2 N) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 min

12.3 Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline G

- Beschichten einer 96er ELISA-Platte mit flachem Boden mit 100 µl Proleukin® (Wirkstoff: Aldesleukin, CHIRON, Amsterdam) pro Vertiefung, das in Karbonatpuffer auf eine Konzentration von 2 µl / ml verdünnt wurde → 0,2 µl Proleukin® pro Vertiefung
- Inkubation über Nacht bei 4 °C, die Platten müssen gut verpackt gegen Eintrocknung geschützt werden
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 150 µl PBS-BSA 3 % pro Vertiefung zur Absättigung
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- Platte umstürzen und abtropfen lassen, kein Waschen
- 100 µl verdünntes Serum pro Vertiefung, Kontroll- oder Probenserum in PBS-BSA 1 %
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl peroxidasegekoppelte anti-Ig G-Antikörper pro Vertiefung
1 : 5000 verdünnt in PBS-BSA 1 %
- 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl Revelationslösung pro Vertiefung: 6 ml Natriumazetat 0,1 M
6 ml Zitronensäure 0,1 M
120 µl TMB
2 µl H₂O₂

- Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung bis eine deutliche Farbabstufung in der Verdünnungsreihe der positiven Kontrollseren sichtbar wird (ca. 10 min)
- 100 μl H_2SO_4 (0,8 M) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm

12.4 Versuchsprotokoll ELISA Anti-huIL 2-Antikörper: Immunglobuline M

- Beschichten einer 96er ELISA-Platte mit flachem Boden mit 100 µl Proleukin® (Wirkstoff: Aldesleukin, CHIRON, Amsterdam) pro Vertiefung, das in Karbonatpuffer auf eine Konzentration von 2 µl / ml verdünnt wurde → 0,2 µl Proleukin® pro Vertiefung
- Inkubation über Nacht bei 4 °C, die Platten müssen gut verpackt gegen Eintrocknung geschützt werden
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 150 µl PBS-BSA 3 % pro Vertiefung zur Absättigung
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- Platte umstürzen und abtropfen lassen, kein Waschen
- 100 µl verdünntes Serum pro Vertiefung, Kontroll- oder Probenserum in PBS-BSA 1 %
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl peroxidasegekoppelte anti-Ig M-Antikörper pro Vertiefung
1 : 20000 verdünnt in PBS-BSA 1 %
- 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl Revelationslösung pro Vertiefung: 6 ml Natriumazetat 0,1 M
6 ml Zitronensäure 0,1 M
120 µl TMB
2 µl H₂O₂

- Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung bis eine deutliche Farbabstufung in der Verdünnungsreihe der positiven Kontrollseren sichtbar wird (ca. 10 min)
- 100 μl H_2SO_4 (0,8 M) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm

12.5 Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline G

- Beschichten einer 96er ELISA-Platte mit flachem Boden mit 100 µl inaktivierten Adenoviren in Karbonatpuffer pro Vertiefung, 10^{10} tp pro Platte, 10^8 tp pro Vertiefung
- Verwendung von AdCMVβGal TG 14682 mit $3,3 \times 10^{12}$ tp / ml oder Adenoviren ohne Transgen TG 15149 mit 5×10^{12} tp / ml
- UV-Inaktivierung in Petrischalen in aufgetautem Zustand, verdünnt in Karbonatpuffer: 3 x 5 min UV-Einstrahlung, Lagerung auf Eis, dazwischen je 2 min Pause mit Schwenken der Virenlösung
- Verdünnung in Karbonatpuffer, um 10^8 tp pro Vertiefung zu binden
- Inkubation über Nacht bei 4 °C, die Platten müssen gut verpackt gegen Eintrocknung geschützt werden
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 150 µl PBS-BSA 3 % pro Vertiefung zur Absättigung
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- Platte umstürzen und abtropfen lassen, kein Waschen
- 100 µl verdünntes Serum pro Vertiefung, Kontroll- oder Probenserum in PBS-BSA 1 %
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl peroxidasegekoppelte anti-Ig G-Antikörper pro Vertiefung
1 : 5000 verdünnt in PBS-BSA 1 %
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20

ANHANG

- 100 μl Revelationslösung pro Vertiefung: 6 ml Natriumazetat 0,1 M
6 ml Zitronensäure 0,1 M
120 μl TMB
2 μl H_2O_2
- Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung bis eine deutliche Farbabstufung in der Verdünnungsreihe der positiven Kontrollseren sichtbar wird (ca. 10 min)
- 100 μl H_2SO_4 (0,8 M) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm

12.6 Versuchsprotokoll ELISA antiadenoviraler Antikörper: Immunglobuline M

- Beschichten einer 96er ELISA-Platte mit flachem Boden mit 100 µl inaktivierten Adenoviren in Karbonatpuffer pro Vertiefung, 10^{10} tp pro Platte, 10^8 tp pro Vertiefung
- Verwendung von AdCMVβGal TG 14682 mit $3,3 \times 10^{12}$ tp / ml oder Adenoviren ohne Transgen TG 15149 mit 5×10^{12} tp / ml
- UV-Inaktivierung in Petrischalen in aufgetautem Zustand, verdünnt in Karbonatpuffer: 3 x 5 min UV-Einstrahlung, Lagerung auf Eis, dazwischen je 2 min Pause mit Schwenken der Virenlösung
- Verdünnung in Karbonatpuffer, um 10^8 tp pro Vertiefung zu binden
- Inkubation über Nacht bei 4 °C, die Platten müssen gut verpackt gegen Eintrocknung geschützt werden
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 150 µl PBS-BSA 3 % pro Vertiefung zur Absättigung
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- Platte umstürzen und abtropfen lassen, kein Waschen
- 100 µl verdünntes Serum pro Vertiefung, Kontroll- oder Probenserum in PBS-BSA 1 %
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 100 µl peroxidasegekoppelte anti-Ig M-Antikörper pro Vertiefung
1 : 20000 verdünnt in PBS-BSA 1 %
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20

ANHANG

- 100 µl Revelationslösung pro Vertiefung: 6 ml Natriumazetat 0,1 M
6 ml Zitronensäure 0,1 M
120 µl TMB
2 µl H₂O₂
- Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung bis eine deutliche Farbabstufung in der Verdünnungsreihe der positiven Kontrollseren sichtbar wird (ca. 10 min)
- 100 µl H₂SO₄ (0,8 M) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm

12.7 Versuchsprotokoll Neutralisationstest

Aussäen von 60000 Zellen pro Vertiefung auf einer Zellkulturplatte mit 96 Probenvertiefungen mit flachem Boden

- Kulturmedium aus der 175 cm²-Flasche, die eine zu ca. 80 – 90 % konfluente PER.C6®-Zellkultur enthält, vorsichtig entfernen
- Doppeltes Waschen des Zellrasens mit jeweils 10 ml PBS
- Ablösen der Zellen mit 1 ml vorgewärmtem Trypsin (37° C)
- 5 min Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂
- Zentrifugation der in 10 ml Medium (DMEM + 1 / 100 Glutamin + 1 / 100 Gentamizin + 1 / 100 ml MgCl₂ 1 M + 1 / 10 FCS) aufgenommenen Zellen (4 min bei 1500 Umdrehungen)
- Nach Zählen der Zellen unter dem Mikroskop in Medium verdünnen auf 3 x 10⁵ Zellen pro ml
- 200 µl pro Vertiefung
- ca. 30 h Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂

Inkubation der Viren mit dem Katzenserum und Zellinfektion

- AdβGal TG 14682 vom 14.09.2000, 3,4 x 10¹² tp / ml entspricht 1,8x10¹¹ i. u. / ml
- Auftauen eines Aliquots im Wasserbad (37 °C)
- Verdünnen auf 6 x 10⁴ i. u. / 100 µl in PBS-BSA 1 %
- 100 µl Viruslösung pro Vertiefung auf einer leeren Zellkulturplatte
- Zugabe des Katzenserums in Verdünnungen von 1 : 50 bis zu 1 : 1600
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur unter dem Abzug
- 100 µl des Viren-Serum-Gemisches wird in jede Vertiefung der am Tag zuvor ausgesäten PER.C6®-Zellkulturplatte gegeben, nachdem aus dieser durch Umstürzen das Medium entfernt wurde
- 1 h Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂

- Zugabe von 100 µl Medium pro Vertiefung ohne die Viruslösung zu entfernen
- 20 h Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂

Nachweis und Quantifizierung infizierter Zellen

- Durch Umdrehen der Platte wird die Flüssigkeit vom Zellrasen entfernt
- 100 µl PBS pro Vertiefung zum Waschen
- Durch Umdrehen der Platte wird die Flüssigkeit vom Zellrasen entfernt
- 100 µl Substratlösung zum Nachweis pro Vertiefung

Pufferlösung:	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	100 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-Mercaptoethanol	500 mM

Nachweisreagenz:	Puffer	4 ml
	4-Methylumbelliferyl-β-D-Galaktosid (MUG)*	0,4 ml
	Triton X-100 (10 %ig, in H ₂ O verdünnt)	20 ml
	H ₂ O	16 ml

- 45 min Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂
- Auslesen der β-Galaktosidase-Aktivität bei 340 / 460 nm (System Victor, Wallach)

* 20 mg werden in 1 ml DMSO gelöst

12.8 Versuchsprotokoll ELISA huIL 2-Konzentration im Zellkulturüberstand

Alle Reagenzien aus QUANTIKINE® (R&D-Systems, Minneapolis, Catalog Number D2050) auf Raumtemperatur, Proben 4 °C

Standardlösung und Serum werden in der Pufferlösung RD 5 verdünnt

- 100 µl Pufferlösung RD 1 A pro Vertiefung
- 100 µl huIL 2-Standard oder verdünntes Serum pro Vertiefung
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 200 µl Antikörperlösung pro Vertiefung
polyklonale anti-huIL 2-Ak, peroxidasegekoppelt
- 2 h Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 3 Waschvorgänge mit Absaugen
Lösung: PBS, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20
- 200 µl Revelationslösung pro Vertiefung:
Tetramethylbenzidin als Farbstoff, gemischt mit H₂O₂ (Color Reagent A und B 1 : 1 gemischt)
- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung
- 50 µl H₂SO₄ (2N) pro Vertiefung zum Stoppen der Nachweisreaktion
- Auslesen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 min

13 DANKSAGUNG

Mein Dank für die Überlassung dieses ausgesprochen interessanten Themas gilt dem Institut für Experimentelle Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. B. Gänsbacher. Die persönliche und fachliche Unterstützung auch durch mehrere weitere Mitarbeiter besonders in der Einarbeitungsphase in das Thema in München waren sehr hilfreich. Thomas Brill hat mir mit Rat und Tat, Aufmunterung, Päckchen und Reisen nach Straßburg die Arbeit sehr angenehm gestaltet. Er war zu jeder Zeit für mich da und hat mit Beratung und Betreuung zum Gelingen mit aller Kraft beigetragen.

Herrn Prof. Dr. J. Hirschberger danke ich sehr für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der LMU München, freundliche und geduldige Hilfestellung und Beratung sowie Unterstützung bei auftretenden Problemen.

Meiner Familie gilt der Dank für das aufgebrachte Verständnis, jegliche Unterstützung und sogar die Mühe des Korrekturlesens von Fachkauderwelsch genauso wie Horst Stratmann, der nicht nur immer für mich da war, sein Arbeitszimmer für mich räumte, ein offenes Ohr hatte und viele Abende auf mich verzichten musste, sondern ohne den auch das Aufzwingen der eigenen Vorstellungen auf den nie funktionierenden Computer aussichtslos gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt Thorsten Schweikardt, der mir mit dem Konvertieren unlesbarer Dateien und dem Zugriff auf viele Veröffentlichungen unschätzbare Dienste erwiesen hat, und Steffi Schlemmer, die immer für einen guten Informationsaustausch zwischen München, Straßburg und Bingen gesorgt hat. Beiden auch herzlichen Dank für die erste Durchsicht des Manuskripts. Auch den anderen Doktoranden des Projektes (Susanne Wieland, Jenny Ludwig, Katrin Wiedmann und Niels Kjaergaard) danke ich herzlich für die zigfachen Blutentnahmen, das Zentrifugieren, Einfrieren, Ordnen und Verschicken der Proben. Allen Freunden gilt die Danksagung für moralische Unterstützung und verständnisvolles Warten auf stressfreiere Zeiten.

14 REMERCIEMENTS

Le temps que j'ai passé à Strasbourg était inoubliable. Je remercie toute l'équipe à TRANS-GENE SA qui était toujours là pour m'aider avec tous les problèmes organisationnels, linguistiques, sur le plan professionnel et personnel. Je remercie Horst Homann, le chef du projet, qui a planifié les expériences et qui m'a présenté le sujet. J'adresse ma reconnaissance à Jean-Marc Balloul, le chef du Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, qui m'a toujours écoutée et soutenue. L'ambiance accueillante et chaleureuse dans nos labos était due à Caroline Tosch, Annie Findeli et Marie Aude Boucabeille auxquelles j'ai fait une place dans mon cœur. Pour toute aide compétente je tiens à remercier Christelle Ziller, Catherine Ledoux, Annick Dieterle et beaucoup d'autres âmes fidèles et serviables. Je n'aurais pas pu effectuer tout le travail sans Céline Halluard, Cécile Doderer et Frédéric Marchal qui étaient toujours là quand j'avais besoin d'eux. Je ne veux pas oublier Bruce Acres, Stéphane Paul, Bastien Calmels, Murielle Gantzer, Dominique Villeval, Philippe Erbs, Stéphane Oudin, Micael De Meyer, Yannick Durringer, Benoit Heller et Teobaldo Benites ainsi que Catherine Pecher, Valérie Schreiber et Fabrice Auge qui ont beaucoup contribué à la réussite de ma thèse avec leur amitié et leur appui. Patrick Squiban et Philippe Slos se sont engagés pour continuer le projet avec beaucoup de patience et d'intérêt. Je vous remercie tous.



