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
Medizinische Kleintierklinik
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Katrin Hartmann

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

Klonieren der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze

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

von
Bianca Christine Schwarz
aus
Kötzting

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
2. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. M. Förster

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	**Einleitung**	**1**
II	**Schrifttum**	**3**
1	Fibrosarkom der Katze	3
1.1	Ätiologie und Pathogenese	4
1.2	Inzidenz	5
1.3	Klinisches Bild	5
1.4	Histologie	6
1.5	Therapie	7
1.6	Prognose	9
1.7	Prophylaxe	9
2	Gentherapie	11
2.1	Gentherapie in der Tiermedizin	15
2.2	Nonviraler Gentransfer mit Kollagenschwamm	20
3	Tumorimmunologie und Antitumorimmunität	24
3.1	Tumorimmunologie	24
3.2	Antitumorimmunität	26
4	Zytokine	28
4.1	Interleukin 2 (IL-2)	28
4.1.1	Molekularbiologische Charakterisierung	29
4.1.2	Molekularer Vergleich von IL-2 verschiedener Spezies	29
4.1.3	Biologische Aktivität	30
4.1.4	Nebenwirkungen	32
4.1.5	Klinische Anwendung in der Humanmedizin	33
4.1.6	Einsatz in der Tiermedizin	33
4.2	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	34
4.2.1	Molekularbiologische Charakterisierung	35
4.2.2	Molekularer Vergleich von GM-CSF verschiedener Spezies	35
4.2.3	Biologische Aktivität	36
4.2.4	Nebenwirkungen	37

4.2.5	Klinische Anwendung in der Humanmedizin	38
4.2.6	Einsatz in der Tiermedizin	38
4.3	Interferon γ (IFNγ)	39
4.3.1	Molekularbiologische Charakterisierung	39
4.3.2	Molekularer Vergleich von IFNγ verschiedener Spezies	40
4.3.3	Biologische Aktivität	40
4.3.4	Nebenwirkungen	42
4.3.5	Klinische Anwendung in der Humanmedizin	43
4.3.6	Einsatz in der Tiermedizin	43
5	Immuntherapie von Tumoren unter besonderer Berücksichtigung der Gentherapie mit den Zytokinen IL-2, GM-CSF und IFNγ	45

III	**Eigene Untersuchungen**	**48**
	Zielsetzung	48
A	**Material und Methoden**	**49**
	Materialienachweis	49
1	Klonierung der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ	57
1.1	Gewinnung von cDNA	57
1.1.1	Isolierung von felinen mononukleären Zellen aus peripherem Blut	57
1.1.2	Stimulierung von mononukleären Zellen	58
1.1.3	mRNA Extraktion	59
1.1.4	Reverse Transkription	60
1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	61
1.2.1	Primerdesign	62
1.2.2	Amplifikationsreaktion	64
1.3	Agarosegelelektrophorese	67
1.3.1	Präparative DNA Gelelektrophorese	68
1.3.2	DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen	68
1.4	Klonierung der PCR-Produkte in den Expressionsvektor	68
1.4.1	Plasmid	68

1.4.2	Restriktionsverdau des Vektors	70
1.4.3	Restriktionsverdau der PCR-Produkte	71
1.4.4	Ligation	72
1.4.5	Transformation kompetenter Bakterien	74
1.4.6	Untersuchung transformierter Bakterien	75
1.5	Sequenzanalyse	76
1.6	Präparation von Plasmid-DNA	78
2	Biologische Wirksamkeit der rekombinanten Proteine	79
2.1	Kultivierung von COS-7 Zellen	79
2.2	Transfektion von COS-7 Zellen	80
2.3	Nachweis der biologischen Aktivität von felinem IL-2	81
2.3.1	Kultivierung von CTLL-2 Zellen	81
2.3.2	Proliferationstest IL-2	82
2.4	Nachweis der biologischen Aktivität von felinem GM-CSF	83
2.4.1	Kultivierung von TF-1 Zellen	83
2.4.2	Proliferationstest GM-CSF	84
2.5	Nachweis der biologischen Aktivität von felinem IFNγ	85
2.5.1	MHC-Induktionstest mit felinen Fibrosarkomzellen	85
2.5.1.1	Kultivierung von felinen Fibrosarkomzellen	85
2.5.1.2	Durchflusszytometrie	85
2.5.2	MHC-Induktionstest mit PBMCs	89
2.5.2.1	Gewinnung von PBMCs	89
2.5.2.2	Durchflusszytometrie	89
3	Schwammbeschichtung	90

B	**Ergebnisse**	**92**

1	Klonierung und Sequenzierung	92
1.1	feIL-2	92
1.2	feGM-CSF	96
1.3	feIFNγ	101
2	Untersuchung der biologischen Wirksamkeit	105
2.1	feIL-2	105
2.2	feGM-CSF	109

2.3	feIFNγ	115
2.3.1	MHC-Induktionstest mit felinen Fibrosarkomzellen	115
2.3.2	MHC-Induktionstest mit PBMCs	119
3	Schwammbeschichtung	121
IV	**Diskussion**	**122**
1	Arbeitsverlauf	122
2	Speziesspezifische Zytokine	124
3	Tumormodell	125
4	Nonviraler Gentransfer mit Kollagenschwamm	126
4.1	Eingesetzter Kollagenschwamm	127
4.2	Schwammbeschichtung	128
5	Plasmid	129
6	PCR und Sequenzierung	131
6.1	Sequenzergebnis feIL-2	132
6.2	Sequenzergebnis feGM-CSF	132
6.3	Sequenzergebnis feIFNγ	133
7	Expressionssystem	134
8	Biologische Wirksamkeit	134
8.1	Proliferationstest feIL-2	135
8.2	Proliferationstest feGM-CSF	136
8.3	Bioassay feIFNγ	137
8.3.1	Bioassay mit felinen Fibrosarkomzellen	137
8.3.2	Bioassay mit felinen PBMCs	138
9	Feline Fibrosarkomzellen	139
V	**Zusammenfassung**	**141**
	Summary	**143**
VI	**Literaturverzeichnis**	**145**

VII Tabellenverzeichnis 180

VIII Abbildungsverzeichnis 181

IX Abkürzungsverzeichnis 182

X Anhang 187

1 Proliferationstest feIL-2 187
2 Proliferationstest feGM-CSF 188

XI Danksagung 189

XII Lebenslauf 190

I EINLEITUNG

Seit 1999 werden an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar (Technische Universität München) und der Chirurgischen Tierklinik (LMU München) verschiedene klinische Studien beim Fibrosarkom der Katze durchgeführt.

Das Fibrosarkom der Katze ist ein spontan auftretender, bösartiger Bindegewebstumor, der auch nach der Standardtherapie, der radikalen Tumorexstirpation, eine Rezidivneigung von etwa 70 % aufweißt, weshalb die Prognose als schlecht zu beurteilen ist.

In der folgenden Studie wird ein lokaler, nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene Interleukin 2, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor und Interferon γ durchgeführt. Hierfür wird ein Produkt entwickelt, welches aus einem resorbierbaren Kollagenschwamm als Trägermaterial besteht, der mit rekombinanten Zytokin-Gen-tragenden Plasmid-Komplexen beladen ist und den Katzen nach der Tumorexstirpation ins Wundbett implantiert wird.

Von den verwendeten Zytokinen erhofft man sich eine immunstimulierende Wirkung im Sinne einer Verbesserung der Antigenpräsentation, der Generierung von Memory T-Zellen, die Antigene des Fiborsarkoms spezifisch erkennen und einer Aktivierung von Effektorzellen, welche in der Lage sind die Tumorzellen abzutöten. Durch die Bildung einer Antitumorimmunität soll so ein lokales Rezidiv des felinen Fibrosarkoms verhindert oder die rezidivfreie Zeit und damit die Überlebenszeit der Katzen verlängert werden.

Um die optimale Plasmiddosis zu ermitteln wird zunächst eine Phase I-Studie durchgeführt, in der die Katzen regelmäßig vor allem auf Anzeichen von Toxizität mittels eines angepassten CTCAE-Katalogs (*common terminology criteria for adverse events*) untersucht und in festen Abständen innerhalb eines Jahres nach der Therapie überwacht werden (165). Dieser Dosisfindungsstudie soll anschließend eine Phase II-Studie folgen. Bei erfolgreichem Abschluss beider Studien könnte diese gentherapeutische Immuntherapie, adju-

vant zur chirurgischen Standardtherapie des Fibrosarkoms, unter tiermedizinischen Praxisbedingungen durchgeführt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung des, die Transgene feIL-2, feGM-CSF und feIFNγ tragenden Kollagenschwammes, der in der Therapiestudie zum Einsatz kommt:

1. Das Klonieren der drei felinen Zytokin-Gene aus genomischer DNA

2. Die Prüfung der biologischen Aktivität der entstehenden Proteine

3. Die Beschichtung des Kollagenschwammes mit den Genvektoren

II Schrifttum

1 Fibrosarkom der Katze

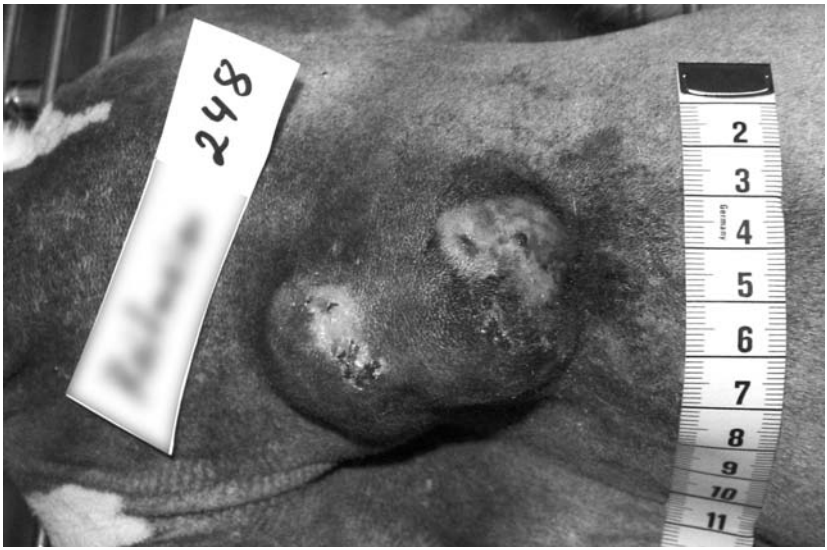


Abb. 1: Felines Fibrosarkom in typischer Lokalisation mit Tendenz zur Ulzeration.
Katze mit Fibrosarkom aus dem Patientengut der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München.

Beim Fibrosarkom handelt es sich um einen malignen Bindegewebstumor, der mit über 40 % aller kutanen Neoplasien den häufigsten Hauttumor der Katze darstellt (156, 244, 310). Derzeit werden sowohl Ätiologie und Pathogenese als auch Prävention der so genannten vaccine- oder injektionsassoziierten Fibrosarkome verstärkt diskutiert. Darüber hinaus wird versucht eine zufriedenstellende, erfolgversprechende Therapie zu finden.

Neben dem injektionsassoziierten Fibrosarkom kommen das feline Sarkomvirus (FeSV)-induzierte, das intraokuläre und das nicht-injektionsassoziierte Fibrosarkom bei der Katze vor (143). Im Gegensatz zum FeSV-induzierten und zum intraokulären Fibrosarkom, bei dem Traumen oder Uveitiden als Tumorgenesefaktoren gelten, bleiben bei nicht-injektionsassoziierten Fibrosarkomen die tumorauslösenden Faktoren meist unbekannt (77, 143, 351).

1.1 Ätiologie und Pathogenese

Anfang der 90er Jahre wird von den amerikanischen Pathologen M. Hendrick und M. Goldschmidt erstmals der Zusammenhang zwischen der steigenden Anzahl an Fibrosarkomen bei der Katze und der staatlich angeordneten Tollwutimpfung in Pennsylvania, USA hergestellt (137). Besonders im Verdacht Fibrosarkome an Injektionsstellen zu verursachen stehen zwei spezifische Impfungen: Tollwut- und FeLV-Vaccine (137, 193). Da sich Aluminium, welches als Adjuvans in verschiedenen Impfstoffen enthalten ist als phagozytiertes Material in Makrophagen nachweisen lässt (57, 122, 138), wird vermutet, dass dies das auslösende Agens sein könnte (138). Es werden jedoch auch Fibrosarkome an vermeintlichen Injektionsstellen bei Katzen nachgewiesen, die keine Impfungen (316) oder aluminiumfreie Vaccinen erhalten haben (161). In der letzten Zeit geht man immer mehr dazu über diese Tumoren nicht mehr als vaccineassoziiert sondern als *injection-site fibrosarcomas* zu bezeichnen (316), da auch von anderen auslösenden Noxen berichtet wird: So soll chirurgisches Nahtmaterial (35) oder auch die Injektion eines Depotpräparates (87) die Tumorbildung induziert haben.
Als primärer Auslöser der Tumorenstehung wird heute die subkutane oder intramuskuläre, granulomatöse Entzündung gesehen, welche in Kombination mit anderen Faktoren zur Transformation der Bindegewebszellen führt (167). Generell scheinen alle Faktoren, die eine lokale Entzündung verursachen in prädisponierten Katzen potentiell ein Fibrosarkom auszulösen zu können (292). Dieses Phänomen ähnelt der Entwicklung von intraokulären Sarkomen nach chronischer Uveitis oder Trauma (77, 351).
Die Zeit, in der die Malignität sich nach einer Impfung entwickelt, wird von Doddy *et al.* mit drei Monaten bis zu drei Jahren angegeben (72), von Gobar und Kass mit vier Wochen bis zu zehn Jahren (112). Hierbei soll die, durch die Impfung entstandene, persistierende Entzündungsreaktion eine Veränderung der Gewebereparaturmechanismen bewirken, was wiederum in unkontrollierter Proliferation transformierter, mesenchymaler Zellen enden kann (72, 138, 194). Postvaccinale Entzündungsreaktionen treten etwa in einer Häufigkeit von 11,8 pro 10.000 Impfungen auf (112).
Eine genetische Prädisposition der betroffenen Katzen wird jedoch angenommen. So soll eine Mutation des p53-Gens, ein Tumorsuppressor-Gen, das normalerweise für eine Wachstumshemmung der Zellen verantwortlich ist, in der Pathogenese eine Rolle spielen (230). Ebenfalls diskutiert werden die Theorien, dass es durch Mutationen zu einer vermehrten Bildung von Wachstumsfaktoren kommt (304) oder auch bestimmte Onkogene aktiviert werden (167). Eine virale Beteiligung an der Tumorgenese kann

bisher für alle wichtigen Tumorviren ausgeschlossen werden (170). Letztendlich ist festzuhalten, dass die Ätiopathogenese noch nicht genau bekannt ist (292).

1.2 Inzidenz

Eine präzise Bestimmung der Inzidenz des injektionsassoziierten Fibrosarkoms ist sehr schwierig: Zum einen werden nicht alle felinen Fibrosarkome an pathologische Institute eingesandt und untersucht, zum anderen bleibt die Ursache des Fibrosarkoms auch nach histopathologischer Untersuchung oft unklar (112). Studien aus den USA schätzen das Risiko einer Tumorentstehung auf etwa einen Fall pro 1.000 bis 10.000 Katzen (58, 138, 161). Für Deutschland vermutet Kessler aufgrund der Einsendungen von Fibrosarkomen an fünf pathologische Institute eine Inzidenz von einem Fall pro 1.000 Katzen (166).

1.3 Klinisches Bild

Für injektionsassoziierte Fibrosarkome gibt es weder eine Rassen- noch eine Geschlechtsprädisposition. Es erkranken Katzen jeden Alters, wobei meist 8-12 Jahre alte Katzen betroffen sind (72, 138). Die häufigsten Lokalisationen sind die bevorzugten Applikationsorte für Impfungen: Nacken, Interscapularregion und seitlicher Thorax (siehe Abb. 1). In Amerika, wo oft intramuskulär am Hinterbein injiziert wird, sind die Tumoren gehäuft am Oberschenkel lokalisiert (130). Neben der intramuskulären Lage liegt der Tumor hauptsächlich subkutan (138).
Im Gegensatz dazu tritt das nicht-injektionsassoziierte Fibrosarkom am häufigsten am Kopf auf und zeigt bevorzugt eine dermale Lage (72).

Rapides und lokal invasives Wachstum sind charakteristisch für das Fibrosarkom (72). Der knotig-derbe Tumor wächst stark infiltrativ, obwohl er palpatorisch und bei der Exzision durch Ausbildung einer Pseudokapsel gut abgegrenzt erscheint (244). Die Schnittfläche zeigt neben knorpelig oder knöchern erscheinenden Arealen oft auch schleimbildende Anteile. Ungefähr 25 % aller Tumoren weisen zentrale, flüssigkeitsgefüllte Kavitäten auf, die wahrscheinlich sekundär infolge von rapidem Wachstum und Nekrose entstehen (57, 72). Sie sind meist mit Makrophagen, Neutrophilen und Kern-

trümmern infiltriert (72). Peritumoral findet man oft entzündliche Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen (57), welche denen der postvaccinalen Entzündung ähneln (138, 139). Manchmal kommt es auch zur Ulzeration des Tumors (140) (siehe auch Abb. 1).

Die Rezidivrate wird mit über 70 % angegeben, wobei die des injektionsassoziierten höher liegt als die des nicht-injektionsassoziierten Fibrosarkoms (29, 72, 244, 310, 338). Sehr häufig fehlt jedoch bei diesen Angaben eine Beschreibung der Operationstechnik (siehe unten). Hershey *et al.* zeigen in ihren Untersuchungen, dass nach marginaler Tumorexzision die mittlere rezidivfreie Zeit bei 79 Tagen, nach radikaler Operation bei 325 Tagen liegt (140). Wieland gibt eine mittlere rezidivfreie Zeit von 6 Monaten an, wobei die Fibrosarkome *en-bloc* mit einem Abstand zur palpablen Tumorgrenze von 3 cm im gesunden Gewebe entfernt werden (338).

Die Metastasierungsrate liegt nach älterer Literatur bei ca. 5-10 % (29, 244), neuere Untersuchungen beziffern sie mit 10-20 % (50, 140, 195, 338). Die Metastasierung erfolgt meist im Spätstadium der Erkrankung und wird überwiegend nach multipler Rezidivbildung oder Behandlung mit Chemo- oder Radiotherapie festgestellt. Die Metastasen finden sich bevorzugt in Lunge und Lymphknoten aber auch in anderen inneren Organen (27, 140, 244).

Das Phänomen des injektionsassoziierten Fibrosarkoms ist allerdings nicht nur - wie ursprünglich angenommen - auf die Katze beschränkt, sondern tritt auch beim Frettchen auf (227). Bei einem Vergleich von caninen Fibrosarkomen mit injektionsassoziierten Fibrosarkomen der Katze ergeben sich bei der Untersuchung von Tumoren an typischen Injektionsstellen Hinweise auf eine mögliche Entstehung von Fibrosarkomen nach Impfungen auch beim Hund (327).

1.4 Histologie

Mikroskopisch sind vor allem Spindelzellen und histiozytäre Zellen zu sehen, die in langen Faszikeln angeordnet sind, durchmischt mit mehrkernigen "osteoklastenartigen" Riesenzellen (27). Die Anzahl der Riesenzellen korreliert nach Untersuchungen von Couto *et al.* positiv mit dem Tumorgrad (57). Nach Grösslinger *et al.* besteht jedoch keine

Abhängigkeit vom *grading* des Tumors (122). Weitere histologische Merkmale, wie Nekrose, vermehrte mitotische Aktivität und zellulärer Pleomorphismus, deuten auf einen aggressiven Tumor hin (143).
Obwohl injektionsassoziierte Fibrosarkome und solche anderer Genese sich im Einzelfall histologisch nicht eindeutig unterscheiden lassen, bestehen bestimmte signifikante Differenzen (143). Die Anwesenheit von Entzündungsanzeichen und das von Makrophagen phagozytierte Aluminium sprechen für ein injektionsassoziiertes Fibrosarkom (72, 138).
Die bei einer Feinnadelaspiration gewonnenen spindelförmigen bis polygonalen Zellen liegen einzeln oder in kleinen Verbänden. Die rund-ovalen Kerne besitzen meist mehrere deutliche Nukleoli (143).

1.5 Therapie

Leider gibt es gegenwärtig keine optimale Therapie des felinen Fibrosarkoms (195). Als derzeitige Standardtherapie gilt die radikale chirurgische Exzision (143). Empfohlen wird eine möglichst frühzeitige Operation noch kleiner Tumoren *en-bloc* mit einem Abstand zur palpablen Tumorgrenze von 3 cm und einem Tiefenabstand von mindestens einer Muskel- bzw. Faszienschicht (122). Dies bedeutet, dass je nach Lage auch Teile der Rückenmuskulatur, Dornfortsätze der Wirbelsäule, proximale Anteile der Scapula oder Teile der Thoraxwand mit entfernt werden müssen (167, 304). Bei Fibrosarkomen an den Gliedmaßen ist eine Amputation oft unumgänglich (167).

Neben der chirurgischen Therapie kann eine adjuvant oder neoadjuvant durchgeführte Radiotherapie sinnvoll sein, die jedoch in Deutschland nur in wenigen Kliniken angeboten wird. Auch verschiedene Chemotherapie-Programme, z. B. mit Doxorubicin, sind beschrieben (143). Die Multimodalitätstherapie, d. h. aggressive Exzision verbunden mit Bestrahlung und Chemotherapie, stellt nach Séguin derzeit die Behandlung mit der besten Prognose dar (292).

Immuntherapien haben das Ziel die körpereigene Abwehr gegenüber dem Tumor zu steigern. Viele dieser Therapieansätze sind bislang rein experimentell, auch die Fallzahlen in diesen Studien sind größtenteils, wie auch bei den zuvor erwähnten Studien mit Radio- und Chemotherapie, sehr gering.

King *et al.* beschreiben den Einsatz von Acemannan bei fünf Katzen in Kombination mit Operation und Bestrahlung. Dieser Immunmodulator soll über eine gesteigerte Zytokinausschüttung unter anderem die unspezifische Zytotoxizität und Phagozytoserate steigern (171).
Couto *et al.* bewerten den therapeutischen Einsatz von Zytokinen, wie GM-CSF, IFNγ oder anderen immunregulierenden Komponenten als wertvolle Behandlungsmöglichkeit des Fibrosarkoms (57). Ob mit mehrmaligen lokalen Injektionen von Virbagen omega® (rekombinantes felines IFNω) vor und nach der Tumorexstirpation eine Reduktion der Rezidivrate erreicht werden kann, wird derzeit im Rahmen einer Phase II-Studie geprüft (127).

Studien einer französischen Arbeitsgruppe zeigen, dass eine adjuvant zur Operation und lokaler Bestrahlung durchgeführte Gentherapie mit Interleukin 2 die Rezidivrate dieses felinen Tumors senken kann. Dadurch kann die mittlere Überlebenszeit der Katzen in einer Studie signifikant verlängert werden (157, 253).
Auf dem gleichen Prinzip basieren die an der Medizinischen Kleintierklinik (LMU München) durchgeführten viralen und nonviralen Gentherapiestudien. Bei den ersten Studien erhalten die Katzen innerhalb einer Woche nach der Tumorexstirpation fünf Injektionen eines rekombinanten Adenovirus ins Tumorbett, oder intratumorale Injektionen dieser Virus-Suspension 14 und sieben Tage vor der Operation. Die verwendeten Viren sind replikationsdefekt und tragen die Transgene huIL-2 (humanes Interleukin 2) und feIFNγ (felines Interferon γ) (225, 337, 338). In einem nonviralen Gentransferprotokoll wird den Katzen an Eisenoxid assoziierte huGM-CSF Plasmid-DNA 14 und sieben Tage präoperativ intratumoral injiziert, welche mittels Magnetofektion im Tumorgebiet bleibt (284). Mit diesen Formen der Immunstimulation konnte die Rezidivrate nach einem Jahr gesenkt werden.

Durch lokale elektrische Impulse, welche Zellen für kurze Zeit permeabel machen, können Mir *et al.* das intravenös verabreichte zytotoxische Bleomycin in Fibrosarkomzellen einbringen. Mit dieser, von den Katzen gut tolerierten Elektrochemotherapie wird ein Sistieren des Tumorwachstums und eine verlängerte Überlebenszeit der Katzen erreicht (217). Eine zusätzliche lokale Injektion von IL-2 sezernierenden Zellen in das, nach der Elektrochemotherapie entstehende, peritumorale Ödem könnte, wie bei Mäusen gezeigt, systemische antitumoröse Effekte erbringen (216, 268).

Auch andere Therapieansätze werden derzeit untersucht, so spielen der *platelet-derived growth-factor* (PDGF) und sein Rezeptor beim Wachstum des injektionsassoziierten Fibrosarkoms eine Rolle. Imatinibmesylate inhibiert PDGF und könnte so eventuell die Chemosensitivität des Tumors verstärken (162).
Ebenfalls experimentell ist der Einsatz von Hyperthermie, wodurch sich die Akkumulation von zuvor intravenös applizierten Liposomen im felinen Fibrosarkom signifikant erhöhen lässt, so daß eine Behandlung mit chemotherapeutikaenthaltenden Liposomen denkbar wäre (203).
Auch Gentherapie mittels Enzym-*Prodrug*-Strategie könnte eine zusätzliche Behandlungsmöglichkeit dieses Tumors darstellen (199) (siehe Kap. II 2.1).

1.6 Prognose

Die Prognose des felinen Fibrosarkoms ist vor allem aufgrund der hohen Rezidivrate als schlecht zu beurteilen (143). Faktoren, welche zur Prognosestellung herangezogen werden sind Lokalisation und Größe des Primärtumors, also seine Resezierbarkeit. Grundsätzlich haben Primärtumoren eine bessere Prognose als Rezidive (50). Auch der Wachstumstyp sowie die Resektionsränder scheinen entscheidende Faktoren für die Rezidivbildung zu sein; so können Grösslinger *et al.* zeigen, dass mit einem vergrößerten Resektionsabstand zu den Tumorgrenzen die Anzahl rezidivfreier Katzen steigt (122).

1.7 Prophylaxe

Aufgrund der schlechten Prognose sollte mehr Wert auf die Prävention gelegt werden, wie dies die 1996 gegründete *Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force* (VAFSTF) empfiehlt: Sowohl eine Reduktion überflüssiger Impfungen, da das Risiko einer Katze an einem injektionsassoziierten Tumor zu erkranken mit der Anzahl der verabreichten Impfungen steigt, als auch eine Änderung der Impftechniken werden gefordert (195, 324). Grösslinger *et al.* empfehlen eine Injektion in die Flanke, da dort eine vollständige Resektion der Fibrosarkome möglich ist (122). Interscapuläre und intramuskuläre Injektionen sind zu vermeiden (143). Die VAFSTF favorisiert eine Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes in den distalen Bereich des rechten Hinterbeins, der Leukose-Vaccine distal am linken Hinterbein und aller anderen Vaccinen in die rechte Schulter

(239, 324), da Beinamputationen eine bessere Chance der Tumorkontrolle haben als Resektionen am Körper (211). Neben vielen anderen Empfehlungen der VAFSTF soll auch versucht werden die jährlichen Impfabstände zu verlängern (195), da nach neueren Studien der Impfschutz weitaus länger anhält (130).

2 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen von Genen in Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieser Gene einen therapeutischen Nutzen zu erreichen. Das gewünschte Gen kann mit molekularbiologischen Methoden aus dem Genom einer Zelle isoliert und in einen Vektor eingebaut werden, wobei dem Gen ein geeigneter Promoter vorgeschaltet wird, der später für die Transkription des Transgens sorgt. Der Vektor dient der Übertragung des Gens in eine Zelle. Nach diesem so genannten Gentransfer wird in der Proteinbiosynthese der Zielzelle das Gen in das entsprechende Protein, den eigentlichen Wirkstoff, "übersetzt" (125).

Grundsätzlich unterscheidet man die somatische Gentherapie von der Keimbahn-Gentherapie:
Der Keimbahn-Gentransfer erhält durch den Eingriff in das Erbgut einer befruchteten Eizelle oder eines frühembryonalen Stadiums das Potenzial bestimmte Merkmale eines Individuums genetisch zu verändern. Diese Eigenschaften werden anschließend auch an alle nachfolgenden Generationen weitergegeben. Deshalb stößt die Keimbahn-Gentherapie international auf große ethische Bedenken und ist in Deutschland nach den Richtlinien der Ärztekammer aus wissenschaftlichen, medizinischen und ethischen Gründen unzulässig (34), sowie nach dem Embryonenschutzgesetz von 1990 und dem Gentechnikgesetz in der Fassung von 1997 verboten.
Beim somatischen Gentransfer ist das Einführen von Genen in ausgewählte Körperzellen und damit auch auf eine bestimmte Zeit beschränkt. Ziel ist es, durch die Expression bestimmter Proteine einen therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen für das Individuum zu erreichen.
Die Applikation des Gens kann entweder direkt in den Körper erfolgen (In-vivo-Gentherapie) oder aus dem Körper entnommene Zellen werden *in vitro* genetisch verändert und dann reinfundiert (Ex-vivo-Gentherapie). Bei der Ex-vivo-Gentherapie (Tumorvaccinen siehe Kap. II 5) können sowohl autologe (vom Patienten stammende) als auch allogene (von einem Spender stammende) Zellen verwendet werden (105).

Bei beiden gentherapeutischen Ansätzen werden derzeit eine Vielzahl von Vektorsystemen verwendet, die das therapeutische Gen in die Zielzellen einbringen sollen.

Den einfachsten Vektor stellt ein rekombinantes Plasmid dar, in das sowohl das gewünschte Gen und der Promotor, als auch Sequenzen zur gezielten Selektion (z. B. Antibiotikaresistenz-Gen) und zur Replikation des Plasmids kloniert sind. Die direkte Injektion nackter DNA in Gewebe, wie Muskulatur, oder auch systemisch in ein Gefäß ist zwar die sicherste Methode des Gentransfers, allerdings ist die Expressionshöhe durch den Abbau der DNA durch Nukleasen und das mononukleäre Phagozytosesystem limitiert (235).

Beim viralen Gentransfer nutzt man die Fähigkeit von Viren in Zellen eindringen zu können. Dabei handelt es sich meist um rekombinante, replikationsdefekte Viren, d. h. die Gene, welche einen infektiösen Zyklus erlauben, werden teilweise durch das therapeutische Gen ersetzt (7, 125). Je nach Anwendung und Zielzelle kommen verschiedene Viren zum Einsatz: Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV), Herpesviren, Papillomaviren, Vacciniaviren, etc. (7, 125, 267). Die größten Nachteile der viralen Vektoren sind die potentielle endogene Virusrekombination, eventuelle onkogene Effekte oder eine auftretende Immunantwort (93, 124, 235, 347).
In sehr speziellen Anwendungen finden auch replikationskompetente Viren Verwendung, z. B. zur viralen Onkolyse (43, 224).

Um Zielzellen zu transfizieren wird beim nonviralen Gentransfer häufig nackte DNA mit physikalischen Methoden kombiniert, wie z. B. Mikroinjektion, Elektroporation, biobalistische Methoden (*gene-gun*), Ultraschall, hydrodynamischer Druck (235) oder Magnetofektion (250, 277). Auch chemische Methoden werden erprobt um die Effizienz und Zellspezifität des Gentransfers zu verbessern (235). So werden mit der DNA komplexbildende Stoffe, wie Kalziumphosphat und Diethylaminoethyl-Dextran oder membranpermeabilisierende Stoffe, wie Glycerin und DMSO verwendet (26, 53, 283). Weitere Möglichkeiten des nonviralen Gentransfers sind Lipofektion und Polyfektion. Während man mit Hilfe der physikalischen und chemischen Methoden versucht zelluläre Membranen für die Plasmid-DNA (pDNA) durchlässig zu machen, ist es das Ziel der Lipo- und Polyfektion den Aufnahmeweg der Viren nachzuahmen, d. h. "synthetische Viren" darzustellen (283).
Bei der Lipofektion bilden kationische Lipide (z. B. DOTMA, DOTAP) mit der negativ geladenen DNA so genannte Lipoplexe, die vom Konzept her membranumhüllten Viren ähnlich sind (90, 210, 269).
Polyplexe und molekulare Konjugate ahmen Kapsid-Viren nach. Sie bestehen aus

Polykationen, welche mit der pDNA Komplexe bilden. Sowohl natürliche Kationen, wie Histone (343), als auch synthetische, wie Polyethylenimin, werden verwendet (26, 169, 271).
Auch Kombinationen dieser verschiedenen nonviralen Methoden sind möglich, z. B. die nonvirale Magnetofektion von pDNA mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, die mit einer polykationischen Schutzhülle (Polyethylenimin) versehen sind (250, 277).

Sowohl virale als auch nichtvirale Vektoren werden derzeit in einer Vielzahl klinischer Studien eingesetzt, wobei jeder Vektor Vor- und Nachteile hat, jedoch keiner alle Anforderungen eines idealen Vektorsystems erfüllt (37, 267).

Um die bei systemischem Gentransfer eventuell auftretenden Nebenwirkungen zu minimieren, findet beim zielgerichteten lokalen Gentransfer die Transfektion hauptsächlich im Zielgewebe statt; die unspezifische Genexpression in anderen Körperzellen kann durch so genanntes *drug targeting* verringert werden:

- physikalisches *targeting* durch unterschiedlichen Vektorverabreichungsmodus,
- *surface targeting* durch molekulare Konjugate, die an ein spezifisches Zelloberflächenprotein binden und so eine rezeptormediierte Endozytose des Komplexes zustande kommt oder
- *transcriptional targeting*, wobei gewebe- oder zellspezifische Promoteren benutzt werden.
- Auch der natürliche Tropismus eines viralen Vektors kann für die *targeted gene therapy* genutzt werden (7, 17, 269).

Die systemischen Wirkungen eines Gentransfers lassen sich weiterhin durch das Ein- bzw. Ausschalten von therapeutischen Genen kontrollieren (269). So kann z. B. durch die Verwendung von hitzeinduzierbaren Promotoren, basierend auf humanen Hitzeschockproteinen, die Transkription reguliert werden (186, 187).

Haupteinsatzgebiete der Gentherapie sind neben monogenen Erbkrankheiten, Infektionen (besonders durch das humane Immundefizienz Virus HIV) und kardiovaskulären Erkrankungen die malignen Erkrankungen (125). Die Anwendung in klinischen Studien beschränkt sich momentan auf schwere Krankheiten, insbesondere solche, die mit anderen Mitteln nicht heilbar oder tödlich sind (34).
Ursprünglich war die Heilung hereditärer genetischer Erkrankungen das Ziel gentherapeutischer Versuche (237, 342). Bei monogenetischen Erkrankungen, wie z. B.

der zystischen Fibrose oder der *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID), besteht der Therapieansatz darin, das defekte oder fehlende Gen in den Zellen durch Insertion und Expression einer normalen Kopie des Gens zu ersetzen, so genanntes *gene replacement* (128, 267, 268). Um die, bei dieser Art der Gentherapie erwünschte, stabile Expression des "korrektiven Gens" zu erhalten, muss dieses in das Genom integriert werden (237), was wiederum das potentielle Risiko der insertionalen Mutagenese mit sich bringt, z. B. die Leukämieerkrankung von Kindern nach retroviraler gentherapeutischer Behandlung von SCID (46, 93, 123, 237, 300, 347).
Für andere Erkrankungen ist meist eine transiente Expression ausreichend, bei der die Plasmide extrachromosomal vorliegen und im Laufe der Zellteilung verloren gehen (7, 53, 128).

Bei der Tumor-Gentherapie werden neben der Immuntherapie (siehe Kap. II 5) verschiedene Strategien verfolgt:

- Beim *gene replacement* (Substitutionsgentherapie) wird das defiziente oder mutierte Gen ersetzt, z. B. das Tumorsuppressorgen p53 (177, 269).
- Der maligne Phänotyp von Tumoren kann durch die Blockade der Transkription von Onkogenen, z. B. der ras-Gene (269) oder für das Tumorwachstum essentieller Faktoren (177) unterdrückt werden (18). So kann z. B. mit "Antisensetherapie" die Transkription oder Translation unterbrochen werden (17).
- Bei der "Suizidgentherapie" wandeln durch Gentransfer exprimierte Enzyme *prodrugs* in toxische Metaboliten um, z. B. phosphoryliert die Herpes-simplex-Thymidinkinase (HSV-tk) Ganciclovir zu einem Di- oder Triphosphat, welches durch Inhibition der DNA-Polymerase zytotoxisch wirkt (28, 177, 199).
- Auch die Erhöhung der Widerstandskraft von Zellen kann zur Therapie von Malignitäten beitragen (177). Das in hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks eingebrachte Multidrugresistenz-Gen dient der Protektion bei hoch dosierter Chemotherapie (128, 267, 269).

2.1 Gentherapie in der Tiermedizin

Auch für die rekombinante DNA-Technologie, einem der neuesten Gebiete der Molekularen Medizin, stellen sich Krankheiten der Haustiere als sehr wichtig heraus. Sie sind nicht nur ideale Modelle um potentielle therapeutische Ansätze für die Humanmedizin zu testen, sondern sie machen es auch möglich neue tiermedizinische Medikamente und Impfstoffe zu entwickeln (7).

Genetische Faktoren sind auch bei Haustieren in viele Krankheitsprozesse involviert. Einige Einzelgendefekte von Haustieren dienen als Modelle für Gentherapiestrategien der monogenetischen Erkrankungen des Menschen (7).
Vor allem im Bereich der Behandlung von Hämophilie A und B werden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Hämophilie A und B sind sowohl beim Menschen als auch beim Hund x-chromosomal rezessive Gerinnungsstörungen und resultieren in einem Gerinnungsfaktormangel: Faktor VIII bzw. Faktor IX.
Zunächst wird mit Gentransfer der humanen Faktor VIII- bzw. Faktor IX-Gene eine Phänotyp-Korrektur beim Hund vorgenommen, wobei die erreichten therapeutischen Level aufgrund von Antikörperbildung gegen die humanen Proteine nur von kurzer Dauer sind (48, 54). Deshalb folgen Studien mit caninen Faktoren. Bei beiden Hämophilie-Typen kann mit unterschiedlichen Gentherapieprotokollen eine hämostatische Korrektur von Wochen bis Monaten erreicht werden, die z. B. bei Hämophilie A 14 Monate (275) und bei Hämophilie B sogar über 17 Monate anhält (222). Allerdings treten auch bei einigen dieser Studien mit caninen Genen Komplikationen auf, wie akute vektorassoziierte Toxizität, hämatologische Veränderungen und eine Induktion neutralisierender Antikörper (255).

Für die *Duchenne muscular dystrophy* (DMD) wird ebenfalls ein Hundemodell verwendet. Die beim Golden Retriever einem x-chromosomal rezessivem Erbgang folgende, progressive Muskelschwäche ist charakterisiert durch Muskelfaserdegeneration und Nekrose. Nach adenoviralem Gentransfer des humanen Dystrophingens zeigen die Hunde, unter Immunsuppression mit Cyclosporin, eine Expression des Proteins über zwei Monate (52, 147, 238).

Auch andere Stoffwechselerkrankungen der Haustiere dienen, aufgrund ähnlicher Gen- und Proteindefekte, als Modell für die Humanmedizin um die Effektivität verschiedener

Gentherapien zu studieren (238). Dazu gehören autosomal rezessive lysosomale Speicherkrankheiten bei Hund und Katze, wie der feline Lipoproteinlipase-Mangel (182) oder verschiedene Mucopolysaccharidosen (340, 348). Die amerikanische Korat-Katze könnte z. B. als Modell für die Sandhoff-Krankheit dienen. Für diese neurologische Erkrankung (Typ II GM2-Gangliosidose) wären neurotrope virale Vektoren, wie das Herpes simplex Typ 1 Virus, gut geeignet (223).
Bei der erblichen Retinadegeneration kann beim Hund durch *gene replacement* sowohl eine strukturelle Verbesserung der Retina als auch eine Wiederherstellung des Visus erreicht werden (3, 231).
Neben dem Hund dient auch das Pferd als Modell für Gentherapiestudien bezüglich der Epidermiolysis bullosa, welche beim Belgischen Pferd zu Blasen in Haut und Maul sowie zur Exungulation führt (10, 303).

Das größte Gebiet gentherapeutischer Forschungen ist derzeit die Onkologie. 66 % der 918 klinischen Gentherapiestudien in der Humanmedizin werden, seit 1989, in diesem Bereich durchgeführt. Die Gründe dafür sind die hohe Prävalenz von Tumorerkrankungen, sowie deren häufig letaler Ausgang. 26 % dieser onkologischen Gentherapiestudien wiederum beschäftigen sich mit Zytokin-Gentransfer (81).
So auch viele Studien, die auf der Behandlung des caninen Melanoms basieren. Dieser spontan entstehende, sehr aggressive Tumor mit hoher Metastasenrate (75) stellt ein wichtiges Modell für das humane Melanom dar (325). Ein Hund mit malignem oralen Melanom und Lungenmetastasen zeigt im Mandibularlymphknoten immunsuppressive Zytokine, nicht jedoch IL-2, IFNγ oder IL-4. Catchpole *et al.* vermuten eine fehlende Aktivierung des Immunsystems (38).
So wird bei 16, an einem Melanom erkrankten Hunden eine autologe Tumorzellvaccine, bei welcher die Zellen mit huGM-CSF oder einem Reportergen transfiziert sind, eingesetzt. Bei dieser Ex-vivo-Gentherapie wird zwar nur bei drei von 16 Hunden eine klare Antitumoraktivität beobachtet, es kann jedoch in Biopsieproben von der Injektionsstelle 24 h post injektionem biologisch aktives huGM-CSF Protein nachgewiesen werden. Histologische Veränderungen am Injektionsort sind durch eine Neutrophilen- und Makrophageninfiltration charakterisiert (145). In einer anderen Studie werden - auch auf die Gentherapie von caninen malignen Melanomen abzielend - gesunden Hunden mittels *gene-gun*-Methode Reportergene, sowie IL-2, IL-6 oder GM-CSF in die orale Mucosa und Epidermis verabreicht. Es zeigt sich ebenfalls eine effektive, lokale Expression der transgenen Proteine, sowie eine durch Neutrophileninfiltration

charakterisierte Entzündungsreaktion (164).
In einigen Melanom-Studien werden bakterielle Superantigene mit Zytokin-Genen kombiniert. Die direkte intratumorale Injektion von Lipidkomplexen, welche Plasmide mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) und caGM-CSF bzw. caIL-2 enthalten (85, 75), induziert eine diffuse, lymphoplasmazelluläre Infiltration und eine lokale Antitumoraktivität (75, 318). Die Reaktion des Tumors, ob partielle oder komplette Regression, korreliert direkt mit dem *staging* (85). Die daraus resultierende signifikant längere Überlebenszeit (75, 85) wird auch mit vermehrt im Blut zirkulierenden zytotoxischen T-Lymphozyten und der Ausbildung einer systemischen Immunität in Verbindung gebracht (75). Ähnliche Beobachtungen werden in einer Studie mit der Kombination von Staphylokokken Enterotoxin A (SEA) und caIL-2 bei unterschiedlichen caninen Tumoren gemacht (318).

Bianco *et al.* arbeiten auch mit dem Modell des spontanen caninen Melanoms, verfolgen aber einen anderen gentherapeutischen Ansatz. Nach intratumoraler Applikation des *fas-ligand*-Gens kommt es zu einer Überexpression von *fas-ligand*, was durch die Bindung an *fas* von *fas*-positiven (fas+) Melanomen Apoptose auslöst (15).

Chauvet *et al.*`s erfolgreicher adenoviraler Gentransfer des Reportergens β-Galactosidase in ein spontanes canines Meningiom nach intraarterieller Injektion (44), sowie die Behandlung vertebraler Fibrosarkome beim Hund durch autologe Tumorvaccinen (45), dienen als Vorstufen zu gentherapeutischen Strategien bei spontanen caninen Gehirntumoren, wie sie im Veterinary Medical Teaching Hospital der University of California in Davis durchgeführt werden sollen: Sowohl Suizidgentherapie als auch Zytokin-Gentherapie mit kationischen DNA-Lipid-Komplexen, welche murines Endostatin-Gen in einem DNA-Plasmid enthalten um die Tumor-Angiogenese zu stören (178).

Quintin-Colonna *et al.* verwenden eine Strategie, bei der genetisch modifizierte histoinkompatible Zellen hohe Konzentrationen an huIL-2 produzieren und so eine potente, gegen den Tumor gerichtete zytotoxische Immunantwort auslösen. Zwei natürlich auftretende Tumoren dienen ihnen hierbei als präklinische Modelle: Das maligne Melanom des Hundes und das im Gegensatz dazu nur selten metastasierende Fibrosarkom der Katze. Nach Tumoroperation und lokaler Bestrahlung erhalten die Tiere wiederholte peritumorale Injektionen der huIL-2 sezernierenden xenogenen

Verozellen. Die behandelten Tiere zeigen eine niedrigere Rezidivrate und haben eine längere Überlebenszeit im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die nur mit Operation und Bestrahlung behandelt sind (253).

Auch Jourdier *et al.* verwenden als Referenztherapie zur Behandlung des felinen Fibrosarkoms chirurgische Tumorexstirpation kombiniert mit lokaler Bestrahlung durch Iridiumnadeln. In den Therapiegruppen erhalten die Katzen zusätzlich postoperativ sieben Injektionen mit feIL-2-Gen-tragenden Kanariepocken-, oder huIL-2-Gen tragenden Vacciniaviren subkutan ins Tumorbett. Während die Kontrollgruppe (18 Tiere) nach zwölf Monaten eine Rezidivrate von 61 % aufweist, liegt diese bei den beiden Therapiegruppen (jeweils 18 Tiere) nur bei 28 % (feIL-2) bzw. 39 % (huIL-2). Bezüglich der Überlebenszeit der Katzen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (157).

Das injektionsassoziierte Fibrosarkom der Katze bekommt nicht nur Aufmerksamkeit vom ätiopathogenetischen Standpunkt aus (siehe Kap. II 1), sondern auch von der therapeutischen Forschung (325).

Mir *et al.* planen eine lokale Injektion von IL-2 sezernierenden Zellen in das, nach einer Elektrochemotherapie mit Bleomycin entstehende peritumorale Ödem, um eine systemische Immunantwort gegen das Fibrosarkom zu erhalten (216) (siehe auch Kap. II 1).

Durch die intratumorale Injektion von rekombinantem Adenoviren, welche das Gen für das Fusionsprotein GAL-TEK (β-Galaktosidase und HSV-tk) enthalten, ist es möglich Markierung und therapeutische Funktion zu kombinieren: Man kann Tumorzellen die β-Galaktosidase-Aktivität zeigen in einer histochemischen Färbung identifizieren und mit RT-PCR nachweisen. Durch die HSV-tk induzierte Aktivierung der *prodrug* Ganciclovir wird dann der Tumorzelltod induziert (199).

Andere Erkrankungen der Katze, bei welchen gentherapeutische Strategien erprobt werden, sind der feline Hyperthyreoidismus und die Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz. Blackwood und Argyle möchten mit Hilfe der Gentherapie zytotoxische Agenzien spezifisch zu den Schilddrüsenzellen bringen. Sie erhoffen sich so, eine Alternative zu traditionellen Behandlungsmethoden beim Hyperthyreoidismus der Katze zu erhalten. Durch die Verbindung des *Prodrug-Activation-Systems* E. coli NTR/CB1954 (Bioaktivierung der *prodrug* CB1954 durch E. coli Nitroreductase NTR) mit dem zellspezifischen felinen Thyreoglobulin-Promotor verfolgt diese Arbeitsgruppe die Methode des *transcriptional targeting* (16, 17).

Katzen, die an einer, mit Anämie assoziierten, chronischen Niereninsuffizienz leiden sind bereits erfolgreich mit humanem Erythropoetin behandelt worden, wobei die Antwort auf das Medikament, vermutlich aufgrund der Entwicklung von Antikörpern gegen das humane Protein, mit der Zeit verschwindet. Mit der Verwendung eines rekombinanten, das feline Erythropoetin-Gen tragenden, AAV-Vektors wird das Problem der ungewollten Immunantwort gegen das humane Protein umgangen. Intramuskulär an gesunde SPF-Katzen verabreicht, reagieren diese mit einem dosisabhängigen Hämatokritanstieg über sieben Wochen. Da in dieser Studie ein unregulierbarer Promotor eine Anpassung der Genexpression (und folglich auch des Hämatokrits) nach Verabreichung des Vektors nicht erlaubt, wird der Hämatokrit über die Dosierung des rekombinanten Virus kontrolliert (13).
Die Applikation eines anderen hämatopoetischen Zytokin-Gens, caGM-CSF, mittels adenoviralem Gentransfer direkt ins Knochenmark von Hunden resultiert in einer lokalen myeloiden Expansion, sowie einer signifikanten peripheren Neutrophilie, welche über drei Wochen andauert (96).

Bei Kachexie und Anämie im Endstadium von Tumorerkrankungen kann eine anabole Behandlung zur Verbesserung der Lebensqualität und zur Verlängerung der Lebenszeit führen. Draghia-Akli *et al.* erreichen bei kachektischen, caninen Tumorpatienten mittels intramuskulärer Injektion eines das Wachstumshormon-Releasinghormon (GHRH)-exprimierenden Plamids eine erhöhte Serumkonzentration des *insulin-like growth-factors I*. Daraus folgt sowohl eine Normalisierung des roten Blutbilds, als auch eine signifikante Erhöhung der zirkulierenden Lymphozyten. Das Gewicht der Hunde bleibt während der gesamten Studiendauer konstant im Gegensatz zu den Kontrolltieren, welche im Mittel 1,5 % ihres Anfangsgewichtes verlieren (76).

Die für eine somatische Gentherapie in Frage kommenden Krankheiten haben unterschiedliche Ursachen, weshalb auch die Gründe und Strategien für die Behandlung variieren (49). Bei entzündlichen Erkrankungen, konzentriert sich die Forschung derzeit auf Zytokin-Interaktionen und im Speziellen auf die Pathogenese von chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie z. B. Arthritis (7, 49, 101, 102). Sowohl bei rheumatoider Arthritis als auch bei traumatischer und Osteoarthritis dient das Pferd als Modelltier (101). Adenoviraler Gentransfer des equinen IL-1 Rezeptor-Agonisten resultiert in einer Verbesserung der klinischen Parameter. Neben einer Verbesserung der Lahmheit können auch positive Effekte auf die Histologie der Synovialmembran und

des Gelenkknorpels, im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Behandlung, festgestellt werden (101, 102). Die Implantation von genetisch modifi-zierten Chondrozyten, welche *bone-morphogenic-protein 7* überexprimieren, fördert die Heilung von Knorpeldefekten durch hyalinartiges Reparaturgewebe im Femoropatellargelenk von Pferden (141).

Auch kardiovaskuläre Erkrankungen und Infektionen, z. B. durch das feline Immundefizienz-Virus FIV (HIV-Forschung), sind als potentielle Einsatzgebiete für die Tiermedizin in den Blickpunkt der Gentherapie-Forschung gerückt (7, 49).

2.2 Nonviraler Gentransfer mit Kollagenschwamm

Kollagen als Biomaterial fand und findet in der Medizin in verschiedenen Bereichen Anwendung: Als resorbierbarer Catgutfaden in der Chirurgie, als Schwamm im Bereich der Wundabdeckung oder Blutstillung (als Hämostyptikum), als lokales Arzneimittelreservoir für Antibiotika oder Wachstumsfaktoren, um einen längeren Wirkspiegel vor Ort zu erreichen, etc. Dabei werden unterschiedliche Applikationsarten des Kollagens gewählt: Gele, Folien, Schwämme, Mikropartikel oder auch Pulver.
Kollagen stellt aufgrund seiner exzellenten Biokompatibilität ein ideales Trägermaterial für Arzneimittel, Genvektoren oder Zellen dar. Es weist nur eine sehr geringe Toxizität auf und löst kaum immunogene Reaktionen aus. Weiterer Vorteil neben der guten Verträglichkeit ist die Resorbierbarkeit des Biopolymers im Körper. Die Verwendung von Kollagenschwämmen als Wundauflage fördert durch seine Eigenschaften die Wundheilung. Nach Absorption, auch großer Volumina von Gewebsflüssigkeit, erhält der Schwamm das feuchte Mikroklima der Wunde und ermöglicht so eine optimale Mikrozirkulation. Durch die Adhärenz ans Wundbett schützt er vor mechanischen Einflüssen oder auch bakteriellen Sekundärinfektionen. Die wichtigste Eigenschaft scheint jedoch, auch im Hinblick auf den Gentransfer, das Erhalten der Zellmobilität zu sein. Den Wachstums- und Entzündungszellen ist es möglich das poröse Gerüst des Kollagenschwammes zu penetrieren, was die Formation eines hochvaskularisierten Granulationsgewebes ermöglicht und die Epithelneubildung fördert (100).

Neben der Bestückung des Kollagenschwamms mit Wachstumsfaktoren (z. B. BMP-2) oder auch Antibiotika zur Implantation ins Wundbett, ist auch die Beladung mit Genvektoren zum gentherapeutischen Einsatz möglich (24, 100, 108). Das lokale

Gentransfersystem der GAM (*gene activated matrix*) hat zwei Bestandteile: Die Plasmid-DNA und die Trägermatrix, den Kollagenschwamm (24). Ein natürliches, biokompatibles Polymer, wie Kollagen, kann die Plasmid-DNA langsam und protrahiert freisetzen und so lokal eine optimal hohe Wirkstoffkonzentration mit lang anhaltendem Wirkspiegel vor Ort durch einen *controlled release* erreichen, ohne systemische Nebenwirkungen hervorzurufen (24, 241, 278).
Bei Versuchen mit plasmidbeladenen Kollagenschwämmen kann *in vitro* gezeigt werden, dass in den Schwamm einwandernde Zellen die Genvektoren auffinden und dort lokal transfiziert werden. Nach subkutaner Implantation der mit reportergentragenden Plasmiden beladenen Kollagenschwämme in Ratten und Mäuse kann kein signifikanter Gentransfer nachgewiesen werden (287). Die Effizienz des Gentransfers ist von biologischen und physikalischen Faktoren abhängig. So führt eine hohe mitotische Aktivität der Wundheilungszellen zu einem schnelleren Verlust des Plasmids, d. h. das Plasmid wird im Verlauf der Zellteilung nur an jeweils eine Zelle weitergegeben und nicht repliziert (24). Kommt es zum Kontakt der Plasmide mit Blut werden diese abgebaut und inaktiviert (24). Diese Limitation des Gentransfers führt zum Einsatz synthetischer Vektoren auf den Kollagenschwämmen. Molekulare Konjugate aus Plasmid-DNA und kationischen Polymeren erhöhen sowohl die Plasmidstabilität als auch die Gentransfereffizienz (24). Mit nackter Plasmid-DNA beladene Schwämme zeigen in der Zellkultur nur eine siebentägige Genexpression, wobei eine initial hohe Freisetzung von etwa 77 % in den ersten drei Tagen stattfindet (283). Im Gegensatz dazu erreichen mit pDNA-Polyethylenimin-Komplexen beladene Schwämme eine 45 Tage andauernde, mit pDNA-PEI-Hüllpolymer-Komplexen beladene Schwämme sogar eine 56 Tage messbare Genexpression. Dies liegt an der Immobilisierung der pDNA über einen längeren Zeitraum, wodurch sie auch länger freigesetzt werden kann um Zellen zu transfizieren. Dabei wird stets eine transiente Transfektion der Zellen beobachtet (278).

Nach subkutaner Schwammimplantation in Ratten kann bei mit pDNA-PEI-Hüllpolymer-Komplexen beladenen Schwämmen die höchste Reportergenexpression über mindestens sieben Tage nachgewiesen werden. pDNA-PEI-Komplex beladene Schwämme erreichen eine Expression über drei Tage, welche jedoch nicht immer reproduzierbar ist (278, 283). Ratten mit den implantierten Schwämmen zeigen in dieser Biokompatibilitätsstudie zu keiner Zeit ein gestörtes Allgemeinbefinden, noch verlieren sie Gewicht oder zeigen auffälliges Verhalten. Es können keine äußerlichen Anzeichen von Wundheilungsstörungen oder Entzündungen beobachtet werden, auch wandert der

Schwamm nicht, sondern befindet sich auch nach 14 Tagen noch am Implantationsort. In Blut oder Organproben kann keine Genexpression nachgewiesen werden (283). Histologisch kann in den ersten drei Tagen eine hochgradige marginale Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Schwamm beobachtet werden. Das gesamte Implantat ist von einem Fibrinnetz und einer großen Ansammlung Exsudat umgeben. Am siebten Tag befindet sich der Neutrophilensaum dichter am Implantat und in der Schwammmitte werden vermehrt neutrophile Granulozyten nachgewiesen. Die Schwammfasern sind von Detritus und Exsudat auseinandergedrängt. Die in den Kollagenschwamm einwandernden Zellen nehmen die pDNA auf und exprimieren das Gen. Nach 14 Tagen ist sowohl die fortschreitende Schwammauflösung mit einer Ausreifung des Granulationsgewebes und Zunahme der Fasern als auch die Vaskularisierung deutlich sichtbar (278, 283). Die Schwämme sind einem kontinuierlichen Abbauprozess unterworfen bis der gesamte Schwamm schließlich mit neugebildetem Bindegewebe durchsetzt ist (287).

Das zur Komplexbildung mit der negativ-geladenen pDNA verwendete organische, kationische Makromolekül Polyethylenimin (PEI) wirkt als "Protonen-Schwamm". Die schützende Wirkung des Polymers wird nach der Aufnahme des Komplexes in die Zielzelle wirksam und beruht wahrscheinlich auf der Pufferkapazität in Endosomen, wodurch der Abbau der pDNA durch Nukleasen verhindert wird. Durch weitere Absorption von Protonen kommt es in den Lysosomen zur osmotischen Schwellung mit Ruptur, was einen *Escape*-Mechanismus für das tranfizierende Agens darstellt (26, 98).

Die Hüllpolymere, protektive Copolymere (PROCOPs), bestehen aus Polyethylenglykol (PEG) und umschließen die positiv geladenen pDNA-PEI-Komplexe mittels elektrostatischer Interaktionen (92). Durch stabilisierende und opsonisierungsinhibierende Eigenschaften schützen sie die Polyplexe gegen Blutkomponenten und Bestandteile der extrazellulären Matrix (271, 278): Sowohl Komplementaktivierung als auch die Interaktion mit Serumproteinen ist im Gegensatz zu ungeschützten pDNA-PEI-Komplexen reduziert (271).

Durch das Auftragen der pDNA-PEI-Hüllpolymer-Komplexe auf den Kollagenschwamm und die nachfolgende spezielle Behandlung wird die pDNA auf der dreidimensionalen Matrix fixiert.

Die poröse Struktur des Kollagenschwammes stellt ein durchlässiges Trägersystem dar, welches eine kontinuierliche Freisetzung garantiert und als Gerüst für die Infiltration von Zellen und nachfolgend auch Gefäßen dient.
So entstehen zwei Mechanismen des Gentransfers:

1. Die Genvektoren werden vom Retardsystem freigesetzt und transfizieren das umliegende Gewebe, so auch z. B. nach der Operation im Körper der Katze verbliebene Fibrosarkomzellen.
2. Das Biomaterial selbst dient als Gerüst für die einsprossenden Zellen, welche im Inneren des Systems Genvektoren vorfinden und aufnehmen können (278). Einmal transfiziert agieren die Zellen in der Matrix als Bioreaktoren, welche das rekombinante Protein sezernieren (24).

3 Tumorimmunologie und Antitumorimmunität

3.1 Tumorimmunologie

Bei der Bekämpfung von Tumorzellen spielt die humorale Abwehr, also B-Lymphozyten und die von ihnen gebildeten Immunglobuline, eine untergeordnete Rolle (85) und soll deshalb an dieser Stelle nicht genauer beschrieben werden.

Im Unterschied zu normalen Zellen ist bei Tumorzellen die Kontrolle des Zellwachstums durch Mutationen verloren gegangen. Grundsätzlich können maligne Zellen, obwohl sie weniger immunogen als andere Pathogene sind eine Immunantwort auslösen (1, 21). Warum das Immunsystem die Entstehung von Tumoren in manchen Fällen verhindern kann und warum es in anderen Fällen zu einem Tumorwachstum kommt ist noch nicht vollständig geklärt. Die *immunosurveillance-theory* beschreibt die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem. So kann es zu einer Elimination der malignen Zellen durch das Immunsystem kommen oder zu einem Gleichgewicht (*equilibrum*) zwischen Tumorzellen und Immunsystem, d. h. die malignen Zellen sind zwar vorhanden, vermehren sich jedoch nicht. Im Zustand des *tumour-escape* kommt es zum Wachstum eines Tumors (21, 317) (siehe Kap. II 3.2).

Im Zustand der Elimination reagieren Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) des angeborenen Immunsystems zunächst auf so genannte *danger signals*, welche entstehen, wenn der wachsende Tumor aufgrund der Zelltransformation oder auch der Veränderung des umgebenden Gewebes auffällig wird. Normalerweise induzieren diese Signale eine lokale Entzündung sowie die Aktivierung von Effektorzellen mit Antitumor-Aktivität (21). NK-Zellen können abnormale Zellen erkennen und direkt abtöten, wobei ihre Zytotoxizität auf einer Erkennung der Zielzelle durch verschiedene Rezeptoren beruht. So führt z. B. eine fehlende MHC I-Expression zur Abtötung der Zelle durch NK-Zellen (317).
Viele Tumoren unterscheiden sich von normalen Zellen durch eine abnormale Proteinexpression (317). Tumorantigene, die sich auf der Tumorzelloberfläche befinden, werden von T-Lymphozyten jedoch nur registriert und als "fremd" erkannt, wenn sie im antigenbindenden Teil eines *major-histocompatibility-complex* (MHC) gebunden sind (85). Abhängig davon, ob es sich um MHC Klasse I (MHC I) oder MHC Klasse II (MHC II)

Moleküle handelt, werden unterschiedliche Wege der Antigenerkennung mittels verschiedener T-Zellen beschritten, die jedoch eng durch Mediatoren verknüpft sind (1, 260).

MHC I-Moleküle werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. So tragen fast alle Zellen, einschließlich der meisten Tumorzellen, MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche (85). MHC II-Moleküle sind hauptsächlich auf aktivierten Antigenpräsentierenden Zellen (APC) vorhanden: B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (1, 260). Die meisten anderen Zelltypen, inklusive Tumoren, exprimieren nur wenige oder keine MHC II-Moleküle (1).

Mit MHC I im Komplex auf der Tumorzelloberfläche präsentierte Peptide werden von $CD8^+$-T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zelle, CTL) mittels deren T-Zellrezeptoren (TCR) spezifisch erkannt. Dies aktiviert die Zellen und sie sind dann in der Lage die Tumorzelle perforinvermittelt zu lysieren oder auch deren Apoptose zu induzieren (18, 85).

$CD4^+$-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) hingegen sind MHC II restringiert, d. h. sie erkennen nur Peptide, die ihnen im Komplex mit MHC II-Molekülen präsentiert werden. Dies geschieht hauptsächlich durch die APC, welche Proteine zugrunde gegangener oder phagozytierter Tumorzellen verarbeiten und diese in Form von Peptid-MHC II-Komplexen an der Oberfläche exprimieren (85, 260). Es ist jedoch auch möglich, dass die Tumorzellen selbst, sofern sie MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche besitzen, den T-Helfer-Zellen die Antigene präsentieren (1). Erkennt die $CD4^+$-Zelle mit ihrem TCR den gebildeten Komplex wird sie aktiviert, was erstens eine Aktivierung des immunologischen Gedächtnisses und damit eine vermehrte Bildung spezifischer $CD8^+$-T-Lymphozyten und zweitens eine Zytokinausschüttung, auch von IL-2 und IFNγ, bewirkt, welche sowohl die tumoriziden Fähigkeiten der CTLs verstärkt als auch Makrophagen und Eosinophile aktiviert (85, 247). Deren Produkte (Superoxide, radikale Sauerstoffspezies, etc.) sind zwar nicht antigenspezifisch, bleiben jedoch durch die lokale Aktivierung im Tumorbett (174, 247). Die Freisetzung von Zytokinen durch aktivierte Immunzellen stellt einen Verstärkungsmechanismus der T-Zell-Antwort dar, da die sezernierten Zytokine wiederum andere Immunzellen aktivieren oder auch direkt in die Abtötung von Tumorzellen involviert sind, wie TNFα (174).

IFNγ kann sowohl die MHC I-, als auch die MHC II-Expression auf Transkriptionsebene über zytokinaktivierte Transkriptionsfaktoren hochregulieren. Eine größere Menge an MHC-Molekülen bewirkt eine gesteigerte Antigenpräsentation, was wiederum zu einer besseren Tumorerkennung führen kann (1).

NK-Zellen lysieren die Tumorzellen ohne MHC-Restriktion (siehe oben), wobei deren Aktivität ebenfalls durch Zytokinwirkung (unter anderem durch IL-2) gesteigert wird (1, 74, 317, 313). *In vitro* kann IL-2 NK-Zellen auch zu Lymphokin-aktivierten Killer-Zellen (LAK-Zellen) aktivieren, welche eine gesteigerte Fähigkeit der Tumorzelllyse besitzen (190). Mindestens vier verschiedene Zelltypen können *in vitro* Tumorzellen abtöten: NK-Zellen, LAK-Zellen, Makrophagen und Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) (18).
Insgesamt gesehen greifen die Wege der T-Zell-Antwort ineinander und sind durch eine Vielzahl von Zytokinwechselwirkungen miteinander verknüpft (1).

3.2. Antitumorimmunität

Der Tumor besitzt die Fähigkeit sich durch verschiedene Mechanismen der Immunantwort zu entziehen, das so genannte *tumour-escape* (1, 21, 248). So geben peritumoröse Infiltrate verschiedener Immunzellen, wie man sie auch beim felinen Fibrosarkom findet (57), zwar einen histopathologischen Hinweis auf die immunogene Wirkung der Tumorzellen (21, 134, 248), eine protektive Immunantwort bildet sich jedoch nicht aus. Eine Erklärung dafür sieht Pawelec darin, dass Tumoren "*Darwinian paragons*" darstellen, welche unter Selektionsdruck dem Immunsystem immer einen Schritt voraus sind (248). So haben sich verschiedene *Escape*-Mechanismen entwickelt:

Maligne Zellen zeigen oft eine veränderte Expression von MHC I-Molekülen auf ihrer Oberfläche (21, 212, 293). Ein kompletter Verlust an MHC I-Molekülen würde zur sofortigen Lyse durch NK-Zellen führen. Dagegen verhindert eine verringerte MHC I-Expression, wie sie bei verschiedenen spontanen Tumoren festgestellt wird, eine Erkennung der Tumorantigene durch CTLs (21, 85, 212) und kann möglicherweise durch IFNγ korrigiert werden (293).

Die meisten Tumorzellen haben keine MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche, weshalb eine Aktivierung von T-Helferzellen fehlt. Folglich gehen auch keine aktivierenden Signale an $CD8^+$-Zellen, genausowenig werden Makrophagen und Eosinophile aktiviert (247). Heike *et al.* erhalten sarkomspezifische $CD4^+$ Zellen nach *in vitro* Stimulierung von peripheren Blutleukozyten durch eine autologe Tumorzelllinie, welche mit IFNγ behandelt wurde um vermehrt MHC II-Moleküle zu exprimieren (132).

Viele Tumoren wiederum präsentieren Tumorantigene auf MHC I-Molekülen und trotzdem kommt es zu keiner Erkennung durch die CTLs (323). Eine mögliche Erklärung für diesen Status der *immunological ignorance* ist das Fehlen adaequater kostimulatorischer Signale auf den Tumorzellen, wie z. B. der B7 Moleküle (21, 212). Mit B7 tranfizierte Melanomzellen können im Tierversuch eine Abstoßung des Tumors durch $CD8^+$-Zellen über die Interaktion der B7 Moleküle mit dem CD28 Molekül auf den $CD8^+$-Zellen bewirken (47, 322).

Diese *anergy*, das Nicht-Reagieren auf ein Antigen, kann auch durch die Qualität des TCR-mediierten Signals aufgrund der Antigennatur entstehen: Natürlich vorkommende Peptidsequenzen agieren z. B. als partielle Agonisten eines Melanomantigens (185, 248). Anergische T-Zellen können darüber hinaus sogar als antigenspezifische Suppressor-Zellen wirken, was ebenfalls zur Toleranz des Tumors durch das Immunsystem führen kann (42, 317).

Manche Tumoren können eine T-Zell-Zerstörung induzieren. Sie exprimieren *fas-ligand*, welcher, wenn er mit dem exprimierten *fas* (CD95) der T-Zelle interagiert, *fas-ligand*-mediierte Apoptose der T-Zelle induziert (248, 317).

Auch eine Blockade der T-Zell-Aktivierung ist beschrieben. Durch Modulation der Signaltransduktion, z. B. durch Verlust einer TCR-Untereinheit können T-Zellen nicht mehr aktiviert werden (248).

Es gibt noch weitere Möglichkeiten, wie sich Malignitäten der Immunantwort entziehen können: z. B. sezernieren manche Tumoren verschiedene immunsupressive Zytokine oder andere Faktoren, wie IL-10, TGFβ, PGE_2 oder VEGF, um eine inflammatorische Antwort zu verhindern (21, 25, 317).

4 Zytokine

Neben Zell-Zell-Interaktionen sind auch zahlreiche Mediatoren, die als Botenstoffe zwischen den Zellen agieren und unter dem Oberbegriff *biological response modifiers* zusammengefasst werden, für die komplexe Regulation der Immunantwort verantwortlich (1). Indem sie auf Zellen, von denen sie sezerniert werden (autokrin) oder auf Nachbarzellen (parakrin) wirken, sind ihre Effekte lokal. Ebenso haben sie aber auch Zugang zur allgemeinen Zirkulation, weshalb sie einen systemischen Effekt haben können (endokrin) (1, 84). Auch eine juxtakrine Wirkung, indem membrangebundene Vorläuferformen mit Rezeptoren von Nachbarzellen reagieren, ist möglich (62).
Zytokine sind also biologisch aktive Zellprodukte, welche die Kommunikation zwischen Immunzellen sichern. Sie wirken pleiotrop, das heißt auf viele unterschiedliche Zelltypen, wobei sie auf die gleiche Zielzelle oft verschiedenartige Effekte haben können. Zytokine beeinflussen sich meist gegenseitig in ihrer Wirkung, indem sich Wechselwirkungen im Sinne eines Antagonismus ausbilden; aber auch additive und synergistische Wirkungen bestehen (1).
Der Begriff "Zytokine" schließt auch die *Colony-stimulating factors* - Wachstumsfaktoren für Knochenmark-Progenitorzellen - mit ein (1).

Die ersten Zytokine, welche genauer untersucht, isoliert und als rekombinante Proteine hergestellt werden, sind die der Maus und des Menschen. Inzwischen sind auch viele Zytokine der Katze kloniert, sequenziert und teilweise auch exprimiert worden, z. B. IFNα, TNFα, IL-4, G-CSF, um nur einige wenige zu nennen (79, 263, 280, 341).

Genauer soll anschließend nur auf Interleukin 2, Interferon γ und auf GM-CSF eingegangen werden, da diese drei Zytokine in der vorliegenden Arbeit kloniert werden.

4.1 Interleukin 2 (IL-2)

In der Mitte der 70er Jahre wird Interleukin 2 (IL-2) als wichtigster Wachstumsfaktor von T-Lymphozyten als *T-cell growth-factor* (TCGF) erstmals beschrieben (109, 110, 219).

Durch eine Vielzahl biologischer Funktionen spielt IL-2 eine zentrale Rolle in der

Immunantwort, weshalb es bereits bei vielen Spezies kloniert, sequenziert und exprimiert ist:
Nach der humanen (68, 313) und murinen (103, 160, 349) Sequenz folgen die der Haustierspezies: Bovines (40, 259), ovines (32, 115, 295), caprines (GenBank: X76063) (111), porcines (116, 153), equines (73, 315, 326), canines IL-2 (78, 175) und das des Huhns (307) und der Ratte (209). Aber auch von exotischeren Spezies, wie z. B. vom Lama (242) oder der Robbe (299) liegt IL-2 inzwischen kloniert vor.

Cozzi *et al.* klonieren 1993 das feline IL-2 (GenBank: L19402) (111) und weisen auch die biologische Aktivität des rekombinanten Proteins nach (59, 60), welches allerdings gegenwärtig nicht kommerziell erhältlich ist.

4.1.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Das humane IL-2 Gen ist ein *single-copy-gene*, d. h. es liegt im haploiden Genom nur einfach vor. Es enthält vier Exons und drei Introns und zeigt keine Sequenzhomologie zu anderen Faktoren (62, 103).
Das aus einem Vorläuferprotein (154 AS) durch Abspaltung der hydrophoben sekretorischen Signalsequenz entstehende reife feline IL-2 Protein hat ein Molekulargewicht von 13,7-23 kDa, je nach Glycosylierung. Es besteht aus 134 Aminosäuren und ist als globuläres Protein gefaltet (11, 59, 113).

4.1.2 Molekularer Vergleich von IL-2 verschiedender Spezies

Die Homologien der Nukleotidsequenzen in der kodierenden Region sowie die der Proteinsequenzen sind in Tab. 14 im Kap. III B 1.1 dargestellt.

Bezüglich der Kreuzreaktivität des IL-2 verschiedener Spezies werden *in vitro* Versuche gemacht: Rekombinantes humanes IL-2 (rhuIL-2) induziert *in vitro* eine Proliferation von humanen, bovinen, porcinen, equinen, caprinen, ovinen, caninen, felinen und murinen peripheren Blutleukozyten (PBL). Das Ausmaß der Proliferation variiert allerdings unter den Spezies (51, 60, 86, 91, 97). Rekombinantes bovines IL-2 aktiviert nur spezieseigene Lymphozyten, nicht jedoch humane, murine oder porcine Zellen (51). Auch feIL-2 wirkt

nur auf feline Zellen proliferierend, nicht jedoch auf humane (60). Porcines IL-2 hat zwar einen Effekt auf murine und ovine, nicht aber auf humane Zellen, während porcine Zellen sich wiederum nicht von murinem oder ovinem IL-2 aktivieren lassen (86). Daraus folgern Lindsay *et al.*, dass die Speziesspezifität von huIL-2 unidirektional ist, d. h. humane Lymphozyten lassen sich nicht durch xenogenes IL-2 stimulieren (180). Als Grund vermuten Fenwick *et al.* Unterschiede im IL-2 Rezeptor (91). Allgemein läßt sich sagen, dass Proteine von Spezies, die auf der evolutionären Skala weiter unten stehen, keine biologische Aktivität auf Zellen von höher stehenden Spezies ausüben, bzw. Proteine von höher stehenden Spezies ihre biologische Aktivität auch auf Zellen tiefer stehender Spezies behalten (60).

4.1.3 Biologische Aktivität

IL-2 ist ein pleiotropes Lymphokin, welches unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von T-Helfer-Zellen, infolge einer Zellaktivierung durch Mitogene oder Antigene, produziert wird (11, 221). *In vitro* kann diese Stimulation von Blutzellen mit Concanavalin A (ConA) oder Phytohämagglutinin (PHA), Mitogenen aus Schwertbohne und Gartenbohne, durchgeführt werden (109, 110).
Ruhende T-Zellen produzieren kein IL-2 und sind nicht für Zytokine ansprechbar, da sie kaum IL-2 Rezeptoren exprimieren. Sie müssen zuerst stimuliert werden. Kommt es zur Aktivierung einer T-Zelle wird die Expression des IL-2 Rezeptors gesteigert (62, 113). Bindet an diese neu exprimierten Rezeptoren IL-2 iniziiert dies eine klonale T-Zellproliferation (84, 103).
Drei verschiedene Typen von IL-2 Rezeptoren sind bekannt. Sie werden unterschiedlich und unabhängig voneinander exprimiert. Der *high-affinity* IL-2 Rezeptor ist ein Membranrezeptorkomplex, der aus zwei Untereinheiten α und β als ligandbindende Domänen und einer γ-Kette als Signalkomponente besteht. Der *intermediate-affinity* IL-2 Rezeptor ist ein β-γ-Dimer, während der *low-affinity* Rezeptor aus der α-Untereinheit alleine besteht (62).

IL-2 führt neben einer Steigerung der Reaktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) (88, 319) auch zu einer Vergößerung des NK-Zell-Kompartiments (74). CTL und NK-Zellen können sowohl virusinfizierte Zellen als auch einige Tumorzellen abtöten und so eventuell ein frühes Tumorwachstum blockieren und einer Metastasierung vor-

beugen (84, 95).
IL-2 verstärkt aber nicht nur die funktionale Aktivität von NK-Zellen (74, 313), sondern ist auch essentiell für die Induktion und die Expansion von LAK-Effektorzellen (*lymphokine aktivated killer cells*), einer IL-2 aktivierten Untergruppe von NK-Zellen (64, 136, 190). Diese können NK-resistente Tumorzellen lysieren, während sie gegenüber normalen Zellen eine geringere Toxizität zeigen (95).
Katzen zeigen nach täglicher intravenöser Injektion von rhuIL-2 sowohl eine Bluteosinophilie als auch eine Hyperplasie der eosinophilen Vorläuferzellen im Knochenmark, welche allerdings nur vorübergehend ist (320). Auch bei Hunden kann nach Infusion von rhuIL-2 eine Bluteosinophilie festgestellt werden (64, 135).
Des Weiteren führt IL-2 zu einer gesteigerten antitumorösen Zytotoxizität der Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) (84).

Der für die Antitumoraktivität von IL-2 verantwortliche Hauptfaktor ist möglicherweise die induzierte Sekretion von tumoriziden Zytokinen (62, 246). IL-2 entfacht nach systemischer Administration einen komplexen "Zytokin-Sturm" (246). Unter anderem stimuliert es die Synthese von IFNγ in peripheren Leukozyten (88) und induziert die Sekretion von IL-1, GM-CSF, TNFα und TNFβ, welche wiederum Makrophagen aktivieren (62). IL-2 ist auch für die Freisetzung von löslichem *fas-ligand*, der Antitumor-Aktivität besitzt, verantwortlich (205).
Eine weitere immunmodulatorische Funktion des IL-2 ist die Förderung der B-Zell-Proliferation und damit auch der Produktion von Immunglobulinen (84). Außerdem verstärkt es die Makrophagenzytotoxizität (84, 95).
Neben der Beteiligung an der Tumorüberwachung spielt das Zytokin auch eine Rolle bei antiinflammatorischen Reaktionen und der Hämatopoese. Darüber hinaus könnte es durch die Bindung an δ-Opioidrezeptoren eine analgetische Komponente im peripheren Nervensystem besitzen (332).

Durch Forschung mit IL-2 *knock-out* Mäusen ist bekannt, dass eine fehlende IL-2 Expression eine Dysregulation des Immunsystems im Sinne einer verzögerten T-Helfer-Anwort sowie einer reduzierten NK-Zell-Aktivität bewirkt. *In vitro* zeigt sich eine reduzierte polyklonale T-Zell-Antwort (62).

4.1.4 Nebenwirkungen

Die klinische Toxizität bei Immuntherapien mit huIL-2 zeigt sich in Fieber und Schüttelfrost, Schwindel, Vomitus und Diarrhoe, Hypotension und Flüssigkeitsretention, Minderdurchblutung der Niere, myokardialen Infarkten und einer erhöhten Kapillarpermeabilität (82, 84, 114, 290). Dies entspricht zum Großteil auch den Nebenwirkungen, die bei der Anwendung anderer Zytokine beobachtet werden.
Vor allem die systemische Administration von IL-2 führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Blutgefäße, auch als *capillary leakage syndrom* bekannt (146, 290). In der Lunge kommt es in der Folge zu einem Lungenödem, welches zu respiratorischer Symptomatik und Gewichtszunahme führen kann (196, 201). Im Gehirn wird durch den Integritätsverlust des Endothels der Hirngefäße die Blut-Hirn-Schranke geschädigt. Es wird vermutet, dass diese Effekte im Gehirn den neuropsychiatrischen Nebenwirkungen, wie Desorientierung mit Depression und Somnolenz bis zum Koma, zugrunde liegen, wie sie während einer IL-2 Therapie beim Menschen beobachtet werden können. IL-2 verändert auch das elektrophysiologische Verhalten von Neuronen (62, 83).
Eine eher seltene Nebenwirkung, jedoch mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden, ist die gastrointestinale Perforation und Nekrose, welche vereinzelt bei Menschen nach IL-2 Administration in hoher Dosierung beobachtet werden kann (133, 291).
Abraham und McGrath berichten von einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp nach systemischer IL-2 (Aldesleukin) Verabreichung (2).
Toxizität nach IL-2 Verabreichung kann aber auch anderen, in der Folge freigesetzten Zytokinen, wie dem TNFα zugeschrieben werden (21).

Neben Studien am Schaf (196) werden auch Toxizitätsstudien mit IL-2 an Katzen (83, 114, 201) durchgeführt, da diese Spezies sich gut als Tiermodell für die therapeutische Toxizität von IL-2 eignen. Nach i.v.-Infusion von rhuIL-2 kommt es bei den Katzen zum *capillary leakage syndrom*, wobei IL-2 die Blut-Hirn-Schranke überwindet (83, 201). Katzen, die in einer Toxizitätsstudie zwei Injektionen mit 1,4 x 10^9 tp (total particles) Adenoviren, welche das Transgen huIL-2 tragen, im Abstand von fünf Tagen erhalten, sterben oder müssen euthanasiert werden (225).
Bei kontinuierlichen rhuIL-2-Infusionen bei Hunden können Da Pozzo *et al.* eine Gewichtszunahme verzeichnen (64). Helfand *et al.* hingegen beobachten Vomitus,

Diarrhoe sowie Lethargie (135). Wie auch bei Katzen (320) kommt es bei den Hunden nach i.v.-Infusion des rhuIL-2 zu Blutbildveränderungen, wie z. B. Eosinophilie (64, 135).

Diese nicht erwünschten Wirkungen von IL-2 nach systemischer Applikation können auf verschiedene Weise umgangen werden. So ist eine lokale Anwendung möglich: Aldesleukin ist seit 2001 in der Humanmedizin auch für die subkutane Administration zugelassen (Proleukin-S®); auch eine transkutane Applikation von IL-2 wäre möglich (144). Lokale Injektionen intra- oder peritumoral stellen sich im Mausmodell als effektiv in Bezug auf die Tumorregression heraus, wobei Jacobs *et al.* die intratumorale Injektion bevorzugen (154). Auch eine gentherapeutische Applikation des IL-2 würde zur Expression am gewünschten Ort führen. Weiterhin denkbar ist z. B. die Verwendung von Antikörpern zum *targeting* des IL-2 auf den Tumor (146).

4.1.5 Klinische Anwendung in der Humanmedizin

In klinischen Studien zeigt die Anwendung von IL-2 bisher bei der Behandlung einiger humaner Malignitäten Erfolg: Im Speziellen beim malignen Melanom und beim Nierenzellkarzinom (146). Es ist als Proleukin® und Proleukin-S® (Aldesleukin), welche in E. coli produziert werden, zur i.v. und s.c. Applikation zugelassen.
Durch seine Schlüsselaktionen in der Regulation der Immunantwort entsteht großes Interesse an der potentiellen Verwendung in der Immuntherapie und in der Tumortherapie (62, 78).

4.1.6 Einsatz in der Tiermedizin

Mit Immuntherapie versucht eine Arbeitsgruppe aus Berlin die Rezidivrate des caninen Fibrosarkoms zu senken. Nach Tumorexstirpation erfolgt mehrmals eine lokale Applikation von huIL-2 (306).

Ein möglicher therapeutischer Einsatz von IL-2 wäre bei FIV und FeLV denkbar. Diese felinen Virusinfektionen sind durch eine Dysregulation der IL-2 Produktion charakterisiert, wobei eine Inhibition der Lymphozytenproliferation mit einer supprimierten IL-2

Produktion einhergeht (319). So kann IL-2 *in vitro* die spontane Apoptose von T-Zellen aus Lymphknoten von FIV-infizierten Katzen inhibieren (33). Blakeslee *et al.* können zeigen, dass eine adoptive Immuntherapie FeLV-infizierter Katzen mit autologen Lymphknotenzellen, welche *ex vivo* expandiert und mit IL-2 aktiviert werden, den Verlauf der Infektion modulieren kann (19). Auch für die Humanmedizin sind Erkenntnisse auf diesen Gebieten interessant, da beide Erkrankungen wichtige Tiermodelle für HIV, sowie Leukämie und Lymphom darstellen (59).

Khanna *et al.* erreichen mit Inhalation von huIL-2-Liposomen in Aerosolform die Regression von Lungenmetastasen für mehr als zwölf bzw. 20 Monate bei zwei von vier Hunden mit Osteosarkom, sowie bei einem von zwei Hunden mit Lungenkarzinom eine Stabilisierung der Tumorerkrankung für mehr als acht Monate (168).

Nach mehrmaligen intra- oder peritumoralen huIL-2 Injektionen (mit 5.000, 20.000 oder 200.000 U) haben sich nach 20 Monaten 35 %, 31 % bzw. 67 % der behandelten 70 okulären Plattenepithelkarzinome bei Rindern zurückgebildet (66, 67).

4.2 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

Murines GM-CSF wird 1984 als Regulator für das Wachstum von Makrophagen und Granulozyten enthaltenden Kolonien auf Agarkulturen beschrieben und erstmals kloniert (117). Er gehört zur Familie der Kolonie-stimulierenden Faktoren, welche nach ihrer Fähigkeit, bestimmte Blutzellen in Kultur zu stimulieren, benannt sind. Drei weitere Glykoproteine können neben GM-CSF dieser Gruppe zugeordnet werden: M-CSF, G-CSF und multi-CSF, welches identisch ist mit IL-3 (62, 163).

Inzwischen ist GM-CSF bei einigen Haustierspezies kloniert: Neben felinem GM-CSF sind equines (204), porcines (152), bovines (179, 198), ovines (208, 240) und canines GM-CSF (232, 298), sowie das des Gerbils kloniert (107).

Drei verschiedene Sequenzen für felines GM-CSF sind veröffentlicht: GenBank AF053007 (1998 direkt durch Hughes und O`Reilly übermittelt), AY138140 (80) und AR241565 (US-Patent Nr. 6471957-A 119) (111). Rekombinantes feGM-CSF ist wie das

einiger anderer Spezies bereits kommerziell für den experimentellen Gebrauch erhältlich. Es entspricht in seiner Sequenz der in der GenBank unter AF053007 veröffentlichten Sequenz (111).

4.2.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Humanes GM-CSF stellt ein *single-copy-gene* von 2,5 kb dar, welches aus vier Exons und drei Introns besteht (163). Wie andere Zytokine wird auch feGM-CSF als Vorläuferprotein produziert. Nach Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz von 15-20 Aminosäuren am aminoterminalen Ende, welche das Zytokin auf seinem Weg durch endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat leitet, wird das 127 Aminosäuren lange reife Protein noch posttranslational modifiziert. Je nach Glycosylierungsgrad variiert das Molekulargewicht zwischen 15 und 20 kDa (80).

4.2.2 Molekularer Vergleich von GM-CSF verschiedender Spezies

Die Homologien der Nukleotidsequenzen sowie die der Aminosäurensequenzen von GM-CSF sind in Tab. 16 in Kap. III B 1.2 aufgeführt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen felinen GM-CSF Sequenzen werden ebenfalls später - auch in Verbindung mit der in dieser Arbeit klonierten Sequenz - aufgezeigt und diskutiert. (siehe Tab. 15 Kap. III B 1.2 und Kap. IV 6.2)

Trotz großer Sequenzhomologien und einiger konservierter Strukturen vermuten Metcalf *et al.* eine speziesspezifische Wirkung von GM-CSF (214). Arai *et al.* erreichen bei Verabreichung von rhuGM-CSF an FIV-infizierte und SPF-Katzen nur einen sehr moderaten Effekt auf die zirkulierenden Leukozyten verglichen mit dem beim Menschen, was sie vermuten lässt , dass die Kreuzreaktion mit anderen Spezies gering ist (4). Darüber hinaus zeigt rhuGM-CSF keine biologische Aktivität auf murinen und ovinen Zellen (106, 208, 309). Auch der Effekt von rhuGM-CSF auf feline Knochenmark-Progenitorzellen ist *in vitro* limitiert (80). Gegensätzlicherweise stimuliert rhuGM-CSF jedoch die canine Hämatopoese *in vivo* (289) und entwickelt biologische Aktivität auf bovinen Zellen, wohingegen rboGM-CSF keinen Einfluß auf murine oder humane Knochenmarkszellen zeigt (179). Aufgrund eines weiteren ähnlichen Versuchs

mit rboGM-CSF folgern Maliszewski *et al.*, dass die Speziesspezifität von GM-CSF sich entweder auf Ebene der Rezeptorbindung oder auf Signaltransduktionslevel manifestiert (198).

4.2.3 Biologische Aktivität

Das Protein GM-CSF wird vor allem von T- und B-Lymphozyten und Makrophagen, nach deren Aktivierung durch Antigene oder Mitogene sezerniert, aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen, als Antwort auf Zytokine oder inflammatorische Stimuli (62).
Das monomere Protein kann unter anderem als Komplex mit Heparansulfatproteoglycanen auf der extrazellulären Matrix von Zellen als biologisch inaktive Form gespeichert und bei Bedarf freigesetzt werden. Es kann aber auch als integrales Membranprotein exprimiert werden. Sowohl die membrangebundene als auch die matrixassoziierte Form kann mit Rezeptoren von nahe liegenden Zellen interagieren, was wiederum Zell-Zell-Kontakte etabliert und eine biologische Aktivität auch im juxtakrinen Sinn bewirkt (62).

GM-CSF Rezeptoren sind in großer Zahl (100-1.000/Zelle) auf der Zelloberfläche von myeloiden Zellen zu finden, aber auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z. B. Endothelzellen. Lymphoide und erythroide Zellen scheinen keine Rezeptoren zu exprimieren. Bei rezeptorpositiven Zelllinien nimmt die Zahl der Rezeptoren mit steigendem Reifungsgrad der Zellen ab (62). Der Rezeptor besteht aus den zwei Untereinheiten α und β und besitzt nur in dieser Kombination hohe Affinität zu GM-CSF (202).

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor reguliert nicht nur die Proliferation und Differenzierung der myeloiden Knochenmark-Progenitorzellen, sondern stimuliert auch die reifen Granulozyten und Makrophagen im Sinne einer Abwehrsteigerung. Durch vermehrte Chemotaxis kommen die Zellen schneller an den Ort des Geschehens. Eine verstärkte mikrobizide Aktivität durch gesteigerte Phagozytose sowie die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten erhöhen die Zytotoxizität der Zellen (62, 189).
Zusammen mit Erythropoetin bewirkt GM-CSF auch die Proliferation von erythroiden

und megakaryozytischen Progenitorzellen (62, 213).
Die Antigenpräsentation von Makrophagen wird verstärkt durch eine vermehrte Expression von MHC II-Molekülen und kostimulatorischen Faktoren (z. B. B7), was für die Interaktion mit T-Zellen absolut notwendig ist (94). Eine Stimulierung zusätzlicher Zytokinfreisetzung, wie die des TNFα, potenziert die funktionale Kapazität der APCs (218). Langerhans`sche Zellen (LC) in der Haut, welche als immunologisch unreife lymphoide Dendritische Zellen (DC) angesehen werden können, werden durch GM-CSF und TNFα umgewandelt in hochpotente immunstimulierende DC, welche eine zentrale Rolle bei der primären Immunantwort spielen und neoplastische Zellen als fremd erkennen können (30, 39, 62).
Da GM-CSF hauptsächlich von Zellen produziert wird, die sich am Ort von Enzündungsreakionen finden, wird vermutet, dass es auch ein wichtiger inflammatorischer Mediator ist (62).

Insgesamt gesehen interagiert GM-CSF - wie andere Wachstumsfaktoren auch - mit anderen Zytokinen und wirkt in einem komplexen Netzwerk zellulärer und humoraler Mechanismen der Immunabwehr (308).
Die antitumorösen Effekte von GM-CSF beruhen vor allem auf der gesteigerten Zytotoxizität der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und der verstärkten Immunogenität der Tumorzellen durch verbesserte Antigenpräsentation (94).

4.2.4 Nebenwirkungen

Adverse Effekte beim Einsatz von GM-CSF sind dosisabhängig. Bei angepasster Dosis werden beim Menschen nur milde bis moderate Nebenwirkungen beobachtet. Diese *flu-like symptoms* äußern sich in Fieber, Myalgien, Osteoneuralgien, Ekzemen, Müdigkeit, Vomitus und Diarrhoe. Auch Reaktionen an der Injektionsstelle werden beobachtet (30, 308). Bei Überdosierung kann es zur *first-dose reaction* kommen, einem Syndrom aus Hypoxie und Hypotension; aber auch Thrombosen und Perikarditiden werden beobachtet (308). Viele Nebenwirkungen werden jedoch nicht durch GM-CSF verursacht, sondern durch die GM-CSF induzierte Sekretion anderer Zytokine, wie TNFα (62).
Bei Katzen die mit rhuGM-CSF behandelt werden treten vor allem Irritationen an der Injektionsstelle und Fieber auf (4). Bei der Behandlung von Rindern mit subkutanen

Injektionen wird ebenfalls Fieber beobachtet (142). Nach s.c. Injektion von caGM-CSF kann bei Hunden eine gesteigerte Zirkulation von Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten beobachtet werden, sowie eine dosisabhängige Thrombozytopenie, welche aus einer gesteigerten Zerstörung der Thrombozyten resultiert, aber nach Absetzen der Behandlung wieder verschwindet (232, 233).

4.2.5 Klinische Anwendung in der Humanmedizin

Wachstumsstimulierende Zytokine wie GM-CSF werden in der Humanmedizin unter anderem zur Wiederherstellung der Granulozytopoese nach Chemotherapie, Radiotherapie oder Knochenmarkstransplantation benutzt, aber auch bei HIV-Infektionen und in der Onkologie (8). Weiterhin wird GM-CSF bereits in der Humanmedizin als Vaccineadjuvans getestet um die humorale und zelluläre Immunantwort auf Impfungen zu verstärken (302).
Rekombinantes huGM-CSF ist bereits kommerziell unter den Generica Sargramostim, Molgramostim und Regramostim erhältlich. Die Produktion erfolgt in unterschiedlichen Expressionssystemen: Hefen, Bakterien oder Säugerzellen (8).

4.2.6 Einsatz in der Tiermedizin

In der Tiermedizin spielt der Einsatz von GM-CSF eine untergeordnete Rolle, wäre aber theoretisch denkbar. So wäre ein Einsatz bei FIV-Infektionen der Katze möglich um der bei erkrankten Katzen auftretenden Neutropenie entgegenzuwirken (4). Auch die therapeutische Applikation zur Verringerung der hämatologischen Toxizität von Chemotherapien sowie die Verwendung als Vaccineadjuvans wäre möglich (232). Canines GM-CSF wird auch in Versuchen zur Wiederherstellung der Hämatopoese nach hoher Strahlenbelastung eingesetzt (233). Rekombinantes boGM-CSF könnte bei akuter klinischer Mastitis einen präventiven oder auch therapeutischen Effekt erzielen, indem es neutrophilen Granulozyten eine stärkere bakterizide Wirkung verleiht (142). Bei neonatalen Kälbern könnte es präventiv gegen Jungtiererkrankungen eingesetzt werden, indem es die Zahl der zirkulierenden Granulozyten erhöht (198).

4.3 Interferon γ (IFNγ)

Bei Interferonen handelt es sich um pleiotrope Glycoproteine, deren vielschichtige Aktivitäten sich im Zytokin-Netzwerk mit der Wirkung anderer Zytokine überschneiden. Interferone beeinflussen den Metabolismus, das Wachstum und die Differenzierung vieler Zellen auf unterschiedliche Weise (62).
Sie werden unterteilt in Typ I- und Typ II-Interferone. Zu den hauptsächlich antiviral wirkenden Typ I-Interferonen zählen IFNα, IFNβ, IFNδ, IFNω und IFNτ. Einige dieser Interferone sind bei der Katze bereits kloniert und auf biologische Aktivität getestet (341). Rekombinantes feIFNω ist als Virbagen Omega® (Laboratoire Virbac, Carros Cedex, Frankreich) oder Intercat® (Toray Industries, Tokyo, Japan) zum klinischen Einsatz bei Hund und Katze in verschiedenen Ländern, unter anderm in Deutschland, zugelassen. Auf die Typ I-Interferone soll jedoch an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.
Interferon γ, das einzige Typ II-Interferon, wird erstmals 1965 beschrieben (334) und nach seiner Hauptaktivität zunächst als Immun-Interferon benannt (62).

Inzwischen ist das Interferon γ vieler Haustierspezies kloniert, unter anderem ovines (207, 254, 352), caprines (14), bovines (41, 228), equines (61, 123, 305), cervines (301), porcines (71), canines (69, 354), sowie das des Huhns (70, 346), der Ente (148) und des Truthahns (183). Aber auch von anderen Tierarten, wie dem Lama (242), dem Dachs (63), dem Elch (311) und dem Delphin (150), sowie von verschiedenen Versuchstieren (120, 314) liegen IFNγ-Sequenzen vor.

Zwei Arbeitsgruppen klonieren 1995 felines Interferon γ mit identischer Sequenz (GenBank D30619 und X86972) (5, 111, 279), welches auch bereits als rekombinantes Protein für den experimentellen Gebrauch verfügbar ist (256).

4.3.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Sowohl humanes als auch murines IFNγ werden von nur einem Gen kodiert (*single copy gene*), welches etwa 4 kb umfasst. Es besteht aus 4 Exons und 3 Introns (118, 119, 120). Wie die aktive Form des humanen IFNγ ist auch das feline Protein ein Homodimer, das aus zwei ineinander verdrehten, gegenläufig orientierten Untereinheiten, welche nicht-

kovalent verbunden sind, besteht. Die monomere Form ist nicht biologisch aktiv (62). Jede Untereinheit wird aus dem 543 bp großen Stück cDNA als Precursor-Protein mit 167 Aminosäuren synthetisiert, einschließlich einer sekretorischen Signalsequenz von 23 Aminosäuren, welche jedoch für eine Expression in Bakterien nicht notwendig ist. Das aus 145 Aminosäuren bestehende reife Protein hat ein Molekulargewicht von 17 kDa (279) bzw. 19,6 kDA (5), wobei diese Abweichung auf dem unterschiedlichen Glycosylierungsgrad beruht. Es besitzt zwei Cysteinreste, welche jedoch nicht in eine Disulfidbrückenbildung involviert sind, und drei potentielle Glykosylierungsstellen (5). Rekombinantes Protein aus E. coli ist nicht glycosyliert, zeigt aber trotzdem biologische Aktivität (6).

4.3.2 Molekularer Vergleich von IFNγ verschiedender Spezies

Wie alle Interferone ist auch IFNγ ein multifunktionales Protein und in seiner Bioaktivität trotz relativ hoher Sequenzhomologie (50-90 %), wahrscheinlich aufgrund stärkerer Unterschiede im Aufbau, strikt speziesspezifisch (119, 276). Dies wird durch caIFNγ bestätigt, welches trotz der phylogenetischen Verwandtschaft keine antivirale Aktivität auf Katzenzellen hat (279). Aufgrund von ELISA-Untersuchungen hat man Hinweise auf familienspezifische Kreuzreaktionen (270): So reagiert IFNγ von Büffel, Rind, Schaf und Ziege mit den entsprechenden Antikörpern kreuz, wohingegen das von Hirsch und Schwein keine Kreuzreaktion zeigt (301). Auch IFNγ des Hundes, der Katze und des Dachses zeigen mit entsprechendem Antikörper eine Kreuzreaktion (63). In Tab. 17 in Kap. III B 1.3 sind die Homologien des IFNγ unterschiedlicher Spezies auf Nukleotid- und Aminosäurelevel dargestellt.

4.3.3 Biologische Aktivität

IFNγ wird vor allem von zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und $CD4^+$-Zellen sezerniert, welche durch Antigene oder Mitogene aktiviert sind. Auch eine Sekretion durch B-Zellen findet statt. IFNγ spielt eine zentrale Rolle in der Immunmodulation, wobei die überwiegende Zielzellpopulation Makrophagen sind. Bei diesen bewirkt IFNγ durch die Hochregulierung der Expression von MHC-Molekülen eine Steigerung der Antigenpräsentation (89, 249).

IFNγ bindet an hochaffine Rezeptoren, welche aus zwei Ketten bestehen. Die eine Kette ist für die Bindung des Liganden, die andere für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich. Die Rezeptoren befinden sich auf allen Zellen, außer auf reifen Erythrozyten. Nach Bildung eines IFNγ-Rezeptor-Komplexes auf der Zelloberfläche wird dieser schnell durch Endozytose internalisiert und so die Signaltransduktion eingeleitet (200).
Die Synthese von IFNγ wird durch verschiedene physiologische und pathologische Auslöser, wie z. B. Nukleinsäuren oder bakterielle Lipopolysaccharide, induziert. Sie kann, abhängig von der Stärke des Stimulus, lokalisiert oder auch systemisch sein. Als Hauptzytokin der Typ 1-Lymphozytenantwort (TH1) wird die Produktion von IFNγ unter anderem durch IL-2, ebenfalls ein TH1-Zytokin, induziert (88, 91), während die Synthese z. B. durch Cyclosporin A oder Dexamethason gehemmt wird (62).

Young und Hardy betrachten IFNγ als eines der Zytokine, welches mehr als alle anderen Einfluss und Auswirkungen auf das Immunsystem hat (350). Es wirkt gegen intrazelluläre Pathogene, d. h. antiviral (unabhängig vom Virus) (236, 294), antiparasitär (gegen Protozoen, wie z. B. Neospora caninum) (236) und auch antibakteriell (249). Grund dafür ist vor allem die verstärkte Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche durch MHC-Antigen-Komlexe sowie die Aktivierung von NK-Zellen.
Des Weiteren wirkt es sowohl auf normale als auch maligne Zellen antiproliferativ. Zellen der Typ 2-Lymphozytenantwort (TH2) werden in ihrem Wachstum gehemmt, genauso wie die TH2-Zytokinproduktion (z. B. IL-10) inhibiert wird und so eine Umsteuerung von der humoralen zur zellulären Immunantwort gegeben ist (89). Dies wird zusätzlich unterstützt durch die Förderung der TH1 Zell-Expansion und -Differenzierung. Der antiproliferative Effekt auf Tumorzellen beruht auf der einen Seite auf einer direkten Einwirkung auf maligne Zellen, auf der anderen Seite wird durch Stimulation der Abwehrzellen der Tumor indirekt bekämpft (12). IFNγ bewirkt auf verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* eine Hochregulierung von MHC I- und MHC II-Molekülen (9, 336, 345). Canine Tumorzellen zeigen nach Stimulation mit caIFNγ eine erhöhte Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen, wodurch sich die Präsentation tumor-assoziierter Antigene (TAA) verstärkt. Dies führt zu einer besseren Antigenerkennung und folglich nach Einwanderung der Entzündungszellen ins Tumorgebiet zur zellvermittelten Lyse der Tumorzellen durch $CD8^+$-Zellen, welche ebenfalls durch IFNγ aktiviert werden und eine verlängerte Lebensdauer aufweisen (336). Okano *et al.* zeigen für caIFNγ ebenfalls eine, die MHC II-Expression steigernde

Wirkung, sowie anti-proliferative Aktivität auf Tumorzellen (243).
Insgesamt werden Moleküle, die der Antigenpräsentation dienen verstärkt ausgeprägt, unter anderem der Fc-Rezeptor sowie der IL-2 Rezeptor auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten (62).
IFNγ ist auch verantwortlich für die Aktivierung von Makrophagen (62, 317). Durch die verstärkte Infiltration der Tumorumgebung mit Makrophagen, auf welchen ebenfalls vermehrt MHC-Moleküle exprimiert werden, verstärkt sich erneut die bessere Erkennung der Tumorzellen (99, 188). *Knock-out* Mäuse, denen das IFNγ-Gen fehlt haben unter anderem eine verminderte Expression von MHC II-Molekülen auf Makrophagen (159).
Eine weitere Möglichkeit über welche IFNγ tumorizid wirken könnte wird derzeit diskutiert. IFNγ könnte über TRAIL-Modulierung (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) Apoptose bei verschiedenen Zell- und Tumorzelltypen mediieren (174, 273, 312).
IFNγ induziert die Produktion bestimmter Zytokine, vor allem die Sekretion von TNFα und die Transkription der Gene G-CSF und M-CSF in Monozyten und Makrophagen.
Es wirkt außerdem synergistisch mit IL-2. Die Kombination der beiden TH1-Zytokine gibt unter anderem auch aktivierten B-Zellen Signale zur Differenzierung, was einem anti-apoptotischen Effekt entspricht, und potenziert damit die Sekretion von Immunglobulinen (62).

4.3.4 Nebenwirkungen

Nebenwirkungen einer Interferontherapie sind meist gering und äußern sich in grippeähnlichen Symptomen, ähnlich den Nebenwirkungen anderer Zytokine. Bei Langzeittherapien zeigen sich Appetitlosigkeit sowie Leuko- und Thrombozytopenien. Mit Absetzen der Therapie verschwinden diese Erscheinungen jedoch wieder (22).
Beim Einsatz von boIFNγ werden Fieber und eine milde hämatologische Depression beobachtet (229). Ob IFNγ einen teratogenen Effekt hat ist bisher nicht genau geklärt. Da es aber bei trächtigen Mäusen im Tierversuch zu Aborten und Missbildungen kommt (22), wird die Gentherapie mit IFNγ nicht bei trächtigen Katzen angewandt, weshalb Trächtigkeit ein Ausschlusskriterium der Gentherapiestudien an der Medizinischen Kleintierklinik ist (165, 338).

4.3.5 Klinische Anwendung in der Humanmedizin

In der Humanmedizin gibt es bereits mehrere Interferon-Präparate, die als Medikament zugelassen sind: Neben verschiedenen α- und β- Interferonen ist auch ein huIFNγ auf dem Markt: Actimmune®, welches vor allem bei der chronisch-granulomatösen Erkrankung und der malignen Osteopetrose eingesetzt wird (151).

4.3.6 Einsatz in der Tiermedizin

In der Tiermedizin ist der Einsatz von IFNγ noch rein experimentell oder auf klinische Studien beschränkt. Wie bereits schon erwähnt, ist jedoch ein Typ I-Interferon, ein rekombinantes IFNω felinen Ursprungs (Virbagen omega®, Intercat®) erhältlich, welches bei der Parvovirose des Hundes (215) und unterschiedlichen viralen Erkrankungen der Katze eingesetzt wird: FIV, FeLV, FIP, Stomatitis-Gingivitis-Komplex, Katzenschnupfen, etc. (131).
Die immunmodulatorische Rolle von IFNγ könnte bei FIV, FeLV und FIP vielleicht ebenso eine Rolle spielen (279). Bezüglich der Verwendung als Vaccineadjuvans bei der Katze wird intensiv geforscht (282), was im Hinblick auf das Fibrosarkomrisiko nach Tollwut-Impfung sehr interessant ist.
Toray Industries (Tokyo, Japan) führen erste klinische Studien mit rekombinantem caIFNγ durch. Es soll bei der atopischen Dermatitis des Hundes eingesetzt werden (321).
Die antivirale Wirkung von IFNγ wird bei der unterstützenden Behandlung von Infektionskrankheiten mit unterschiedlichem Erfolg ausgenutzt: Bei Atemwegserkrankungen durch Herpesviren sowohl beim Rind (281) als auch beim Pferd (281, 342) und anderen viralen Erkrankungen der Haussäugetiere, wie der Marek`schen Krankheit beim Haushuhn (281). Eine weitere Einsatzmöglichkeit beim Huhn ist ebenfalls die Verwendung als Vaccineadjuvans. Als Wachstumsförderer könnte es eventuell eine Alternative zum Antibiotikum darstellen (191, 346).
Eine erfolgreiche antiparasitäre Wirkung erhofft man sich bei der Leishmaniose des Hundes (281) oder auch bei Erkrankungen der kleinen Wiederkäuer mit Toxoplasma gondii und Neospora caninum, bei denen IFNγ zumindest *in vitro* eine Vermehrung dieser Aborterreger verhindert (352).
Ein Einsatz bei Schafen zur Unterstützung von Impfprogrammen bei

Clostridienerkrankungen ist ebenfalls geplant (281). An der Universität Utrecht findet derzeit eine Studie über den Einsatz von caIFNγ als Vaccineadjuvans bei der Impfung gegen Leishmanien bei Hunden statt (274).
Ein Test auf boIFNγ im Blut von Rindern gibt derzeit als ergänzender Test Auskunft über eine Erkrankung an Tuberkulose oder auch subklinischer Paratuberkulose (31, 158). Es könnte die Entwicklung eines auf dem Nachweis von ovIFNγ basierenden Tests für ovine Paratuberkulose (Johne`s disease) folgen (352).
Enzootische bovine Leukose ist ein weiteres Einsatzgebiet des boIFNγ, da es die Synzytialbildung des bovinen Leukämievirus *in vitro* inhibiert (294) und auch *in vivo* erfolgversprechende Effekte zeigt (229).

Generell ist zu sagen, dass trotz teilweise vielversprechender Ergebnisse der klinische Einsatz von Zytokinen noch vieler Studien - sowohl *in vitro* als auch *in vivo* - mit genauerer Klärung der Wirkungen bedarf, welche sich vielleicht auch bei den einzelnen Tierarten unterscheiden.

5 Immuntherapie von Tumoren unter besonderer Berücksichtigung der Gentherapie mit den Zytokinen IL-2, GM-CSF und IFNγ

Die Tumor-Gentherapie basiert auf dem Einbringen eines therapeutischen Gens in eine Zielzellpopulation, welche entweder die Tumorzellen selbst oder spezifische Effektorzellen des Immunsystems sind (328).
Die verschiedenen Möglichkeiten der Tumorbekämpfung (siehe auch Kap. II 2.2) lassen sich in zwei Kategorien aufteilen: Ziel der Behandlung ist entweder die genetische Korrektur der abnormalen Tumorzellen oder ihre Zerstörung. Die Abtötung der Tumorzellen wiederum kann sowohl durch das Immunsystem als auch durch einen direkten toxischen Effekt erfolgen (328). Auch eine Steigerung der Resistenz gesunder Zellen gegen zytotoxische Agentien ist möglich. Eine intensivere und längere Chemotherapie könnte so durchgeführt werden (18).
Eine korrektive Gentherapie ist aufgrund der multifaktoriellen Natur von Tumoren und der Tatsache, dass selbst bei einem einzelnen mutierten Onkogen das therapeutische Gen in jede einzelne Tumorzelle verbracht werden müsste, fast unmöglich (328).

Da eine adäquate Antitumorantwort des Immunsystems oft aus verschiedenen Gründen nicht gegeben ist (siehe Kap. II 3), ist es das Ziel der Immuntherapie die vorhandene, aber ineffektive, Antitumorantwort zu verstärken und neue Effektorzellen zu rekrutieren (85, 323). Die Immuntherapie von Tumorerkrankungen beinhaltet sowohl die Modifikation von immunologischen Effektorzellen, so dass diese den Tumor besser erkennen oder andere und effektivere Zytokine exprimieren, als auch eine Alteration der Tumorzellen selbst zur Steigerung der Immunogenität (18). Verschiedene Strategien der Immuntherapie werden dabei angewandt: Bei der Tumorvaccine werden Tumorzellen *ex vivo* mit Zytokin-Genen, Antigenen oder allogenen MHC-Molekülen genetisch modifiziert um dann nach Bestrahlung wieder reinjiziert zu werden. Ziel ist dabei die Immunogenität der Tumorzellen zu verstärken (85, 174, 177, 323).
Andere Möglichkeiten sind die Immunisierung gegen spezifische klonierte tumorassoziierte Antigene (TAA) (323, 328) sowie die Reinfusion von *ex vivo* mit *biological response modifiers* modifizierten und expandierten Effektorzellen, z. B. tumorinfiltrierenden Lymphozyten (269) oder dendritischen Zellen (323), welche die Präsentation der TAA optimieren (260). Autologe Tumorzellvaccinen haben den

Nachteil, dass für jeden Patienten eine Tumorzelllinie *in vitro* etabliert werden muss (85). Antigenspezifische Immunisierung benötigt die Identifikation eines spezifischen Tumorantigens.

Direkte *in vivo* Transfektion der Tumorzellen ist eine alternative Strategie (75, 323). Hierbei werden sowohl Bestandteile von Mikroorganismen als auch Zytokin-Gene benutzt (75, 174) (siehe auch Kap. II 2.1). Die gegen Tumoren gerichtete zytotoxische Funktion von Makrophagen z. B. benötigt entweder eine Stimulation mit Bakterienwandprodukten, Lipopolysacchariden oder Muramyldipeptiden, oder mit Zytokinen, wie IFNγ oder GM-CSF (174).

Die Zytokin-Gentherapie ist eine Methode die Antitumorantwort zu verstärken, indem man die genetische Information für Zytokine direkt in normale Zellen und/oder Tumorzellen einbringt (145). Ein Vorteil gegenüber der konventionellen Immuntherapie mit rekombinanten Zytokinen ist die Fähigkeit der lokalen Produktion von immunstimulatorischen Proteinen, wodurch die Immunantwort auf das Tumorgewebe gerichtet wird. Zur gleichen Zeit wird eine systemische Toxizität vermieden (85, 95). Bei Mäusen kann gezeigt werden, dass von transfizierten Tumorzellen exprimiertes GM-CSF eine effektivere Antitumor-Antwort gegen murine Melanom- und Mastozytomzellen hervorruft als exogenes, in die unmittelbare Tumorumgebung verabreichtes rekombinantes GM-CSF (297). Die Zytokin-cDNA wird direkt an die Stelle des Tumors gebracht, entweder durch intratumorale Injektion (85) oder auch z. B. durch Einlegen eines plasmidbeladenen Kollagenschwamms ins Tumorbett (siehe auch Kap. II 2.2).

Ziel einer lokalen Immuntherapie ist es Immunzellen an den Ort des Geschehens, zum Tumor, zu locken. Darüber hinaus müssen diese Zellen die Tumorantigene erkennen, in einen aktivierten Status übergehen und letztendlich die Tumorzellen abtöten. Ein weiteres Ziel der lokalen Immuntherapie, welches jedoch nicht immer erreicht wird, ist die Verankerung der Antitumorantwort im immunologischen Gedächtnis. Diese langanhaltende Immunität ist sowohl gegen Rezidive als auch gegen Metastasen gerichtet (85).

Viele verschiedene Zytokine werden bisher mit mehr oder weniger großem Erfolg genutzt um eine lokale Immunantwort zu provozieren. Häufig wird dabei allerdings beobachtet, dass das gleiche Zytokin auf unterschiedliche Tumorzellen variierende oder

gegensätzliche Effekte zeigt. So ist die Vaccinierung mit IL-2-, IFNγ- und GM-CSF-produzierenden Tumorzellen bei einigen Tumoren effektiv, während diese Kombination bei anderen Tumormodellen weniger erfolgreich ist. Eine universelle Strategie der immuntherapeutischen Tumorbekämpfung scheint schwierig, da die Antitumor-Effekte von Zytokinen und die beteiligten zellulären Mechanismen von vielen Variablen abhängig sind, wie des z. B. des Tumortyps oder auch der Immunitätslage des Patienten (20).

Die Kombination von Zytokinen hat sich als sinnvoll erwiesen, da additive und synergistische Effekte ausgenutzt werden können.
GM-CSF wirkt als *chemoattractant* und lockt T-Zellen, tumorinfiltrierende Makrophagen und andere APCs an (85, 174, 245) und aktiviert diese (18).
Bei einer Kombination der beiden TH1 Zytokine IL-2 und IFNγ induziert IL-2 eine Proliferation und Differenzierung der immunkompetenten Effektorzellen, während das IFNγ auf den Tumorzellen eine vermehrte Expression von MHC-Molekülen und damit eine Steigerung der Antigenpräsentation bewirkt (104, 353). Auch stimulieren beide Zytokine das Wachstum von NK-Zellen, wobei sich durch IFNγ auch noch deren Aktivität steigen lässt (317).
Während also die T-Zellen aufgrund der MHC I-TAA-Komplex-Erkennung die Tumorzellen direkt erkennen und abtöten, erfolgt eine T-Zell-Aktivierung auch auf dem zweiten Weg über die Präsentation der TAA über MHC II-Rezeptoren der APCs: Diese nehmen Antigene der sterbenden Tumorzellen auf und präsentieren sie im Sinne eines *cross primings* den T-Helfer-Zellen des Immunsystems (85, 260).
Bei der Kombination von GM-CSF mit IL-2 zeigen sich ebenfalls synergistische Effekte. Beide sind effektiv bei der Reduktion des primären Tumorwachstums und schaffen eine protektive Immunität gegen Metastasen in einigen Tumormodellen (28). Die APCs scheinen nach Aufnahme der Antigene unter anderem in die Milz zu wandern und dort antigenspezifische T-Zellen zu stimulieren (245), was zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt (56, 323).
Sowohl Immuntherapiestudien mit rekombinanten Proteinen als auch Gentherapiestudien verwenden Zytokin-Kombinationen, wie IL-2, GM-CSF und IFNγ (197, 285), IL-2 in Kombination mit GM-CSF (28, 56, 155, 333) oder IFNγ (337, 338).

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zielsetzung

Zytokine stellen wichtige Faktoren des Immunsystems in der Antitumorantwort dar. An der Medizinischen Kleintierklinik (LMU München) wurden bereits mehrere klinische Studien zur Zytokin-Gentherapie als adjuvanter Therapie beim Fibrosarkom der Katze durchgeführt. Nach viralem Gentransfer und Verwendung von humanen Zytokin-Genen wird nun ein nonviraler Gentransfer mit felinen Zytokin-Genen durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die drei felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ aus felinen peripheren mononukleären Zellen zu gewinnen, mittels PCR zu amplifizieren und in einen Expressionsvektor zu klonieren. Ein weiterer Teil der Arbeit bestand darin eine Zelllinie mit diesen Plasmiden zu transfizieren um die biologische Aktivität der exprimierten Proteine zu testen; feIL-2 und feGM-CSF mit einem Proliferationstest, feIFNγ mittels Durchflusszytometrie.
Bei positiven Ergebnissen der Assays sollten diese Plasmide als pDNA-Polyethylenimin-Komplexe, von einem Polyethylenglycol-Hüllpolymer umschlossen, auf einen Kollagenschwamm aufgebracht werden.
Dieser beschichtete Kollagenschwamm wird anschließend in klinischen Studien an der Medizinischen Kleintierklinik (LMU München) eingesetzt (165).

A MATERIAL UND METHODEN

Materialiennachweis

Zelllinien

COS-7: Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen
Institutszellbank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, München; Prof. Gänsbacher

CTLL-2: murine zytotoxische T-Zelllinie, IL-2 abhängig aus C57B1/6 stammend (109)
Fa. ATCC, Manassas, USA

Feline Fibrosarkomzellen: Primäre Fibrosarkomzellkultur
Institutszellbank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, München; Dr. Brill

TF-1: humane erythroleukämische Zelllinie; GM-CSF abhängig
Fa. ATCC, Manassas, USA

Plasmide

p55pCMV_ivs_luc+	Fa. BayerCorp., Emery Ville, USA
p55pCMV_ivs: Leerplasmid	Fa. BayerCorp., Emery Ville, USA
pUC19: Standardklonierungsvektor mit Ampicillinresistenz	Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, München; E. Hammerschmid
pBayMCS: p55pCMV_ivs mit multiple cloning site	Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung; München; E. Hammerschmid

Bakterien

E. coli Stamm DH 10 B	Fa. Invitrogen, La Jolla, USA

Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Klonierungsprimer siehe Tab. 2 in Kap. III A 1.2.1

Sequenzierprimer siehe Tab. 1

Primer	Nukleotidsequenz	annealing Temperatur
Ol-428 (BayproofF)	5`-TTTGCCTTTCTCTCCACAGGTG-3`	60,3 °C
Ol-429 (BayproofG)	5`-TCTTATCATGTCTGCTCGAAGCG-3`	60,6 °C

Tab. 1: Sequenzierprimer
Bayproof ist die Bezeichnung der Primer, F bezeichnet den *forward*-Primer. Die Kennzeichnung G verweist auf die 3`-5`-Leserichtung des Primers (*reverse*-Primer). Ol- kennzeichnet die Primer als Oligonukleotide, die Nummern sind fortlaufend und dienen der genauen Identifikation der Primer.

Enzyme und Reaktionskits

AccI mit Puffer	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DraII mit Puffer	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FseI mit Puffer 4 und BSA	Fa. New England Biolabs, Frankfurt
HindIII mit Puffer	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NspI mit Puffer	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase mit 5 x Ligase Puffer	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PFU turbo DNA-Polymerase	Fa. Stratagene, Heidelberg

M-MLV RT(H-) Moloney Mäuse Leukämie Virus mit Punktmutation der RNase H- (200 units/µl) mit M-MLV RT 5 x Reaction Buffer und Poly(dT)-Primer	Fa. Promega, Mannheim
MasterAmp™ PCR Optimization Kit	Fa. Epicentre Technologies, Cambride, UK
Micro FastTrack™ 2.0 Kit	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System	Fa. Promega, Mannheim
Qiagen Plasmid Maxi Kit (100)	Fa. Qiagen, Hilden
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Antikörper

anti-feMHC class I monoklonaler Antikörper W6/32	GSF, Müchen; Prof. Schändel
anti-feMHC class II monoklonaler Antikörper Klon 42.3	Fa. Serotec, Oxford, UK
IgG1 Isotypkontrolle	Fa. BD, Pharmingen
IgG2a Isotypkontrolle	Fa. BD, Pharmingen
rabbit anti mouse FITC	Fa. DAKO Diagnostica, Hamburg
rabbit immunglobulin fraction, negativ control	Fa. DAKO Diagnostica, Hamburg

Rekombinante Proteine

rekombinantes humanes IL-2	Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
rekombinantes humanes GM-CSF	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes felines GM-CSF	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes felines IFNγ	Fa. R&D Systems, Wiesbaden

Zellkulturmedien

Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM): 3,7 g/l $NaHCO_3$, 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine	Fa. Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Fa. Biochrom, Berlin
Foetales Kälberserum (FCS): Sera Plus	Fa. Biotech GmbH, Aidenbach
Humanes Serumalbumin (HSA)	Fa. Biochrom, Berlin
Phosphate buffered saline (PBS)-Dulbecco (1x)	Fa. Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA Solution: 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS	Fa. Biochrom, Berlin
Glutamin: 200 mM Glutaminlösung	Fa. Biochrom, Berlin
Hepes-Puffer	Fa. Invitrogen, La Jolla, USA

RPMI Komplettmedium 1:
RPMI 1640 + 2 % FCS + 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin = Kulturmedium für Lymphozyten mit 2 % FCS (59)

RPMI Komplettmedium 2:
RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM Glutamin + 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin = Kulturmedium für COS-7 und CTLL-2 Zellen

RPMI Komplettmedium 3:
RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM Glutamin + 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin + 2 ng/ml rhuGM-CSF = Kulturmedium für TF-1 Zellen (80)

DMEM Komplettmedium 1:
DMEM + 10 % FCS + 2 mM Glutamin + 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin = Kulturmedium für COS-7 Zellen

DMEM Komplettmedium 2:
DMEM + 10 % FCS + 2 mM Glutamin + 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin = Kulturmedium für feline Fibrosarkomzellen

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Concanavalin A (ConA) (2 µg/µl)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Fa. Promega, Mannheim
Biocoll: Ficoll Separating Solution (1,077 g/ml)	Fa. Biochrom, Berlin
dNTP-Mix (10 mM)	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Mix	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10 x PCR-Puffer und Mg^{2+}-Lösung (25 mM)	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypanblau (0,5 %)	Fa. Biochrom, Berlin
Ethidiumbromid (10 µg/ml)	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
1 kb DNA *ladder* (1 µg/µl)	Fa. New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Ampicillin (40 g/l)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Fa. Biochrom KG, Berlin
peqGold Universal Agarose	Fa. Peq Lab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glycerin	Fa. Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
EDTA	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaN_3	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Metafectene	Fa. Biontex, München
Polykation Polyethylenimin (PEI) mit 25 kD Molekulargewicht	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen

6 x Bromphenolblaupuffer (Ladepuffer):
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
30 % (v/v) Glycerin
in Aqua bidest.

TE-Puffer:
10 mM Tris
1 mM EDTA pH 8

TBE-Puffer:
21,6 g Tris
11,0 g Borsäure
8 ml 0,5 M EDTA pH 8
ad 2 l Aqua bidest.

TAE-Puffer:
4,84 g Tris
1,1 ml 100 %ige Essigsäure
2 ml 0,5 M EDTA pH 8
ad 1 l Aqua bidest.

LB-Medium (Luria-Bertani Medium):
10 g Tryptone Peptone (Fa. BD DiagnosticSystems, Sparks, USA)
5 g Yeast-Extract (Fa. BD DiagnosticSystems, Sparks, USA)
10 g NaCl (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
ad 1 l Aqua bidest.
- Sterilisation bei 120 °C und 1 bar für 20 Minuten
- Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Agarplatten:
15 g Agar (Bacto™ Agar, Fa. BD DiagnosticSystems, Sparks, USA)
1 l LB-Medium
- Sterilisation bei 120 °C und 1 bar für 20 Minuten
- Zugabe von 0,1 g/ml Ampicillin G nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C
- Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4 °C.

FACS Puffer:
1 % FCS
0,02 % NaN_3
in PBS

Hüllpolymer *protective copolymer* PROCOP:
P6YE5C im eigenen Labor synthetisiert aus PEG-6000 und dem Peptid $[YE_5]_2$K-ahx-C (92)

Tachotop® Kollagenschwamm	Fa. Nycomed, München
Kalium-EDTA-beschichtete Blutröhrchen	Sarsted, Melsungen
Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg
BD Falcon™ Cell-Stainers (35 µm)	Fa. BD, Pharmingen
Cryotubes	Fa. Nalge Nunc Inc., Rochester, USA

Sämtliche sterile Labormaterialien werden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz) und Nunc (Wiesbaden-Biebrecht) bezogen. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen entsprechen analytischem Reinheitsgrad und werden von den Firmen Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Geräte

HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit	Fa. Hoefer, Amersham Pharmacia, USA
Elektrophoresekammer	Biotech, San Francisco, USA
Dunkelkammer mit UV-Leuchttisch Bio Print	Fa. Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich
FACS-Vantage	Fa. Becton-Dickinson, San Jose, USA
Varifuge 3.0R	Fa. Heraeus, Hanau
Inkubator: Forma ScientificCO_2 Water Jacketed Incubator	Fa. Thermo Life Sciences, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 135	Fa. Zeiss, Jena

(Fotodokumentation in der Zellkultur mittels Nikon Cool Pix 990 Digitalkamera, welche an das Mikroskop Axiovert 135 angeschlossen ist)

PCR-200 Peltier Thermal Cycler	Fa. MJ-Research, MA, USA
Vortexer MS 2Minishaker IKA	Fa. IKA Works, Wilmington, USA

Spektralfotometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator mit Hellma Präzipitationsküvetten	Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg
Lyophilisator Hetosicc CD4	Fa. Heto, Camberley, UK
J-21 B Centrifuge	Fa. Beckmann, Palo Alto, USA
Bakterienschüttler New Brunswick	Fa. Edinson, New Yersey, USA
Wärmeschrank	Fa. wtb Binder, Tuttlingen
Heizblock Thermomixer compact	Fa. Eppendorf, Hamburg
Microplate Scintillation & Luminiscence counter: Top Count	Fa. Canberra-Packard, Dreieich

Außerdem werden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

Computersoftware

BioCapt	Viber Lourmat, Marne La Valle, Frankreich
MacVector 5.9.2	Oxford Molecular Group, Oxford, UK
Cell Quest Version 3.1f.	Fa. Becton-Dickinson, San Jose, USA
Lasergene DNAstar	DNASTAR Inc., Madison, USA

Alle gentechnischen Arbeiten werden in einem Labor der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

1 Klonierung der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ

1.1 Gewinnung von cDNA

1.1.1 Isolierung von felinen mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Blutentnahme

Von drei klinisch gesunden Katzen aus der Chirurgischen Tierklinik (LMU München) werden insgesamt 10 ml Vollblut entnommen. Das Blut wird in 2 ml fassenden, Kalium-EDTA-beschichteten Röhrchen aufgefangen.

Dichtegradientenzentrifugation nach Ficoll

Nach Verträglichkeitsprüfung (Kreuzprobe) der drei Blutproben werden die 10 ml Katzenblut mit RPMI 1640 (ohne Zusätze) 1:1 verdünnt. 15 ml einer Ficolllösung werden in einem sterilen (DNA-, RNA-, DNase-, RNase freien) 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet ohne die beiden Phasen miteinander zu vermischen. Die Probe wird bei Raumtemperatur 30 min bei 2.000 rpm zentrifugiert.
Bei Ficoll handelt es sich um ein langkettiges Polysaccharid, welches eine Verklumpung von Erythrozyten bewirkt, die als größere Partikel schnell ausfallen und zu Boden sinken. Weiße Blutzellen und Blutplättchen bleiben hingegen auf der Schichtgrenze hängen. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation erhält man verschiedene Banden, wobei die grau-weiße Bande aus Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten (periphere mononukleäre Blutzellen, PBMC) an der Phasengrenze abpipettiert und in ein neues, steriles Zentrifugenröhrchen überführt wird.
Um die gewonnenen Zellen zu waschen wird das dreifache Volumen an PBS zugegeben und 10 min bei 1.300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das am Boden des Röhrchens entstandene Zellpellet erneut mit 20 ml PBS gewaschen und ebenfalls 10 min bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Das

nach Verwerfen des Überstands zurückbleibende Pellet wird in 2 ml RPMI Komplettmedium 1 resuspendiert.

Ermittlung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl und *viability* erfolgt mittels Trypanblaufärbung (10 µl der Zellsuspension werden mit Trypanblau 1:2 gemischt) in einer modifizierten Neubauer-zählkammer. Trypanblau wandert in tote Zellen ein und färbt interne Proteinstrukturen, so dass durch die Blaufärbung tote von lebenden Zellen differenziert werden können. Insgesamt erhält man 35 Mio. lebende Zellen, ca. 3,5 Mio. Zellen pro ml Vollblut.
Je 3 Mio. Zellen, gelöst in 3 ml RPMI Komplettmedium 1, werden in eine Kavität einer 6-Loch-Platte überführt. Die Platten werden für 21 Stunden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

1.1.2 Stimulierung von mononukleären Zellen

Nach 21 Stunden werden die Lymphozyten aus den 6-Loch-Platten in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und jede Kavität mit 1 ml RPMI Komplettmedium 1 gespült. Mit 5-6 Tropfen Trypsin werden die adhärent wachsenden Monozyten abgelöst. Insgesamt erhält man 85 ml Zellsuspension. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1.300 rpm wird der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 20 ml RPMI Komplettmedium 1 resuspendiert. Zur Stimulierung der PBMCs wird 1 µg ConA/1 ml Zellsuspension eingesetzt.

Concanavalin A (ConA) ist ein zu den Phythämagglutininen gehörendes Mitogen. Es ist ein Lektin aus der Schwertbohne (*Conavalia ensiformis*), welches an verschiedene Membranrezeptoren von Lymphozyten bindet und so zu deren Proliferation *in vitro* und zu einer vermehrten Zytokin-mRNA-Synthese führt.

Je 20 ml der Zell-Suspension werden in eine Zellkulturflasche mit 75 cm^2 Wachstumsfläche gegeben und über drei Tage bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 inkubiert.

1.1.3 mRNA Extraktion

Nach drei Tagen werden die stimulierten PBMCs für die RNA-Extraktion gewonnen. Die Zellen werden zunächst unter dem Mikroskop untersucht. Während die adhärenten Monozyten dendritsche Zellausläufer aufweisen sind die Lymphozyten von kugeliger Form. Gleichzeitig lassen sich am Boden der Zellkulturflaschen zahlreiche zusammengeschrumpfte Zellteilchen erkennen (abgestorbene Zellen).

Der Inhalt der Zellkulturflaschen wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen verbracht. Um die adhärenten Monozyten zu lösen, werden in jede Kavität 5-6 Tropfen Trypsin - gegeben und nach Ablösen die Zellkulturflaschen mit RPMI Komplettmedium 1 gespült. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt und ausgezählt (siehe Kap. III A 1.1.1): Es ergibt sich eine Menge von 36,75 Mio. lebenden Zellen. Der Ansatz wird nun bei 1.300 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 5 ml RPMI 1640 mit 5 ml FCS resuspendiert.

Von den gewonnenen Zellen werden mehrere Aliquots als Dauerkulturen eingefroren, falls eine erneute mRNA Gewinnung nötig sein sollte. Die Zellen werden in 5 ml FCS, 3 ml RPMI 1640 und 2 ml DMSO resuspendiert und in kleinen Volumina in Cryotubes in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Aus den Zellen wird mit Hilfe des Micro-FastTrack™ 2.0 Kit nach Angaben des Herstellers mRNA gewonnen: Nach Lyse der Zellen wird mit Oligo(dT)-Cellulose-Pulver der Poly(A)-Schwanz der mRNA gebunden. Eukaryotische mRNA enthält - im Gegensatz zu tRNA, rRNA und snRNA - einen Poly(A)-Schwanz am 3´-Ende und stellt etwa 5 % der gesamten RNA dar. Sie wird anschließend über mehrere Bindungsschritte gewonnen und in 10 µl Lösungspuffer resuspendiert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Photometrische Konzentrationsmessung:
Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgt in 10 µl Küvetten mit Hilfe eines Spektralfotometers. Mit Aqua bidest. wird zunächst der Leerwert eingestellt, dann wird die OD260 und das Verhältnis OD260/OD280 (*ratio*) gemessen. Die Messung der opti-

schen Dichte (OD) bei 260 nm dient der Berechnung der Konzentration, beruhend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

OD260 x Multiplikationsfaktor x Verdünnungsfaktor = Konzentration in µg/ml

Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA beträgt 50, für RNA 40 und für Einzelstrang-Oligonukleotide 30. Dies ergibt sich daraus, dass eine Lösung mit der optischen Dichte OD260 = 1 in einer Küvette mit einer Schichtdichte von 10 mm 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA oder 30 µg/ml Oligonukleotide entspricht.
Aus dem Verhältnis OD260/OD280 (*ratio*) erhält man eine Aussage über Reinheit, bzw. Proteinkontamination der Lösung. Dieses sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen (339).
Für die drei Ansätze ergeben sich Konzentrationen zwischen 18 und 22 ng/µl. Die *ratio* liegt bei etwa 1,2.

Elektrophoretische Konzentrationsschätzung
Die Konzentration geringer Mengen Nukleinsäure wird mittels Gelelektrophorese geschätzt. Das Aliquot der Probe wird zusammen mit einem Marker bekannter Konzentration (z. B. 1 kb *ladder*) aufgetragen. Durch Vergleich der Intensität der Banden unter UV-Licht mit der Bande bekannter Konzentration wird die Konzentration der Probe geschätzt. Die Intensität der Fluoreszenz der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ist proportional zu ihrer Menge.

1.1.4 Reverse Transkription

Um die mRNA in cDNA umzuschreiben wird nach dem "M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus, Point Mutant"- Protokoll nach Herstellerangaben verfahren.
Das Enzym Reverse Transkriptase stammt aus Retroviren und synthetisiert einen DNA-Strang komplementär zur mRNA-Matrize. Diese komplementäre DNA ist sozusagen ein Abdruck der mRNA, d. h. unterscheidet sich von genomischer DNA durch das Fehlen von Introns.
Zu jedem der, die mRNA enthaltenden Ansätze (8 µl) werden 0,625 µl RNasin Ribonuclease Inhibitor (entspricht ca. 25 units) gegeben um die Zerstörung durch RNAsen zu verhindern. Außerdem werden 5,375 µl Poly(dT)-Primer zugegeben und der

Ansatz 5 min bei 70 °C inkubiert. Hierbei wird die RNA denaturiert, d. h. die Sekundärstruktur, wie z. B. *loops*, zerstört. Dadurch können sich die Poly(dT)-Primer an die Poly(A)-Sequenzen der mRNA anlagern. Anschließend wird der Ansatz auf Eis gestellt und pro Ansatz 5 µl M-MLV RT 5x Reaction Buffer, 5 µl dNTPs (bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 1 µl M-MLV RT(H-) (200 units) hinzugefügt, kurz gemischt und die Ansätze 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei schreibt die RNA-abhängige DNA-Polymerase die Sequenz der mRNA unter Verwendung der dNTPs in einen Strang cDNA um.

Die entstandene cDNA wird bei -20 °C gelagert und kann nun als Matrize für die Polymerasekettenreaktion dienen um die cDNA von feIL-2, feGM-CSF und feIFNγ zu amplifizieren.

1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird 1983 von Kerry Mullis entwickelt (226). Es handelt sich um eine molekularbiologische Technik mit der spezifische DNA-Regionen selektiv amplifiziert werden können.
Grundlegend für die Durchführung einer PCR ist die Auswahl eines geeigneten Primerpaars. Primer sind synthetische Oligonukleotide, die komplementär zu den DNA-Sequenzen sein müssen, welche die gewünschte Sequenz flankieren.
Ein PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten: Durch kurzzeitige Hitzeeinwirkung (94 °C) kommt es zur Denaturierung der DNA. Die im Doppelstrang vorliegende DNA teilt sich in zwei einzelne Stränge, die dann als Matrize für die DNA-Synthese zur Verfügung stehen. Bei der folgenden niedrigeren primerspezifischen Temperatur ist eine Anlagerung der Primer möglich (*annealing*). Haben sich die Primer an die DNA-Stränge angelagert, setzt dort die DNA-Polymerase an und synthetisiert unter Verwendung der zugegebenen desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) einen neuen komplementären Einzelstrang (*elongation*). Nach diesem dritten Schritt der PCR beginnt der Zyklus von vorne. Durch erneute Denaturierung werden die Stränge wieder voneinander getrennt und stehen für einen weiteren Zyklus zur Verfügung. Die Menge an DNA steigt mit jedem Zyklus exponentiell an und erreicht mit 30-40 Zyklen ein Sättigungsplateau.

1.2.1 Primerdesign

Für jedes der etwa 500 bp großen Zytokin-Gene wird ein Primerpaar mit Hilfe der Computersoftware MacVector konstruiert und von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert (siehe Tab. 2). Als Grundlage dienen bereits veröffentlichte mRNA-Sequenzen der drei felinen Zytokine. An die ausgewählten Sequenzen der *forward*-Primer werden jeweils am 5´-Ende die Sequenz für die Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII und sechs beliebige Basen angehängt, wobei hierfür eine Sequenz aus dem Plasmid p55pCMV_ivs_luc+ verwendet wird. An den *reverse*-Primer wird ebenfalls am 5´-Ende eine Schnittstellensequenz, für FseI, sowie sechs beliebige Basen angehängt. Diese sechs beliebigen Basenpaare an jedem Ende werden bei einem späteren Restriktionsverdau mit HindIII bzw. FseI weggeschnitten.

feIL-2

Die mRNA-Sequenz von feIL-2 wird aus der GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111) über das Internet bezogen: L19402, veröffentlicht von Cozzi *et al.* (59).

feGM-CSF

Die von Hughes und O`Reilly 1998 direkt an die GenBank übermitttelte mRNA-Sequenz von feGM-CSF ist dort unter der Nummer AF053007 gespeichert (111). Anhand dieser Sequenz werden die Primer konstruiert. Da die Sequenz direkt mit dem Startcodon ATG beginnt, bei eukaryotischer mRNA jedoch nachgewiesenermaßen die Kozak-Sequenz sich günstig auf die Expressionslevel auswirkt, wird an Stelle -3 ein A vor das Startcodon gestellt: ACG (126).

feIFNγ

Die von Argyle *et al.* (5) und Schijns *et al.* (279) veröffentlichten identischen mRNA-Sequenzen von feIFNγ werden ebenfalls aus der GenBank bezogen (D30619 und X86972) (111).

Primer	Nukleotidsequenz	annealing Temperatur
f-IL-2 Ol-526	5`-*AACCCC***AAGCTT**AACCTCAACTCCTGCCACC-3`	51,2 °C
re-IL-2 Ol-527	5`-*CGAAGC***GGCCGGCC**ACTCAATTATCAAGTCAGCGTTG-3`	53,4 °C
f-GM-CSF Ol-522	5`-*AACCCC***AAGCTT**ACGATGTGGCTGCAGAACCT-3`	52 °C
re-GM-CSF Ol-523	5`-*CGAAGC***GGCCGGCC**TTACTTCTGGTCTGG***TC***CC-3`	58 °C
re-GM-CSF Ol-532	5`-*CGAAGC***GGCCGGCC**TTACTTCTGGTCTGG***CT***C-3`	54 °C
f-IFNγ Ol-524	5`-*AACCCC***AAGCTT**CCGAAACGATGAATTACACAAG-3`	51,7 °C
re-IFNγ Ol-525	5`-*CGAAGC***GGCCGGCC**AGGCAGGACAACCATTATTTC-3``	50,1 °C

Tab. 2: Primer

Die fett hervorgehobenen Buchstaben kennzeichnen die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme. Die kursiv hervorgehobenen Buchstaben zeigen die sechs beliebigen Basen, welche angehängt werden. Die fett-kursiv hervorgehobenen Basen zeigen den beschriebenen Basentausch im neuen *reverse*-Primer (Ol-532) im Vergleich zum alten (Ol-523) von GM-CSF.

f- bezeichnet den *forward*-Primer. Die Kennzeichnung re- verweist auf die 3`-5`-Leserichtung des Primers (*reverse*, bezogen auf seine Sequenz). Ol- kennzeichnet den Primer als Oligonukleotid, die Nummern sind fortlaufend und dienen der genauen Identifikation der Primer.

1.2.2 Amplifikationsreaktion

Nach Auswahl der Primer werden die Reaktionsbedingungen und Protokolle optimiert. Die Amplifikationsreaktionen werden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Als Matrize dienen je 2 µl cDNA (siehe Kap. III A 1.1.4).
Der Ansatz wird zuerst in Form eines Mastermixes in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert und anschließend die benötigte Menge in die PCR-Reaktionsgefäße, in denen die cDNA bereits vorgelegt ist, gegeben. Als Negativkontrolle dient je ein Ansatz mit Aqua bidest. statt cDNA.

feIL-2

feIL-2	Ansatz 20 µl
cDNA (1:100 mit Aqua bidest. verdünnt)	2,0 µl
10 x PCR Puffer	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Mg^{2+}-Lösung (25 mM)	1,2 µl
Ol-526 (100 µM)	0,1 µl
Ol-527 (100 µM)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Der PCR-Ansatz der Amplifikation von feIL-2, sowie das Temperaturprotokoll der PCR sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tab. 3: PCR-Ansatz feIL-2

Nach Anlagerung der spezifischen Primer (Ol-526 und Ol-527) an die cDNA wird diese durch die Taq-Polymerase unter Verwendung der dNTPs amplifiziert.
feIL-2 = felines Interleukin 2
cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTPs = desoxy-Nukleotidtriphosphate
Ol-526 = Oligonukleotid, *forward*-Primer
Ol-527 = Oligonukleotid, *reverse*-Primer
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Die Reaktion verläuft nach einem Touch-Down-Programm mit *hot start*, d. h. der Ansatz wird vor Zugabe der Polymerase für 5 min auf 94 °C erhitzt. Bei einem so genannten *touch down* wird die Annealingtemperatur graduell mit zunehmender Zyklenzahl erniedrigt, um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen.

Tab. 4: PCR-Temperaturprotokoll feIL-2 und feIFNγ

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Hot Start	94 °C	1 min
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	58 °C	40 sec
	-0,5/Zyklus	
Synthese	72 °C	1 min
Anzahl der Zyklen: 29		
Denaturierung	93 °C	30 sec
Annealing	43 °C	30 sec
Synthese	72 °C	1 min
Anzahl der Zyklen: 14		
Finale Extension	72 °C	7 min
Kühlung	4 °C	

feGM-CSF

Der PCR-Ansatz und das Temperaturprotokoll der Amplifikationsreaktion von feGM-CSF sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Tab. 5: PCR-Ansatz feGM-CSF

feGM-CSF	Ansatz 20 µl
cDNA (1:100 mit Aqua bidest. verdünnt)	2,0 µl
PCR-Mix (Fermentas)	15,2 µl
Ol-522 (100 µM)	0,1 µl
Ol-532 (100 µM)	0,1 µl
PFU turbo DNA-Polymerase	0,4 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Nach Anlagerung der spezifischen Primer (Ol-522 und Ol-532) an die cDNA wird diese durch die DNA-Polymerase unter Verwendung der dNTPs amplifiziert.
feGM-CSF = feliner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTPs = desoxy-Nukleotidtriphosphate
Ol-522 = Oligonukleotid, *forward*-Primer
Ol-532 = Oligonukleotid, *reverse*-Primer
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Die PCR wird mit *hot start* durchgeführt.

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	52 °C	1 min
Synthese	72 °C	1 min
Anzahl der Zyklen: 32		
Finale Extension	72 °C	7 min
Kühlung	4 °C	

Tab. 6: PCR-Temperaturprotokoll feGM-CSF

feIFNγ

Der PCR-Ansatz von feIFNγ ist in Tab. 7 dargestellt. Das Temperaturprotokoll entspricht dem der PCR von feIL-2 (siehe Tab. 4).

feIFNγ	Ansatz 20 µl
cDNA (unverdünnt)	0,2 µl
Lösung B des MasterAmp PCR Optimization Kit	10,0 µl
Ol-524 (100 µM)	0,1 µl
Ol-525 (100 µM)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Tab. 7: PCR-Ansatz feIFNγ

Nach Anlagerung der spezifischen Primer (Ol-524 und Ol-525) an die cDNA wird diese durch die Taq-Polymerase unter Verwendung der dNTPs amplifiziert.
feIFNγ= felines Interferon γ
cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTPs = desoxy-Nukleotidtriphosphate
Ol-524 = Oligonukleotid, *forward*-Primer
Ol-525 = Oligonukleotid, *reverse*-Primer
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Die Reaktion verläuft ebenfalls nach dem Touch-Down-Programm, wobei allerdings auf einen *hot start* verzichtet wird.

5 µl jedes PCR-Ansatzes werden nach der Reaktion auf 1 % TBE-Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen, bei 90 V im elektrischen Feld getrennt und nach einer Stunde unter UV-Licht analysiert und dokumentiert (siehe Kap. III A 1.3). Zur groben Schätzung der DNA-Konzentration kann die erhaltene Bande mit der Intensität der Banden eines aufgetragenen DNA-Standards verglichen werden (siehe Kap. III A 1.1.3).

1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der analytischen Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe im elektrischen Feld. Bei Anlegen einer konstanten Gleichstromspannung kommt es zur Wanderung elektrisch geladener Teilchen, so auch von DNA.

Die Agarose wird in der vorliegenden Arbeit je nach Größe der erwarteten Banden in Konzentrationen von 0,7 bis 1,5 % in TBE-Laufpuffer verwendet. Nach Abwiegen der Agarose wird diese unter Erwärmung in der Mikrowelle im Laufpuffer aufgelöst, auf ca. 60 °C abgekühlt, mit 2,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) versetzt und in eine Gelträger-Form gegossen, die zur Ausformung von Geltaschen mit einem Plastikkamm versehen wird. Nach Erkalten und Festwerden des Gels wird der Plastikkamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer verbracht. Die Proben werden mit 1/6 Volumen Bromphenolblaupuffer (Ladepuffer) versetzt und auf das Gel aufgebracht. Dieser Puffer erleichtert durch das enthaltene Glycerin sowohl das Einpipettieren der Proben in die Geltaschen, er lässt auch durch seine zweifarbige Lauffront erkennen, wie weit die Proben gelaufen sind. Zusätzlich wird ein Längenstandard (1 kb DNA *ladder*) aufgetragen, welcher der zu erwartenden Größe der Proben-DNA entspricht und der Fragmentgrößenbestimmung dient.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt durch eine konstante Spannung von 60 bis 90 Volt zwischen 45 und 90 min. Hierbei wandern kleine, negativ geladene Fragmente schneller in Richtung Anode als größere, negativ geladene.

Durch Anregung des interkalierenden Ethidiumbromids fluoreszieren die DNA-Banden bei UV-Bestrahlung. Das Gel wird in einer Dunkelkammer mit UV-Leuchttisch fotografisch dokumentiert und anschließend mit der Software Bio-Capt ausgewertet.

1.3.1 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Als Lösungspuffer für die Agarose und als Laufpuffer für die Elektrophorese wird TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Fragmente werden anhand des Längenstandards identifiziert und das gewünschte Fragment zügig unter Sichtkontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

1.3.2 DNA-Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe Kap. III A 1.3.1) wird das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol" nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und anschließend durch Spektralphotometrie (siehe Kap. III A 1.1.3) quantifiziert.

1.4 Klonierung der PCR Produkte in den Expressionsvektor

1.4.1 Plasmid

Bei Plasmiden handelt es sich um ringförmige extrachromosomale DNA-Moleküle, welche sich autonom vermehren, d. h. die Replikation in E. coli ist unabhängig von der des bakteriellen Chromosoms. Dafür notwendig ist ein Replikationsstart (*origin of replication*, ori). Neben diesem enthält das Plasmid weitere wichtige Sequenzen: Der Selektionsmarker, hier das Gen für die Ampicillinresistenz, erlaubt Bakterien, die dieses Plasmid tragen, in ampicillinhaltiger Nährlösung zu wachsen. Bakterien, die kein Plasmid enthalten sterben in Anwesenheit von Ampicillin. Ein Promotor aus dem Genom des humanen Cytomegalievirus (hCMV) ist ein starker primärer Promotor und sorgt für eine maximale Transkription in jedem Gewebe. Er dient als Erkennungs- und Bindungsregion für die RNA-Polymerase. Die folgende *intervening sequence* (ivs) zwischen Promotor und Luciferase verstärkt die Effizienz des RNA-*processing*. Dieses Intron wird nach der Transkription effizient herausgeschnitten. Das Polyadenylierungssignal SV 40 poly A des Simian Virus dirigiert das *processing* des 3`-Endes des Proteins.
Durch Aufschneiden oder Entfernung eines Teilstücks des Plasmids (in diesem Fall das Reportergen Luciferase) kann fremde DNA bis zu einer bestimmten Größe eingesetzt

werden. Das Gen muß ein ATG Startcodon sowie ein Stopcodon enthalten.
In dieser Arbeit sollen jeweils die cDNA-Sequenzen von feIL-2, feIFNγ und feGM-CSF in den Expressionsvektor p55pCMV_ivc_luc+ kloniert werden.

p55pCMV_ivs_luc+ (siehe Abb. 2) ist ein *high copy plasmid*. Die Kopienzahl, d. h. die Zahl an Plasmiden, die sich normalerweise in einer Bakterienzelle befindet, liegt bei etwa 50, was die Klonierung begünstigt.

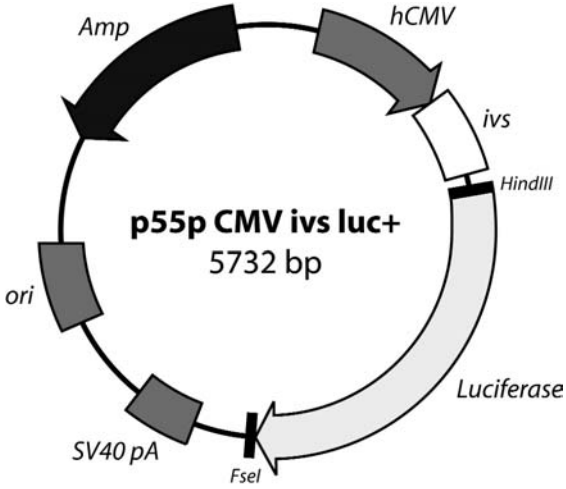


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Plasmids p55pCMV_ivs_luc+
Amp = Ampicillin-Resistenz, Antibiotikaresistenzgen
ori = *origin of replication* (Bakterieller Replikationsstart)
hCMV = Promotor (humanes Cytomegalievirus)
ivs = *intervening sequence*, synthetisches Intron, welches die Stabilität der mRNA erhöht
Luciferase = Reportergen
SV40 pA = Polyadenylierungssignal (Simian Virus 40 poly A)
5732 bp = Größe des Plamids in Basenpaaren
HindIII, FseI = Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme
(nur ein Auszug der Schnittstellen des Plamids ist dargestellt)

1.4.2 Restriktionsverdau des Plasmids

Um die gewünschte Zytokin-cDNA ins Plasmid integrieren zu können, muss zuerst die Sequenz für Luciferase aus dem Plasmid ausgeschnitten werden. Dies geschieht durch sequenzspezifische Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen: HindIII und FseI. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 Nukleotiden und spalten Phosphodiesterbrücken in DNA-Molekülen. Im Gegensatz zu Enzymen, die den DNA-Doppelstrang gerade abschneiden (*blunt end*), schneiden HindIII und FseI den Doppelstrang versetzt, so dass kurze Einzelstrang-Schwänze mit spezifischer Sequenz entstehen, so genannte *sticky ends*.
Beide Enzyme schneiden im Plamid nur die Luciferase heraus. Es tauchen weder im Plasmid noch in den Sequenzen von feIL-2, feIFNγ und feGM-CSF weitere Schnittstellen dieser Enzyme auf.

Abb. 3: Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Hind III (a) und FseI (b)
Die angegebenen Sequenzen entsprechen der des Stranges in 5`-3`-Richtung. Wie bei fast allen Erkennungssequenzen handelt es sich auch bei diesen um Palindrome.

Die Enzyme werden mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern und Zusätzen bei der angegebenen Temperatur verwendet. Zur Spaltung von 1 µg DNA werden bei einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C 2-3 units Enzym benötigt. HindIII schneidet am 5`- und FseI am 3`-Ende der Luciferase. Die Erkennungssequenzen dieser Enzyme sind auch an die jeweiligen Primer der Zytokin-Gene angehängt worden (siehe Kap. III A 1.2.1), so dass nach einem Restriktionsverdau der PCR-Produkte, genauso wie beim Plasmid, *sticky ends* vorliegen, was einen gerichteten Einbau der PCR-Produkte bei der Ligation mit dem Plasmid ermöglicht.

Der Restriktionsverdau mit Hind III und FseI wird in einem Ansatz durchgeführt, wobei der für das Enzym FseI empfohlene 10 x Puffer 4 verwendet wird. Im Milieu dieses Puffers schneidet FseI zu 100 % und HindIII nach Angaben des Herstellers zu 50-75 %. Das Plasmid p55pCMV_ivs_luc+ liegt in einer Konzentration von 2,14 µg/µl vor. Etwa 5 µg des Plasmids werden mit den beiden Enzymen verdaut. Das Volumen des zugege-

benen Restriktionsenzyms überschreitet wegen des relativ hohen Gehalts an Glycerin nicht 1/10 des Gesamtvolumens des Ansatzes.

RE-Verdau Plasmid	Ansatz 50 µl
p55pCMV_ivs_luc+	2,5 µl (entspr. 5,35 µg)
Puffer 4	5,0 µl
BSA	0,5 µl
FseI	5,0 µl
HindIII	2,5 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Tab. 8: Verdau des Plamids p55pCMV_ivs_luc+ mit Restriktionsenzymen
Aus dem Plasmid p55pCMV_ivs_luc+ wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und FseI unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Puffer (Puffer 4) und Zusätze (BSA= bovines Serumalbumin) die Luciferase ausgeschnitten.
RE-Verdau = Restriktionsverdau
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Der Ansatz wird eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Mit einem kleinen Aliquot des Ansatzes wird durch eine gelelektrophoretische Trennung auf 1 % TBE-Gel der Verdau überprüft (siehe Kap. III A 1.3).

1.4.3 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Für den Restriktionsverdau werden die gereinigten cDNA-Fragmente aus der PCR benötigt. Die PCR-Produkte werden nach Kontrolle der Größe durch Gelelektrophorese mit dem "QIAquick PCR Purification Kit Protocol" nach Herstellerangaben aufgereinigt oder auf das Gel aufgetragen, ausgeschnitten und die gewünschte DNA mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit Protocol" isoliert (siehe Kap. III A 1.3.1 und 1.3.2). Eine geringe Menge Zytokin-cDNA liegt anschließend in etwa 50 µl Aqua bidest. gelöst vor. Um eine stärker konzentrierte Lösung zu erhalten wird das Wasser im Exsikkator eingedampft.

Der Verdau wird in einem 10 µl Ansatz durchgeführt und eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (siehe Tab. 9) (vergleiche auch Kap. III A 1.4.2).

RE-Verdau des PCR-Produkts	Ansatz 10 µl
PCR-Produkt	0,6 µl
Puffer 4	1,0 µl
BSA	0,1 µl
FseI	1,0 µl
HindIII	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Tab. 9: Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen
Die PCR-Produkte werden mit den Restriktionsenzymen HindIII und FseI unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Puffer (Puffer 4) und Zusätze (BSA = bovines Serumalbumin) verdaut.
RE-Verdau = Restriktionsverdau
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Ein erneutes Aufreinigen des Ansatzes ist nicht nötig, da die Aktivität der Enzyme bei Raumtemperatur unterbrochen wird und vor der anschließenden Ligation eine Ethanolfällung stattfindet (siehe Kap. III A 1.4.4).

1.4.4 Ligation

Die Ligation des Amplifikats in den Expressionsvektor erfolgt gerichtet, das heißt die verwendete T4 DNA Ligase verbindet das HindIII-Schnittende des PCR-Produkts (*insert*) mit dem des Vektors und das FseI-Ende des *inserts* ebenfalls mit dem des Vektor. Diese, ursprünglich aus dem Bakteriophagen T4 stammende, Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen und verknüpft so doppelsträngige DNA-Fragmente, die am 3`-Ende eine Hydroxylgruppe und am 5`-Ende eine Phosphatgruppe besitzen.

Für die Ligation wird das zu klonierende *insert* zum linearisierten Vektor in molarem Überschuß zugegeben. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel (126):

$$ng\ (Vektor) = ng\ (insert) \times kb\ (Vektor)/kb\ (insert) \times molarer\ Überschuss\ (3\text{-}5)$$

Die Konzentrationen von Vektor und *insert* werden anhand der Intensität der im Agarosegel auftretenden Banden unter UV-Licht abgeschätzt (siehe Kap. III A 1.1.3).

In den Ansätzen des Restriktionsverdaus befinden sich noch die abgespaltenen, nur wenige Basen langen, Enden. Diese werden durch eine der eigentlichen Ligation vorausgehenden Ethanol-Co-Präzipitation entfernt. Hierbei werden alle größeren DNA-Fragmente ausgefällt, während die kleinen, von den PCR-Produkten abgespaltenen, DNA-Stücke in Lösung bleiben.

Die mit oben stehender Formel berechneten Anteile an Vektor und *insert* werden unter Zugabe von 5 M NaCl und Aqua bidest. gemischt, so dass eine 0,5 M Lösung entsteht. Dazu wird das 2,5 fache Volumen an Ethanol gegeben und die Ansätze bei -20 °C etwa eine Stunde gelagert. Nach Zentrifugation (4 °C, 45 min, 13.000 g) wird der Überstand, der die kleinen, nicht ausgefällten DNA-Stücke enthält, verworfen. Das zurückbleibende DNA-Pellet, dessen Lage zu Beginn der Zentrifugation markiert wurde, wird 2-3 min luftgetrocknet und dann in folgendem 10 µl Ligationsansatz resuspendiert:

Ligation	Ansatz 10 µl
DNA-Pellet	
TE-Puffer	4,0 µl
5 x Ligase Puffer	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Tab. 10: Ligationsansatz
Zum DNA-Pellet, welches den Vektor und das *insert* enthält, werden die vom Hersteller empfohlenen Puffer (TE-Puffer und 5 x Ligase Puffer) zugegeben. Später erfolgt die Ligation der DNA-Stücke mittels der T4 DNA Ligase. Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Zu 9 µl des Ansatzes wird 1 µl T4 DNA Ligase gegeben und der Ansatz über Nacht bei 16 °C, dem Temperaturoptimum der Ligase, im Wasserbad inkubiert. 1 µl wird vor Zugabe der Ligase aus dem Ansatz entnommen und in 2 µl Aqua bidest. gegeben. Mit Hilfe dieses Kontrollansatzes, der nur das geschnittene, linearisierte Plasmid ohne inserierte DNA enthält, kann nach der Transformation kompetenter Bakterien die Anzahl der Bakterienkolonien abgeschätzt werden, die durch Aufnahme religierter Expressionsvektoren entstanden sind (siehe Kapitel III A 1.4.5).

Die entstandenen Vektorkonstrukte werden als pBay-feIL-2, pBay-feGM-CSF und pBay-feIFNγ bezeichnet.

1.4.5 Transformation kompetenter Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen genetischen Materials, z. B. in Form bakterieller Plasmide, in Bakterien. Die genetischen Eigenschaften der Bakterien werden hierbei verändert. Nur kompetente Bakterien haben die Fähigkeit DNA aufzunehmen. Zur Amplifizierung der rekombinanten Plasmide werden Bakterien des E. coli Stammes DH 10 B verwendet.
Ein tiefgefrorenes Aliquot dieser Bakterien wird auf Eis aufgetaut und mit den rekombinanten Plasmiden transformiert. Die Selektion der Bakterien im entsprechenden Medium erfolgt über das Antibiotikaresistenzgen des aufgenommenen Plasmids.

Zu je 100 µl der Bakterien-Stammsuspension werden je 3 µl des Ligationsansatzes oder des negativen Kontrollansatzes pipettiert (siehe Kap. III A 1.4.4). Als Positivkontrolle, zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation, dienen 10 ng des Plasmids pUC19, die ebenfalls auf ein Aliquot der Bakterien pipettiert werden.
Nach vorsichtigem Mischen werden die Bakterien zuerst 15 min auf Eis (4 °C) inkubiert und dann 1 min 50 sec im Heizblock auf 42 °C erhitzt. Der Hitzeschock stoppt die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien. Nach Zusatz von 1 ml Luria-Bertani Medium (LB-Medium) ohne Antibiotikum wird der Ansatz nochmals 15 min auf Eis gekühlt. Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 37 °C und 150 U/min im Bakterienschüttler. Anschließend werden unterschiedliche Volumina (100 µl, 900 µl) der Transformationsansätze auf ampicillinhaltige Agarplatten (Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten mit dem, das Ampicillinresistenz-Gen enthaltenden, Plasmid können auf diesen Selektivmedium-Platten wachsen im Gegensatz zu Bakterien, die das Plasmid nicht enthalten. Die Platten werden, nachdem sie an der Luft abgetrocknet sind, im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubation können auf den Platten nach erfolgreicher Transformation stecknadelkopfgroße, gelbe, leicht erhabene, klonale Bakterienkolonien gezählt werden. Auf den Negativkontrollplatten können vereinzelt Kolonien gezählt werden, die auf die Aufnahme religierter Plasmide zurückzuführen sind. Die Positivkontrollplatten zeigen unzählige kleine Kolonien, was für eine erfolgreiche Transformation spricht.

1.4.6 Untersuchung transformierter Bakterien

Minikultur und analytische Plasmidpräparation

Die Anzucht der Einzelkolonien erfolgt durch Einimpfen der Kolonien in je eine Starter-Kultur aus 2 ml LB-Medium, das ebenfalls mit Ampicillin (80 µg/ml LB-Medium) versehen ist, um das Wachstum anderer Bakterien zu unterdrücken.

Nach einer Inkubation der Kulturen im Flachbett-Schüttler bei 300 U/min im 37 °C warmen Brutschrank über Nacht wird die Plasmid-DNA aus den Minikulturen mit Hilfe des "Wizard Plus Minipreps DNA Purification System" entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Hierbei erfolgt die Lyse der Bakterien in NaOH/SDS-haltigem Puffer. Proteine und DNA werden freigesetzt und denaturiert. Durch Neutralisation des Lysats mittels Zugabe hoher Salzkonzentrationen fallen chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer als Präzipitat aus. Die in Lösung verbleibende Plasmid-DNA wird durch Alkohol entsalzt und gefällt.

Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide

Um sicher zu sein, dass sich das gewünschte *insert* im Vektor befindet, führt man eine analytische Spaltung der Plasmide mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen durch. Hierfür werden 0,2-1 µg Plasmid-DNA mit 5-10 units Restriktionsenzym und dem dazugehörigen Puffer in einem Ansatzvolumen von 10 µl für 1-2 Stunden bei der jeweils vom Hersteller angegebenen, enzymspezifischen Temperatur inkubiert.
Eine Fragmentierung der Plasmide mit HindIII und FseI ergibt die ursprüngliche Zytokin-cDNA-*inserts* sowie den linearisierten Rest des Plasmids. Des Weiteren erfolgt eine Linearisierung des *supercoiled* Plasmids mit HindIII. Für das Plasmidkonstrukt pBay-feIL-2 erfolgt noch eine Spaltung mit NspI, für pBay-feGM-CSF mit DraII und für pBay-feIFNγ mit AccI. Diese Enzyme schneidet das neue Plasmid zweimal, optimalerweise einmal im *insert* und einmal im *backbone* des ursprünglichen Plasmids. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt in einprozentigem Agarosegel (siehe Kap. III A 1.3). Anschließend wird unter UV-Licht die Länge der Banden mit der erwarteten Bandengröße verglichen.

Glyceroldauerkultur

Von Bakterienkulturen, welche vermutlich die gewünschten Plasmide enthalten, werden Glyceroldauerkulturen angelegt, indem 0,5 ml der entsprechenden Minikultur mit dem gleichen Volumen 40 % Glycerin gemischt und bei -70 °C gelagert werden.
Zum erneuten Ausstreichen müssen mit einer sterilen Impföse an der Oberfläche der gefrorenen Kultur Bakterien aufgenommen und in ampicillinhaltiges LB-Medium geimpft werden.

1.5 Sequenzanalyse

Um sicher zu gehen, dass auch die erwünschte Zytokin-cDNA in das Plasmid eingebaut wurde und um dessen Sequenz zu überprüfen, werden die rekombinanten, nach Probespaltung durch Restriktionsendonukleasen als positiv angesehenen Plasmide zur Sequenzanalyse geschickt.

PCR mit Sequenzierprimern

Um das *insert* zu sequenzieren sind Sequenzierprimer (siehe A Materialiennachweis Tab. 1) nötig, die im Plasmid an den flankierenden Sequenzen ansetzen und das *insert* in einer PCR amplifizieren. Für die PCR wird jeweils 1 ng der gereinigten Plasmid-DNA eingesetzt (PCR-Ansatz und Temperaturprotokoll siehe Tab. 11 und 12).

PCR mit Sequenzierprimern	Ansatz 20 µl
1 ng gereinigte pDNA	
PCR-Mix (Fermentas)	15,2 µl
Ol-428 (100 µM)	0,1 µl
Ol-429 (100 µM)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Tab. 11: PCR-Ansatz Sequenzierprimer

Nach Anlagerung der spezifischen Primer (Ol-428 und Ol-429) an die pDNA (Plasmid-DNA) wird das *insert* durch die Taq-Polymerase amplifiziert.
pDNA = Plasmid-Desoxyribonukleinsäure
Ol-428 = Oligonukleotid, *forward*-Primer
Ol-429 = Oligonukleotid, *reverse*-Primer
Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	52 °C	1 min
Synthese	72 °C	1 min
Anzahl der Zyklen: 30		
Finale Extension	72 °C	7 min
Kühlung	4 °C	

Tab. 12: PCR-Temperaturprotokoll Sequenzierprimer

Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der *insert*s erfolgt durch die Fa. SequiServe, Vaterstetten. Es werden sowohl die gereinigten Plasmide als auch die zwei Sequenzierprimer in den geforderten Konzentrationen an die Firma geschickt. Ausgehend von den Sequenzierprimern Ol-428 und Ol-429 (siehe A Materialiennachweis Tab. 1) erfolgt die Sequenzreaktion in beide Richtungen.
Die Sequenzen werden mit den entsprechenden bereits veröffentlichten felinen Sequenzen verglichen. Weitere *alignments* mit Sequenzen anderer Spezies erfolgen mit Hilfe der Software Lasergene DNAstar.

1.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die gewünschten Bakterien werden in eine Starterkultur aus 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (80 µg/ml LB-Medium) eingeimpft und in einem Flachbett-Schüttler für 4 h bei 37 °C inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur werden in 500 ml des gleichen Mediums pipettiert und so die DH 10 B-Bakterien, die das rekombinante Plasmid tragen ausreichend vermehrt. Die Präparation einer größeren Menge Plasmid-DNA erfolgt mit dem "Qiagen Plasmid Maxi Kit (100)" nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Plasmid-Präparation entspricht dem im Kap. III A 1.4.6 beschriebenen.

2 Biologische Wirksamkeit der rekombinanten Proteine

Um die drei klonierten Zytokin-Gene klinisch einsetzen zu können, muss zuvor mit einer akkuraten und sensitiven Methode getestet werden, ob der nach der Proteinbiosynthese entstehende Mediator auch biologische Aktivität besitzt.
Zum Nachweis der biologischen Aktivität von Zytokinen kommen so genannte Bioassays zum Einsatz, welche die biologische Wirkung dieser Faktoren in Relation zu einem Standard absolut oder relativ quantifizieren (62). Dabei können die Wirkungen von Zytokinen auf spezielle Zellen ausgenutzt werden: Schutz vor einer viralen Infektion, Apoptoseinduktion, Sekretion anderer Zytokine, Differenzierung und Induktion von Zelloberflächenmarkern oder auch die Proliferation und das Überleben von Zellen (276).
Bei vielen Zytokinen kann eine bereits etablierte Zelllinie genutzt werden. Diese Zelllinien sind in ihrem Wachstum und Überleben auf ein oder auch manchmal mehrere Zytokine angewiesen. Für huIL-2 und huGM-CSF sind solche Tests etabliert. Die Zellproliferation kann mit der Inkorporation von radioaktivem ^{3}H-Thymidin gemessen werden, oder durch nicht-radioaktive Methoden, wie der Verwendung von Tetrazoliumsalz-Assays (MTT, XTT, WST-1), welche spektralphotometrisch ausgewertet werden. Andere zelluläre Funktionen können ebenfalls benutzt werden um biologische Effekte von Zytokinen zu messen. Dies ist z. B. beim durchflusszytometrischen Bioassay von IFNγ der Fall: Hier wird die durch IFNγ induzierte Hochregulation von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nachgewiesen (335).

2.1 Kultivierung von COS-7 Zellen

Für die Expression der drei felinen Zytokine wird eine Säugerzelllinie gewählt. COS-7 Zellen sind adhärent wachsende Nierenzellen von Grünen Meerkatzen, die auch von Cozzi *et al.* für die Expression von feIL-2 verwendet werden (59, 60).

Es werden ca. 2 x 10^5 COS-7 Zellen in 10 ml RPMI Komplettmedium 2 in einer T75 Zellkulturflasche ausgelegt und bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Nach etwa 2-3 Tagen, wenn sich ein fast konfluenter Zellrasen gebildet hat, erfolgt die Subkultivierung.

Analog erfolgt eine Kultivierung von COS-7 Zellen in DMEM Komplettmedium 1, da die biologische Aktivität des Überstands der mit feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen auf in DMEM Komplettmedium wachsenden felinen Fibrosarkomzellen getestet wird.

2.2 Transfektion von COS-7 Zellen

Die Transfektion dient dazu, DNA-Moleküle mittels nicht-viraler Methoden in Zellen einzuschleusen, um eine transiente Expression der entsprechenden Gene zu erreichen, d. h. die DNA wird nicht ins Genom integriert, sondern verbleibt extrachromosomal. Es wird die Lipofektion mit Metafectene verwendet, wobei die Transfektion nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt wird.

Für die Transfektion werden nur regelmäßig passagierte, gut proliferierte Zellen benutzt. Einen Tag vor der Transfektion werden die COS-7 Zellen in neuem RPMI Komplett-Medium 3 in Petrischalen für die Zellkultur in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/10 cm^2 Platte ausgelegt. Die Zellen werden anschließend weiterkultiviert.

Zur Vorbereitung der Transfektion werden je 10 µg der Plasmide pBay-feIL-2 und pBay-feGM-CSF mit je 500 µl RPMI 1640 (ohne Zusätze) gemischt. Des Weiteren wird eine Lösung aus 20 µl Metafectene und 500 µl RPMI 1640 (ebenfalls serum- und antibiotikafrei) vorbereitet. Zur Bildung der DNA/Lipid-Komplexe werden beide Ansätze vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Nach Zugeben der Transfektionslösung auf die COS-7 Zellen werden diese 2 h im Wärmeschrank weiterkultiviert. Das alte Medium mit der Transfektionslösung wird anschließend entfernt und durch frisches Medium ersetzt.
Nach Transkription und Translation befindet sich das synthetisierte Protein nun im Überstand der COS-7 Zellen, welcher nach drei Tagen geerntet wird: Nach Absaugen und Zentrifugieren (5 min bei 125 g) der Überstande werden diese aliquotiert und in 1,8 ml Portionen in Cryotubes bei -80 °C eingefroren.

Für spätere Negativkontrollen wird auch Metafectene ohne Plasmid auf die COS-7 Zellen gegeben und Transfektionen mit dem Plasmid p55pCMV_ivs_luc+ und einem weiteren Kontrollplasmind pBayMCS entsprechend durchgeführt.
Die Transfektion der im DMEM Komplettmedium 1 kultivierten COS-7 Zellen mit

pBay-feIFNγ erfolgt analog, anstelle des RPMI 1640 Mediums wird DMEM ohne weitere Zusätze verwendet, da die Fibrosarkomzellen, auf die später der Überstand gegeben werden soll im Gegensatz zu den TF-1 und CTLL-2 Zellen in DMEM und nicht in RPMI 1640 kultiviert werden. Auch die oben genannten Negativkontrollen werden entsprechend angesetzt.

2.3 Nachweis der biologischen Aktivität von felinem IL-2

Der Nachweis biologischer Aktivität von murinem und humanem IL-2 ist bereits fest etabliert und erfolgt nach einem Standardprotokoll (65). Hierbei wird eine murine zytotoxische T-Zelllinie (CTLL) verwendet, welche von exogen zugeführtem IL-2 (und IL-4) abhängig ist, d. h. ohne das Interleukin ist keine Proliferation der Zellen möglich, sie sterben ab (109).

Zum Nachweis biologischer Aktivität des felinen IL-2 Proteins züchten Cozzi *et al.* COS-7 Zellen, die nach Transfektion feIL-2 exprimieren. Den Überstand dieser Zellen geben sie auf eine Kultur von CTLL-4 Zellen. Die Auswertung des Proliferationsassays erfolgt mittels MTT-Colorimetrie Assay (59). In anderen Veröffentlichungen kommen ebenfalls murine IL-2 abhängige zytotoxische T-Zelllinien zur Anwendung: CTLL-2 und CTLL-20 (11, 113).

2.3.1 Kultivierung von CTLL-2 Zellen

Etwa 2,3 x 10^5 CTLL-2 Zellen werden in 10 ml RPMI Komplettmedium 2 in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät. Damit die Zellen nicht absterben muss IL-2 zugegeben werden. Nach Kultivierung bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank findet alle 2-3 Tage eine Subkultivierung statt. Die Zellzahl und *viability* werden anhand eines Aliquots entsprechend Kap. III A 1.1.1 bestimmt. Die Zellen liegen einzeln oder formen kleine *cluster*. Das Medium wird nach fünfminütiger Zentrifugation bei 125 g abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium unter IL-2 Zugabe auf neue T75 Zellkulturflaschen verteilt.
Nach Optimierung des Wachstums der CTLL-2 Zellen mit unterschiedlichen Mengen an IL-2 Zusatz, erhält man zwei verschieden konditionierte Zelllinien: Eine Zelllinie mit

1 U huIL-2/ml und eine andere mit 4 U huIL-2/ml.
Die Zellen werden bis zur erneuten Teilung oder Beginn des Proliferationtests im Brutschrank kultiviert.

2.3.2 Proliferationstest IL-2

Testprinzip dieses Bioassays ist die dosisabhängige Proliferation der CTLL-2 Zellen, welche mittels MTT-Test bestimmt werden kann. Die mitochondrialen Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen sind in der Lage gelbes Tetrazoliumsalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid) zu einem purpurfarbenen Formazanprodukt zu reduzieren. Dieses lässt sich komplett in Isopropanol lösen und über die spektralphotometrische Messung der Extinktion im ELISA-*reader* auswerten, wobei die Datenanalyse im angeschlossenen Computer erfolgt (220). Über die Extinktion kann man mittels Lambert-Beer`schem Gesetz die Konzentration des Formazanprodukts bestimmen und darüber Rückschlüsse auf die durch IL-2 induzierte Proliferation ziehen.

Bei der Vorbereitung der CTLL-2 Zellen für den Bioassay werden diese zunächst 10 min bei 125 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 ml steriler PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wird insgesamt dreimal durchgeführt, um das restliche rhuIL-2 zu entfernen. Nach der letzten Zentrifugation wird das Zellpellet in einer kleinen Menge RPMI Komplettmedium 2 (ohne Zugabe von rhuIL-2) resuspendiert, sowohl Zellzahl als auch *viability* bestimmt (siehe Kap. III A 1.1.1) und anschließend eine Konzentration von etwa 3.000 Zellen/50 µl eingestellt. Je 3.000 Zellen werden pro Kavität der 96-Lochplatte vorgelegt. Die Anzahl der verwendeten Zellen orientiert sich an Cozzi *et al.*, welche 5000 CTLL-4 Zellen benutzen (59), an anderen Autoren, die 4000 CTLL-2 Zellen verwenden (23, 266), als auch an einem eigenen Vorversuch, bei welchem unterschiedliche Zellzahlen sowie eine Verdünnungsreihe von rhuIL-2 verwendet werden (siehe Kap. III B 2.1). Der Vorversuch wird entsprechend dem Hauptversuch durchgeführt.
Als Positivkontrolle dient eine Verdünnungsreihe von rhuIL-2 mit einer Maximalkonzentration von 32 U/ml (in Triplets aufgetragen). Des Weiteren werden die gewonnenen Überstände (siehe Kap. III A 2.2) der mit pBay-feIL-2 transfizierten COS-7 Zellen zugegeben. Als Negativkontrollen dienen Überstände von nicht-transfizierten, nur mit Metafectene ohne Plasmid behandelten COS-7 Zellen, sowie mit

p55pCMV_ivs_luc+ und dem Kontrollplasmid pBayMCS transfizierten COS-7 Zellen. Insgesamt befinden sich in jeder Kavität 100 µl.
Nach Inkubation der 96-Lochplatte für 48 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchte im Wärmeschrank wird der MTT-Test (Cell Proliferation Kit I) nach Herstellerangaben durchgeführt: Es werden 10 µl der MTT Reagenz in jede zu testende Kavität gegeben und die Platte weiter bei 37 °C bei 5 % CO_2 inkubiert. Nach vier Stunden wird der entstandene unlösliche Formazankomplex durch Zugabe von 100 µl Lösungsreagenz gelöst und die Platte erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle, ob sich alle Formazankristalle gelöst haben, erfolgt die Messung der Extinktion im ELISA-*reader* bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 690 nm, welche den Hintergrund, wie Zelltrümmer oder nicht-spezifische Absorption, reduziert.

2.4 Nachweis der biologischen Aktivität von felinem GM-CSF

Eine etablierte Möglichkeit die Bioaktiviät von GM-CSF zu bestimmen, beruht auf dem gleichen Prinzip wie der IL-2 Bioasay. Dieser für huGM-CSF etablierte Proliferationstest wird für feGM-CSF im US-Patent Nr. 6471957 sowie von Dunham *et al.* aufgeführt. Die Proliferation wird dort mittels ^{3}H-Thymidin Inkorporation gemessen (80).

2.4.1 Kultivierung von TF-1 Zellen

Bei der Zelllinie TF-1 handelt es sich um eine humane erythroleukämische Zelllinie, die in ihrem Wachstum unter anderem auch GM-CSF abhängig ist (172).

5,9 x 10^6 TF-1 Zellen werden in 27 ml RPMI Komplettmedium 3 in einer T75 Zellkulturflasche aufgetaut. Pro Milliliter werden 2 ng rhuGM-CSF zugegeben, damit die Zellen nicht absterben. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luffeuchtigkeit im Inkubator. Alle 2-3 Tagen wird die Kultur passagiert: Zellzahl und *viability* werden anhand eines Aliquots entsprechend Kap. III A 1.1.1 bestimmt. Die Zellen wachsen hauptsächlich in *cluster*, lassen sich jedoch durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut vereinzeln. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 125 g wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in neuem Medium unter rhuGM-CSF Zugabe

resuspendiert und in der gewünschten Anzahl auf neue T75 Zellkulturflaschen verteilt. Bis zur erneuten Teilung oder Beginn des Proliferationtests werden die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert.

2.4.2 Proliferationstest GM-CSF

Dieser Test dient dem Nachweis der biologischen Aktivität des feGM-CSF im Zellkulturüberstand der COS-7 Zellen.
Verwendet wird für die Proliferationsmessung ein XTT-Test, der wie der MTT-Test (siehe Kap. III A 2.3.2) auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes beruht. Es entsteht allerdings im Gegensatz zum MTT-Test ein lösliches Formazanprodukt. Deshalb kann der letzte Schritt des MTT-Test, das Löslichmachen des Formazanprodukts entfallen. Der Test kann also nicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt abgelesen werden, sondern mehrmals.

Die TF-1 Zellen werden bei 125 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml steriler PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird dieser Waschschritt insgesamt dreimal wiederholt, so dass das restliche im Medium enthaltene rhuGM-CSF entfernt ist. Nach Ermittlung der Zellzahl und *viability* (siehe Kap. III A 1.1.1) wird die Zellsuspension auf eine Dichte von 20.000 Zellen/50 µl eingestellt.
Je 20.000 Zellen werden in die Kavitäten einer 96-Lochplatte vorgelegt. Die Anzahl der verwendeten Zellen orientiert sich an einem eigenen Vorversuch, bei welchem unterschiedliche Zellzahlen, sowie eine Verdünnngsreihen von rhuGM-CSF verwendet werden (siehe Kap. II B 2.2). Eine andere Quelle verwendet 10.000 Zellen/Kavität (265).
Darauf werden je 50 µl einer Verdünnungsreihe (Duplet) mit rhuGM-CSF (bis zu einer Maximalkonzentration von 20 ng) und einer Verdünnungreihe (Triplet) mit rfeGM-CSF (bis zu 100 ng) gegeben, um zwei Standardkurven zu erstellen. In einer weiteren Verdünnungsreihe (Triplet) wird der zu testende Überstand der mit pBay-feGM-CSF transfizierten COS-7 Zellen und zur Negativkontrolle der Überstand der mit p55pCMV_ivs_luc+ transfizierten COS-7 Zellen über die TF-1 Zellen gegeben. Nach Inkubation der 96-Lochplatte für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank wird der XTT-Test (Cell Proliferation Kit II) nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt:
50 µl des XTT-Reagenz werden in alle zu testenden Kavitäten pipettiert und die 96-Lochplatte weiter inkubiert. Die Messungen mit dem ELISA-*reader* bei einer

Wellenlänge von 485 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm erfolgen in regelmäßigen Abständen bis 24 h.

2.5 Nachweis der biologischen Aktivität von felinem IFNγ

IFNγ hat sowohl antivirale und antiparasitäre als auch antiproliferative Wirkung, wobei die immunmodulatorische, wachstumsinhibierende Aktivität stärker sein soll als die anderer Interferone (62, 288). All diese Eigenschaften können für den Nachweis der Bioaktivität ausgenutzt werden.

IFNγ ist eines der Hauptzytokine, welches verantwortlich ist für die Verstärkung bzw. Induktion der MHC I- und MHC II-Molekülexpression auf einer großen Anzahl von Immunzellen, aber auch anderen Zellen (288).
Da die geplante gentherapeutische Anwendung die immunregulatorische Wirkkomponente des Zytokins erfordert, soll versucht werden mittels Durchflusszytometrie den Einfluss von feIFNγ in Bezug auf MHC I- und MHC II-Expression auf Fibrosarkomzellen der Katze darzustellen.

2.5.1 MHC-Induktionstest mit felinen Fibrosarkomzellen

2.5.1.1 Kultivierung von felinen Fibrosarkomzellen

Kleine Stücke eines chirurgisch entfernten felinen Fibrosarkoms werden in DMEM Komplettmedium 2 kultiviert und unter 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchte im Brutschrank angezüchtet. Eine Passagierung findet alle 3-4 Tage statt.

2.5.1.2 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescent activated cell sorting*) beruht auf einer gleichzeitigen physikalischen Analyse mehrerer Charakteristika von Zellen, die von einem Flüssigkeitssystem einzeln an einem Laserstrahl mit Licht der Wellenlänge 488 nm vorbeigeführt werden. Das von den Zellen gestreute Licht wird in Richtung des Strahls

(FSC, *forward scatter*) und im 90° Winkel (SSC, *side scatter*) mit unveränderter Wellenlänge aufgefangen und über elektronische Signale an einen Computer weitergeleitet. Über diese Lichtstreuung werden Größe (FSC) und Komplexität (SSC), d. h. Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der Zellen bestimmt.
Zusätzlich kann Fluoreszenzstrahlung in drei verschiedenen Wellenlängen registriert werden: 515-545 nm (FL1, Grünfluoreszenz), 564-606 nm (FL2, Orangefluoreszenz) und > 650 nm (FL3, Rotfluoreszenz). Zu diesen Untersuchungen werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenantigene oder auch intrazelluläre Strukturen gerichtet sind, markiert. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an den Antikörper gekoppelt sind, können die gebundenen Antikörper durch Anregung der Fluoreszenz mit dem Laser sichtbar gemacht werden.
Diese Parameter definieren alle Partikel als Messereignisse, welche nach computergestützter Auswertung dann in verschiedenen Diagrammen dargestellt werden können.

Vorversuch

Mittels indirekter Immunfluoreszenz soll die Hochregulation von MHC I- und MHC II-Molekülen auf felinen Fibrosarkomzellen durch feIFNγ durchflusszytometrisch gezeigt werden. Die verwendeten Primärantikörper sind W6/32 (IgG2a), ein monoklonaler aus der Maus stammender anti-feMHC I-Antikörper, der ursprünglich aus der Humanmedizin stammt und kreuzreagiert (251) und 42.3 (IgG1), ein muriner monoklonaler anti-feMHC II-Antikörper (262). Der Sekundärantikörper *rabbit anti mouse* (alle Subklassen) ist FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I)-markiert und soll den Erstantikörper sichtbar machen. Dieses Fluorochrom ist durch den Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm anregbar und emittiert grünfluoreszierendes Licht im Bereich von 530 nm, also des Fluoreszenzdetektors FL1.
Als Negativkontrollen dienen Ansätze ohne feIFNγ und Ansätze mit jeweils geeigneten isotypspezifischen Oberflächenmarkern IgG1 und IgG2a aus der Maus (Isotypkontrollen).

Ein Vorversuch mit drei verschiedenen Ansätzen erfolgt in Petrischalen (10 cm Durchmeser). In alle Petrischalen werden 1,72 x 10^6 FSA-Zellen in 4,95 ml vorgelegt. Zum ersten Ansatz werden 50 µl PBS und 1 % HSA gegeben, so dass sich insgesamt 5 ml in der Petrischale befinden, zum zweiten Ansatzes 50 µl rfeIFNγ, welches 1:100 vorverdünnt wurde, so dass sich eine Endkonzentration von 10 ng rfeIFNγ/ml ergibt. Zu den Zellen des dritten Ansatzes werden 50 µl rfeIFNγ gegeben (Konz. 1 µg/10 µl),

so dass die Endkonzentration 1000 ng/ml beträgt. Es erfolgt eine Inkubation der Ansätze für 48 h bei 37 °C.

Je 3,3 x 10^5 FSA-Zellen werden in einem FACS-Röhrchen: mit verschiedenen Konzentration des rfeIFNγ (0 ng/ml, 10 ng/ml , 1000 ng/ml) versetzt (5 FACS-Röhrchen/Ansatz).
Die Zellen werden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen indem sie bei 1.300 rpm 3 min zentrifugiert werden und der Überstand vorsichtig abgesaugt wird. Das entstandene Zellpellet wird gevortext und mit 20 µl *rabbit immunglobulin fraction* bei 20 °C 10 min inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Dadurch soll eine höhere Spezifität der Färbung erzielt werden. Dann erfolgt die Zugabe der Primärantikörper mit einer 20 minütigen Inkubation bei 20 °C: in das erste FACS-Röhrchen wird kein Antikörper zugegeben, in das zweite und dritte jeweils die Isotypkontrollen: 10 µl IgG1 bzw. 10 µl IgG2a, und in das vierte und fünfte Röhrchen 60 µl des MHC I-Antikörpers (W6/32) bzw. 10 µl des MHC II-Antikörpers (42.3).
Um ungebundene Antikörper zu entfernen werden die Ansätze jeweils zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 1.300 rpm 3 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands pipettiert man nun zu den pelletierten, mit primären Antikörper behafteten Zellen 10 µl des Sekundärantikörpers *rabbit anti mouse* FITC, welcher an den primären Antikörpern haftet. Nach 20 minütiger Inkubation im Dunkeln bei 20 °C werden die Zellen erneut zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 1.300 rpm 3 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Abschluss werden die Zellpellets in 0,4 ml FACS-Puffer resuspendiert, durch ein 35 µm Cell-Strainer-Cap filtriert und bis zur Analyse auf Eis und vor Licht geschützt aufbewahrt.

Die Analyse erfolgt mit dem FACS-Vantage, wobei die Auswertung mit der Software Cell Quest durchgeführt wird. Die Einstellungen am FACS werden über den Zeitraum der Experimente nicht verändert, um die einzelnen Ergebnisse vergleichen zu können.

Da im Vorversuch nachgewiesen werden kann, dass rfeIFNγ sowohl die Expression von MHC I- als auch von MHC II-Molekülen auf Fibrosarkomzellen hochreguliert (siehe Kap. III B 2.3), soll dies nun auch für das Protein, das vom rekombinanten Plasmid pBay-feIFNγ kodiert wird, nachgewiesen werden.

Hauptversuch

Für den Hauptversuch werden in sieben Petrischalen je 0,5 ml mit 1,75 x 10^6 FSA-Zellen vorgelegt und eine entsprechende Menge an Medium zugegeben. Als Negativkontrolle dienen eine Petrischale, zu der nur PBS und 1 % HSA gegeben werden und zwei Petrischalen, welche die Überstände von nichttransfizierten COS-7 Zellen (angezüchtet in DMEM-Komplettmedium 1) in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Positivkontrollen sind, wie bereits schon im Vorversuch verwendet, zwei Petrischalen mit rfeIFNγ (10 ng/ml und 1000 ng/ml). In die letzen beiden Petrischalen wird der Überstand von mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen (ebenfalls in in DMEM-Komplettmedium 1 kultiviert) unterschiedlicher Konzentration gegeben (siehe Tab. 13).

	Medium	Zellen	Überstand/feIFNγ
1	4,5 ml DMEM-Komp. 1	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	50 µl PBS + 1 % HSA
2	4,5 ml DMEM-Komp. 1	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	50 µl rfeIFNγ (0,01 µg/10 µl)
3	4,5 ml DMEM-Komp. 1	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	50 µl rfeIFNγ (1 µg/10 µl)
4	4,0 ml DMEM-Komp. 1	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	0,5 ml COS-7 (nativ)
5	-	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	4,5 ml COS-7 (nativ)
6	4,0 ml DMEM-Komp. 1	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	0,5 ml COS-7 (pBay-feIFNγ)
7	-	0,5 ml feFSA (1,75 x 10^6)	4,5 ml COS-7 (pBay-feIFNγ)

Tab. 13: FACS-Ansätze

Für die durchflusszytometischen Messungen zum Nachweis der biologischen Aktivität des in dieser Arbeit klonierten IFNγ werden verschiedene Ansätze gemischt. Bei der Negativkontrolle 1 wird PBS (*phosphate buffered saline*) und HSA (humanes Serumalbumin) auf die feFSA-Zellen (felinen Fibrosarkomzellen) gegeben. Die Negativkontrollen 4 und 5 beinhalten eine Zugabe von 10 bzw. 90 % nativen COS-7 Überstands auf die feFSA-Zellen. Als Positivkontrolle dienen Fibrosarkomzellen, die mit 10 bzw. 1000 ng/ml rfeIFNγ (rekombinantes felines Interferon γ) inkubiert werden (Ansätze 2 und 3). Bei den Probeansätzen werden 10 bzw. 90 % des Überstandes, der mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen auf die Fibrosarkomzellen gegeben (Ansätze 6 und 7). Zum Ausgleich des Volumens wird DMEM-Komp. 1 (Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium Komplettmedium 1) zugegeben.

Die Ansätze werden 48 h lang bei 37 °C inkubiert. Nach Trypsinisierung kommen je 0,5 x 10^6 Zellen in 0,9 ml in ein FACS-Röhrchen: für jeden Ansatz 5 FACS-Röhrchen. Das Färben der Zellen sowie die durchflusszytometrischen Messungen erfolgen analog zum Vorversuch.

2.5.2 MHC-Induktiontest mit PBMCs

2.5.2.1 Gewinnung von PBMCs

Von einer klinisch gesunden Katze aus der Chirurgischen Tierklinik (LMU München) werden 7,5 ml Vollblut in mehrere Kalium-EDTA Röhrchen entnommen. Die Isolierung der peripheren mononukleärer Blutzellen erfolgt mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kap. III A 1.1.1). Ein Teil der Zellen wird analog zu Kap. III A 1.1.2 mit ConA stimuliert.

2.5.2.2 Durchflusszytometrie

Die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Überständen und Kontrollen, sowie die Färbung als auch die durchflusszytometischen Messungen erfolgen analog zu Kap. III A 2.5.1.2.
Für den Versuch werden zwei verschiedene Ansatzreihen verwendet: Mit ConA vorstimuliere und native PBMCs. Jeweils ein Ansatz wird als Negativkontrolle mit nativem COS-7 Überstand inkubiert. Als Positivkontrolle dient eine Verdünnungsreihe von rfeIFNγ (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml). Die Überstände der mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen werden in unterschiedlichen Konzentrationen aufgebracht.

3 Schwammbeschichtung

Nachdem sich die drei Zytokine als biologisch aktiv erwiesen haben, sollen die Plasmide nun mit dem Hüllpolymer versehen und auf das Trägermaterial, den Kollagenschwamm, aufgebracht werden.
Die Herstellung der Plasmid-DNA in den benötigten Mengen übernimmt die Firma Plasmid Factory, Bielefeld.
Sowohl die Konjugation der Plasmid-DNA mit dem Polykation Polyethylenimin (PEI) und den protektiven Kopolymeren (PROCOP), als auch die eigentliche Schwammbeschichtung erfolgen nach etablierter Methode (92, 271, 278, 283).

Plasmid-Hüllpolymer-Konjugation

Zur Bildung der pDNA-PEI-PROCOP-Komplexe werden gleiche Volumina an pDNA, PEI und PROCOP benötigt.
Die Menge an PEI ergibt sich aus dem gewünschten Stickstoff:Phosphat-Verhältnis (N/P-Verhältnis in diesem Fall 8). Dieses gibt das molare Verhältnis von Stickstoff-Atomen im PEI zu den negativ-geladenen Phosphaten der Nukleotide der pDNA an. Das optimale PEI Kationen:Anionen-Verhältnis liegt also leicht auf der Kationenseite (26).

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel (283):

$$N/P = (\mu g\ PEI)/\ 43 \times\ 330/(\mu g\ pDNA)$$

N/P = Stickstoff:Phosphat-Verhältnis
PEI = Polyethylenimin
43 = MW der sich wiederholenden Grundeinheit von PEI unter Berücksichtigung der primären Amine (in g/mol)
330 = mittleres MW eines Nukleotids (in g/mol)
pDNA = Plasmid-Desoxyribonukleinsäure

Die gewünschte Menge (je nach vorgesehener Dosis für die Phase I-Studie) an Plasmid-DNA wird in Aqua ad injectabilia gelöst und mit der benötigten PEI-Lösung des gleichen Volumens durch rasches Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 15 min

Inkubation bei Raumtemperatur wird der gebildete DNA-Komplex zu den protektiven Kopolymeren (PROCOP) P6YE5C gegeben und mit diesen vermischt. P6YE5C ist aus PEG-6000 und dem Peptid $[YE_5]_2$Kahx-C synthetisiert (92).
Die Konzentration des Polymers ergibt sich aus der Anzahl der negativen Ladungen des anionischen Peptids im Polymer.
Die Menge der PROCOPs (P6YE5C) berechnet sich nach folgender Formel (283):

$$PROCOP\ (\mu l) = DNA\ (\mu g)/330 \times Ladungsäqu./c\ Hüllpolymer\ (\mu mol/ml) \times 1000$$

PROCOP = *protective copolymere*
DNA = Desoxyribonukleinsäure
330 = mittleres MW eines Nukleotids (in g/mol)
Ladungsäqu. = Ladungsäquivalent (hier 2)
c = Konzentration

Nach einer Inkubation von 15 min erfolgt die Beladung der Kollagenschwämme.

Schwammbeschichtung

Die drei Plasmid-Hüllpolymer-Komplexe werden nun auf den Kollagenschwamm aufgebracht.
Der steril verpackte Kollagenschwamm wird unter der Sterilbank in sterile Petrischalen verbracht. Die zuvor hergestellte pDNA-PEI-PROCOP-Suspension wird nun unter sterilen Bedingungen mit einer Mikropipette auf den Schwamm aufgebracht. Seitlich ablaufende Suspension wird erneut mit der Pipette aufgenommen und über den Schwamm pipettiert bis der Schwamm die gesamte Flüssigkeit aufgesaugt hat. Nach vierstündiger Inkubation werden die Schwämme im Lyophilisator bei 10 µbar einem kurzzeitigen Vakuum ausgesetzt, dem eine plötzliche Belüftung der Kammer folgt. Dieses "*vacuum loading*" führt zu einer Beseitigung der Lufblasen aus dem Schwamm und bewirkt eine gleichmäßige Flüssigkeitsfüllung. Nach dreimaliger Wiederholung wird der Schwamm über Nacht im Lyophilisator getrocknet.
Bis zur Implantation der Schwämme in das Tumorbett der an einem Fibrosarkom operierten Katzen (Chirurgische Tierklinik) werden die Schwämme bei 4 °C in mit Parafilm verschlossenen sterilen Petrischalen gelagert. Vor der Implantation wird der Schwamm unter sterilen Bedingungen vom Operateur im Operationssaal aus der Petrischale entnommen und direkt in das Tumorbett der Katze verbracht.

B ERGEBNISSE

Entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse in mehrere Teilbereiche gegliedert: Klonierung der drei felinen Zytokine, biologische Aktivitätsprüfung und Schwammbeschichtung.

1 Klonierung und Sequenzierung

1.1 feIL-2

Mithilfe der konstruierten Primer kann feIL-2 amplifiziert werden (siehe Abb. 4).

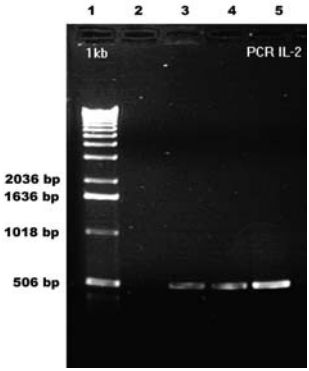


Abb. 4: Elektrophorese des PCR-Produkts der feIL-2 Gen-Amplifikation
IL-2 PCR: Spur 1: 1 kb *ladder*; Spur 2: PCR-Negativkontrolle mit H_2O; Spur 3-5: PCR IL-2, cDNA in einer Länge von 507 bp (465 bp = IL-2 und 42 bp zusätzliche seitl. Primersequenzen)

Das aus der 500 bp-Bande eluierte PCR-Produkt wird in den Expressionsvektor p55pCMV_ivs_luc+ kloniert (siehe Abb. 5).

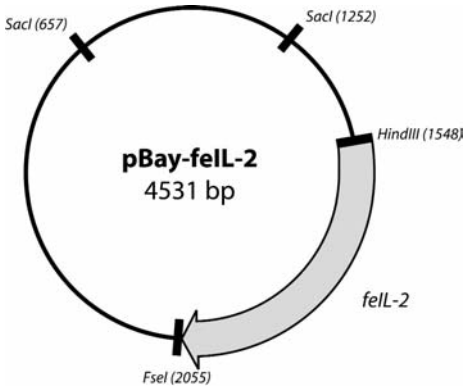


Abb. 5: Vektor mit feIL-2 (pBay-feIL-2)
Schematischer Aufbau des Plasmids pBay-feIL-2 mit Angabe der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymschnittstellen.
Anstelle des Reportergens Luciferase befindet sich nun die Gensequenz des felinen IL-2 im Plasmid.
4531 bp = Größe des Plamids in Basenpaaren
HindIII, FseI, SacI = Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme

Für den ersten Verdau werden die Enzyme HindIII und FseI verwendet mit denen das *insert* auch in den Vektor kloniert worden war. Diese beiden Restriktionsenzyme schneiden das zuvor hineinligierte *insert* feIL-2 wieder heraus. Das Vektorkonstrukt pBay-feIL-2 hat 4531 bp. HindIII schneidet bei 1548 bp, FseI bei 2055. Bei einer Gelelektrophorese erhält man zwei Banden: Das *insert* feIL-2 mit einer Größe von 507 bp, und das *backbone* mit 4024 bp. Mit einem zweiten Verdau durch HindIII wird der Vektor mit dem enthaltenem *insert* linearisiert und man erhält eine Bande von 4531 bp. Das beim dritten Verdau verwendete Enzym SacI schneidet zweimal im *backbone* und zwar an den Stellen 657 und 1252: Es ergeben sich zwei Banden mit 595 und 3936 bp. Aller Wahrscheinlichkeit nach befindet sich das spezifische PCR-Produkt im Vektor.
Die Sequenzierung des *inserts* mit den Sequenzierprimern Ol-428 und Ol-429 führt die Fa. SequiServe, Vaterstetten durch. Sie erfolgt sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Richtung. Eine zuvor mit dem Vektorkonstrukt durchgeführte PCR mit diesen Primern zeigt, dass das *insert* amplifiziert wird. Das erste Sequenzergebnis wird durch eine zweite Sequenzanalyse gesichert und die Sequenz des feIL-2 an die GenBank übermittelt und dort unter der Nummer AY878358 registriert (111).

Die erhaltene Sequenz stimmt mit der veröffentlichten Sequenz des feIL-2 von Cozzi *et al.* (L19402) (59, 111) weitestgehend überein (Abb. 6).

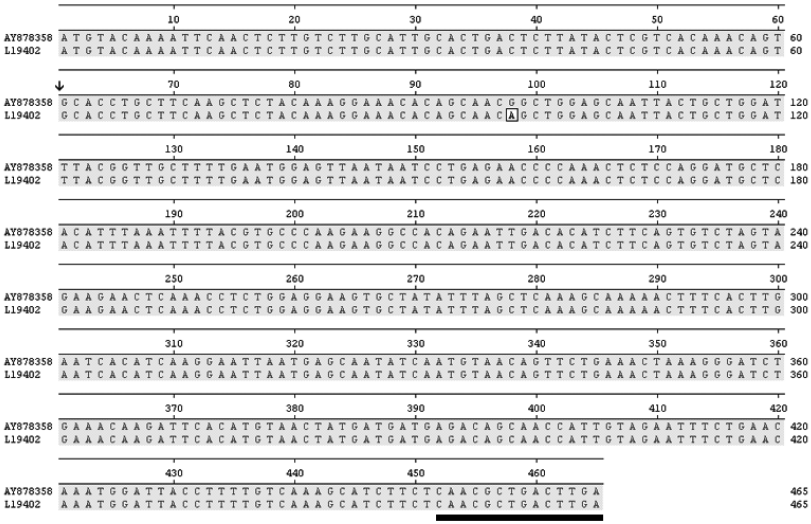


Abb. 6: Vergleich feIL-2 cDNA Sequenzen

Vergleich der cDNA Sequenz von felinem IL-2 (AY878358) mit der bereits in der GenBank veröffentlichten Sequenz von Cozzi *et al.* (L19402) (59, 111). Die Sequenzunterschiede sind weiß unterlegt. Unterstrichen dargestellt ist die Sequenz des Primers (der Vorwärtsprimer reicht nicht bis in die kodierende Region der cDNA). Ein Pfeil markiert den Beginn des für das reife Protein kodierenden Abschnitts (59).

Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

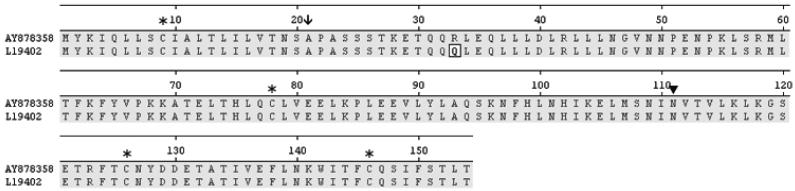


Abb. 7: Vergleich feIL-2 Protein

Vergleich der Aminosäurensequenz von felinem IL-2 (AY878358) mit der bereits veröffentlichten Sequenz von Cozzi *et al.* (L19402) (59, 111). Der durch den Sequenzunterschied kodierte Aminosäurewechsel an Position 33 ist weiß unterlegt. Der Pfeil zeigt den Beginn des reifen Proteins nach der Signalsequenz von 20 AS an. Sterne markieren die Cysteinreste, wobei diese an Position 78 und 126 eine Disulfidbrücke bilden. Das Dreieck markiert die potentielle N-Glycosylierungsstelle (59).

Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

Der Unterschied zwischen den zwei vorliegenden feIL-2 cDNA Sequenzen ist Basenpaar 98 (siehe Abb. 6), wo eine unterschiedliche Base (Guanin bei AY878358, Adenin bei L19402) zu einem AS-Wechsel an Position 33 im Protein führt (Arginin bei AY878358, Glutamin bei L19402) (siehe Abb. 7).
Für die beiden Nukleotidsequenzen, sowie für die Proteine ergibt sich eine Homologie von 99,8 %.
Darüber hinaus wird die Sequenz des klonierten feIL-2 (AY878358) mit IL-2 Sequenzen anderer Spezies sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäurelevel auf Übereinstimmungen verglichen (siehe Tab. 14).

	feIL-2 cDNA	feIL-2 Protein
ca_1	90,3 %	80,6 %
ca_2	88,4 %	79,4 %
hu	89,2 %	77,9 %
po	85,2 %	74,0 %
bo_1	82,4 %	68,4 %
bo_2	82,6 %	69,0 %
ov_1	82,4 %	68,4 %
ov_2	82,4 %	68,4 %
cap	79,8 %	63,2 %
eq_1	87,7 %	77,2 %
eq_2	88,7 %	78,0 %
mu	71,2 %	59,4 %
Robbe	91,4 %	87,7 %

Tab. 14: IL-2 *alignment*
Prozentuale Homologie des felinen IL-2 (AY878358) zu IL-2 anderer Spezies auf Nukleotid- und Aminosäurelevel:
Canine Sequenzen 1 und 2 (D30710 und U11689), humane Sequenz (NM000586), porcine Sequenz (AB041935), bovine Sequenzen 1 und 2 (AF348423 und M12791), ovine Sequenzen 1 und 2 (X55641 und A19169), caprine Sequenz (X76063), equine Sequenzen 1 und 2 (L06009 und X69393), murine Sequenz (NM008366), Sequenz der Robbe (U79187)
Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

1.2 feGM-CSF

Die Software MacVektor kann keine passenden Primer für feGM-CSF finden, weshalb zunächst mit den Primern Ol-522 und Ol-523 gearbeitet wird. Da sich auch nach mehrmaligen PCR-Versuchen und *troubleshooting* keine passende Bande ergibt, wird der *reverse*-Primer abgewandelt:
Angelehnt an die TaqMan-PCR-Pimersequenz für feGM-CSF von Linenberger und Deng wird im *reverse*-Primer ein Basentausch vorgenommen (181), der aber nun nicht mehr der veröffentlichten felinen Sequenz entspricht, sondern der humanen. Des Weiteren wird die letzte Base weggelassen und der Primer so verkürzt, dass sich die Temperaturen des *forward*- und des *reverse*-Primers annähern (siehe Ol-532 in Tab. 2 in Kap. III A 1.2.1). Mit diesen Primern kann ein PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 500 bp amplifiziert werden (siehe Abb. 8).

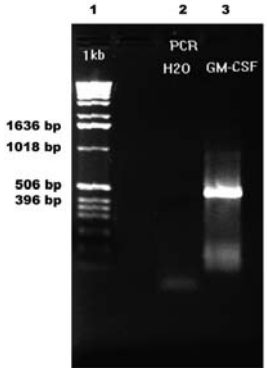


Abb. 8: Elektrophorese des PCR-Produkts der feGM-CSF Gen-Amplifikation
GM-CSF PCR: 1 Spur: 1 kb *ladder*; 2. Spur: PCR-Negativkontrolle mit H_2O; 3. Spur: PCR: cDNA in einer Länge von 464 bp (435 bp = GM-CSF und 29 bp zusätzliche seitl. Primersequenzen)

Nach Restriktionsverdau wird das aus der Bande eluierte PCR-Produkt in den Expressionsvektor kloniert (siehe Abb. 9).
Die durch die Minipreps aus den Bakterienkolonien gewonnenen Pasmide werden probeverdaut. Im ersten Verdau schneiden die Enzyme HindIII und FseI das *insert* wieder aus dem Vektorkonstrukt heraus: pBay-feGM-CSF hat 4473 bp. HindIII schneidet bei 1548 bp, FseI bei 1997 bp, es ergeben sich zwei Banden: Das *insert* feGM-CSF mit einer Größe von 449 bp, und das *backbone* mit 4024 bp. Ein zweiter Verdau mit HindIII

alleine linearisiert das *supercoiled* Plasmid und es entsteht eine Bande von 4473 bp. Das beim dritten Verdau verwendete DraII schneidet sowohl im *insert* als auch im *backbone* und zwar an den Stellen 1799 und 2261: Die zwei Banden sind 462 und 4011 bp groß. Alle in der Gelelektrophorese erhaltenen Banden zeigen die erwartete Größe. Das PCR-Produkt ist in der richtigen Richtung in den Vektor eingebaut.

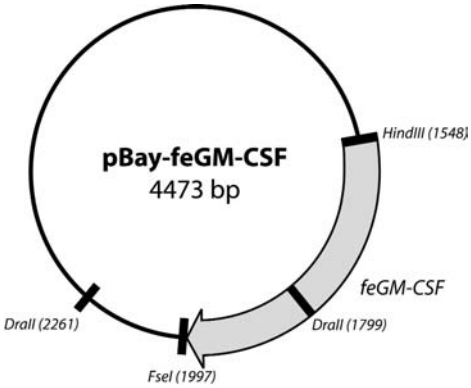


Abb. 9: Vektor mit feGM-CSF (pBay-feGM-CSF)
Schematischer Aufbau des Plasmids pBay-feGM-CSF mit Angabe der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymschnittstellen.
Anstelle des Reportergens Luciferase befindet sich nun die Gensequenz des felinen GM-CSF im Plasmid.
4473 bp = Größe des Plamids in Basenpaaren
HindIII, FseI, DraII = Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme

Die Sequenzanalyse mit den Sequenzierprimern Ol-428 und Ol-429 (siehe Tab. 1 in Kap. III A Materialiennachweis) sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Richtung wird durch eine zweite Sequenzanalyse gesichert. Eine zuvor mit dem Vektorkonstrukt durchgeführte PCR zeigt, dass das *insert* mit den Sequenzierprimern zu amplifizieren ist (siehe Kap. III A 1.5).

Die cDNA von felinem GM-CSF ist 435 Basenpaare lang. Das Sequenzergebnis stimmt mit den veröffentlichten Sequenzen AF053007 (111), AR241565 (US Patent Nr. 6471957 SEQ ID NO: 119) (111) und AY138140 (80, 111) im weitesten Sinne überein (siehe Abb. 10). Es finden sich Sequenzunterschiede durch abweichende einzelne Basen, welche sich auch teilweise im Protein widerspiegeln (siehe Abb. 11).
Sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäurelevel besteht zwischen den vier felinen GM-CSF Sequenzen mindestens eine Gemeinsamkeit von 94,4 % (siehe Tab. 15). Die

größte Übereinstimmung zeigt die klonierte Sequenz mit der Sequenz AR241565 (111): 98,9 % auf Nukleotid- und 97,2 % auf Aminosäurelevel.

Die Sequenz des feGM-CSF wird an die GenBank übermittelt und dort unter der Nummer AY878357 registriert (111).

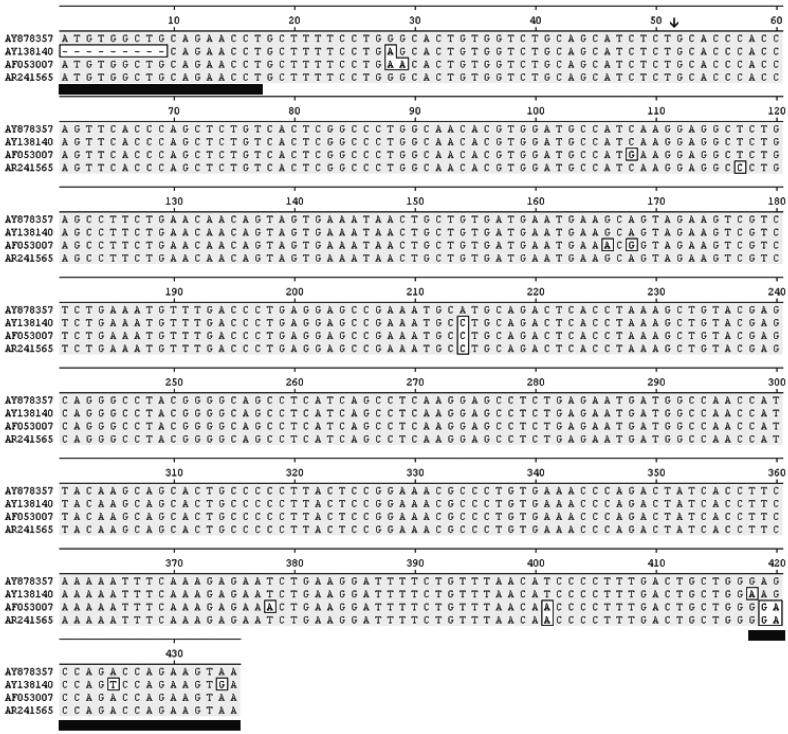


Abb. 10: Vergleich feGM-CSF cDNA Sequenzen

Vergleich der cDNA von felinem GM-CSF (AY878357) mit den bereits veröffentlichten feGM-CSF Sequenzen: AR241565, AF053007 und AY138140 (80, 111).

Die Sequenzunterschiede sind weiß unterlegt. Unterstrichen dargestellt sind die Sequenzen der Primer. Ein Pfeil markiert den Beginn des für das reife Protein kodierenden Abschnitts (80).

Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

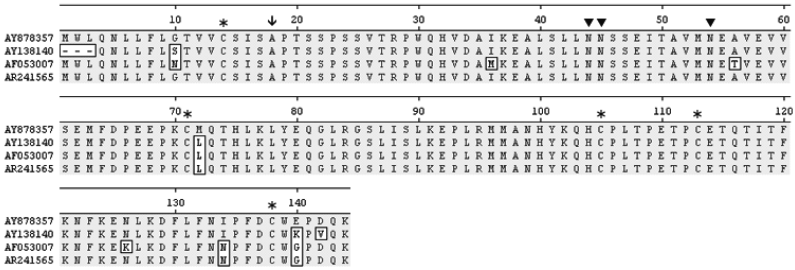


Abb. 11: Vergleich feGM-CSF Protein

Vergleich der Aminosäurensequenz von felinem GM-CSF (AY878357) mit den drei bereits veröffentlichten felinen GM-CSF Sequenzen: AR241565, AF053007 und AY138140 (80, 111). Die durch die Sequenzunterschiede kodierten Aminosäurewechsel sind weiß unterlegt. Der Pfeil zeigt den Beginn des reifen Proteins nach der Signalsequenz. Sterne markieren konservierte Cysteinreste, Dreiecke potentielle N-Glycosylierungsstellen (80).
Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

	AY878357	AY138140	AF053007	AR241565
AY878357	-	98,8 %	97,7 %	98,9 %
AY138140	96,5 %	-	97,4 %	98,1 %
AF053007	94,5 %	94,4 %	-	98,4 %
AR241565	97,2 %	96,5 %	96,6 %	-

Tab. 15: feGM-CSF *alignment*

Prozentuale Homologie der verschiedenen felinen GM-CSF Sequenzen auf Nukleotid- (im rechten, oberen Bereich) und Aminosäurelevel (im linken, unteren Bereich). GenBank: AY878357, AR241565, AF053007 und AY138140 (80, 111).
Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

Die Sequenz des felinen GM-CSF zeigt eine signifikante Homologie zu den entsprechenden Proteinen anderer Haustierspezies. In Tab. 16 sind sowohl die Homologien auf Nukleotidlevel, als auch die *alignments* auf Aminosäurelevel dargestellt.

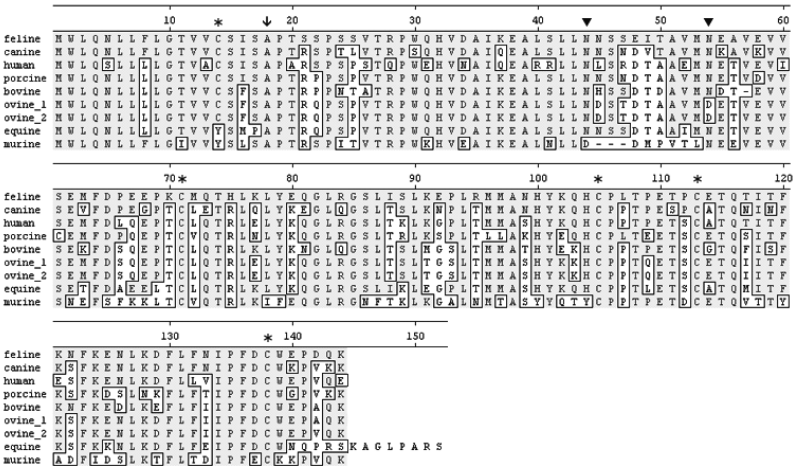


Abb 12: Vergleich GM-CSF Protein

Vergleich des feGM-CSF Proteins (AY878357) mit GM-CSF Aminosäurensequenzen verschiedener Spezies: Canine Sequenz (NM001003245), humane Sequenz (M10663), porcine Sequenz (NM214118), bovine Sequenz (U22985), ovine Sequenzen 1 und 2 (X55991 und X53561), equine Sequenz (AY040203) und murine Sequenz (X03019). Die Aminosäurereste sind über den *alignments* nummeriert. Mit der felinen Sequenz identische Aminosäuren sind grau, sich unterscheidende weiß unterlegt. Der Pfeil zeigt den Beginn des reifen Proteins nach der Signalsequenz. Sterne markieren hoch konservierte Cysteinreste, Dreiecke hoch konservierte potentielle N-Glycosylierungsstellen (80, 152, 232). Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

	feGM-CSF cDNA	feGM-CSF Protein
ca_1	86,2 %	77,2 %
hu	81,8 %	70,3 %
po	84,6 %	73,8 %
bo	82,4 %	72,2 %
ov_1	85,9 %	77,1 %
ov_2	85,7 %	76,6 %
eq	84,8 %	73,8 %
mu	71,6 %	57,7 %

Tab. 16: GM-CSF *alignment*

Prozentuale Homologie des felinen GM-CSF (AY878357) zu GM-CSF anderer Spezies auf Nukleotid- und Aminosäurelevel: Canine Sequenz (NM001003245), humane Sequenz (M10663), porcine Sequenz (NM214118), bovine Sequenz (U22985), ovine Sequenzen 1 und 2 (X55991 und X53561), equine Sequenz (AY040203) und murine Sequenz (X03019). Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

1.3 feIFNγ

Das in der PCR amplifizierte feIFNγ ist etwas größer als 500 bp.

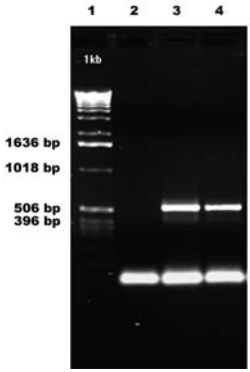


Abb. 13: Elektrophorese des PCR-Produkts der feIFNγ Gen-Amplifikation
IFNγ PCR: Spur 1: 1 kb *ladder*; Spur 2: PCR-Negativkontrolle mit H_2O; Spur 3 und 4: PCR: cDNA in einer Länge von 537 bp (504 bp = IFNγ und 33 bp zusätzliche seitl. Primersequenzen)

Mit diesem PCR-Produkt wird genau wie mit IL-2 und GM-CSF verfahren: Es wird in den Expressionsvektor kloniert und Bakterien mit diesem transformiert. Nach Anzüchtung werden die Plasmide zur Kontrolle mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Mit Hind III und FseI kann das *insert* wieder heraus geschnitten werden: Es ergeben sich zwei Banden mit 537 bp und 4024 bp. Ein zweiter Verdau mit HindIII linearisiert den Vektor (4561 bp). Das beim dritten Verdau verwendete AccI schneidet sowohl im *insert* als auch im *backbone* und zwar an den Stellen 1719 und 2335: Es ergeben sich zwei Banden, 616 und 3945 bp groß. Alle erhaltenen Banden zeigen die erwartete Größe, so dass sich mit großer Wahrscheinlichkeit das spezifische PCR-Produkt in der richtigen Orientierung im Vektor befindet.

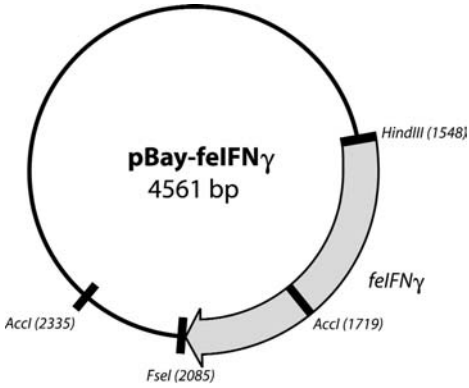


Abb. 14: Vektor mit feIFNγ (pBay-feIFNγ)
Schematischer Aufbau des Plasmids pBay-feIFNγ mit Angabe der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymschnittstellen.
Anstelle des Reportergens Luciferase befindet sich nun die Gensequenz des felinen IFNγ im Plasmid.
4561 bp = Größe des Plamids in Basenpaaren
HindIII, FseI, AccI = Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme

Die Sequenzierung findet ebenfalls mit den Sequenzierprimern Ol-428 und Ol-429 in *sense*- und in *antisense*-Richtung statt. Eine zuvor mit diesen Primern und den wahrscheinlich positiven Plasmiden durchgeführte PCR zeigt, dass das *insert* amplifiziert wird. Eine zweite durchgeführte Sequenzanalyse stimmt mit der ersten überein. Die in dieser Arbeit erhaltene Sequenz des feIFNγ wird ebenfalls an die GenBank übermittelt: AY878359, und mit den bereits bekannten Sequenzen verglichen (siehe Abb. 15).

Felines IFNγ ist 504 bp lang. Die in dieser Arbeit klonierte Sequenz weist auf Nukleotidebene im Vergleich mit den beiden identischen Sequenzen eine Homologie von 99,4 % auf; drei Nukleotide stimmen nicht überein. Diese wirken sich jedoch nicht auf die Aminosäurensequenz aus. Hier besteht eine Homologie von 100 % (siehe Abb. 16).

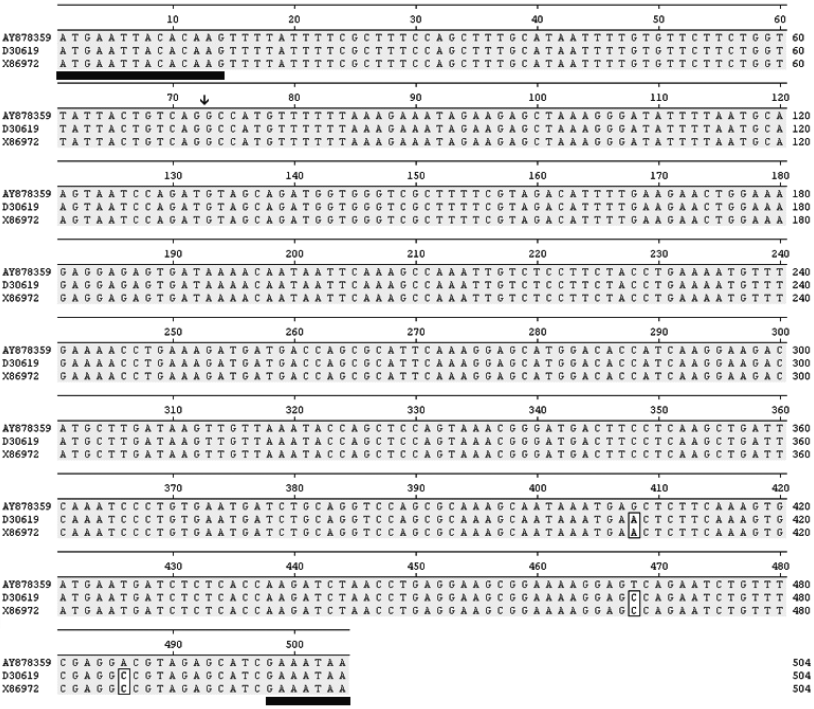


Abb. 15: Vergleich feIFNγ cDNA Sequenzen

Vergleich der cDNA von felinem IFNγ (AY878359) mit den bereits veröffentlichten feIFNγ Sequenzen: D30619 (5) und X86972 (279).

Die Sequenzunterschiede an Position 408, 468 und 486 sind weiß unterlegt. Unterstrichen dargestellt sind die Sequenzen der Primer. Ein Pfeil markiert den Beginn des für das reife Protein kodierenden Abschnitts (5, 279). Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

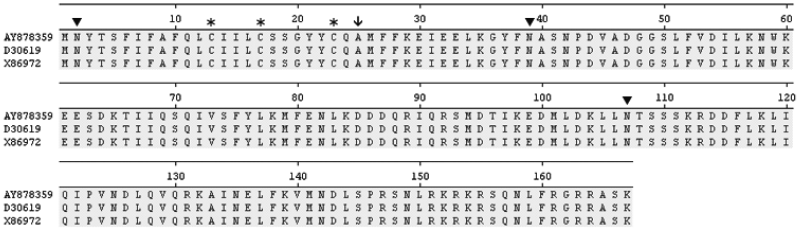


Abb. 16: Vergleich feIFNγ Protein

Der Vergleich der Aminosäurensequenz von felinem IFNγ (AY878359) mit den zwei bereits veröffentlichten feIFNγ Sequenzen D30619 (5) und X86972 (279) ergibt identische Sequenzen. Der Pfeil zeigt den Beginn des reifen Proteins nach der Signalsequenz. Sterne markieren Cysteinreste, Dreiecke potentielle N-Glycosylierungsstellen (5, 279).

Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH (111).

Es wird ebenfalls ein Vergleich mit den Sequenzen anderer Spezies durchgeführt: Die Nukleotidhomologien zwischen den einzelnen Spezies sind in Tab. 17 dargestellt, ebenso die *alignments* der AS-Sequenz.

	feIFNγ cDNA	feIFNγ Protein
ca	84,2 %	82,2 %
hu	76,4 %	63,5 %
bo	80,8 %	73,7 %
ov	80,8 %	74,9 %
cap	81,0 %	74,9 %
eq	83,3 %	77,4 %
mu	62,8 %	44,2 %

Tab. 17: IFNγ *alignment*

Prozentuale Homologie des felinen IFNγ (AY878359) zu IFNγ anderer Spezies auf Nukleotid- und Aminosäurelevel:

Canine Sequenz (S41201), humane Sequenz (NM000619), bovine Sequenz (NM174086), ovine Sequenz (X52640), caprine Sequenz (U34232), equine Sequenz (D28520) und murine Sequenz (NM008337)

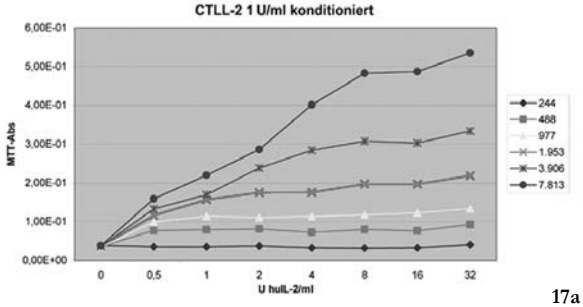
Alle angegebenen Nummern beziehen sich auf die GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des NIH.

2 Untersuchung der biologischen Wirksamkeit

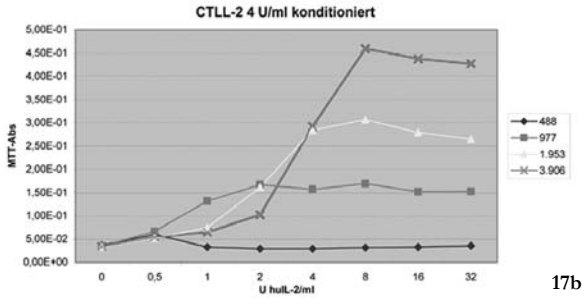
2.1 feIL-2

Das Testprinzip des IL-2 Bioassays beruht auf der Proliferation von IL-2 abhängigen CTLL-2 Zellen. Mit Hilfe des Photometers kann die Konzentration des von den lebenden Zellen umgesetzten Formazanprodukts quantitativ bestimmt werden. Dessen Konzentration ist umso größer, je mehr Zellen proliferieren und metabolische Aktivität zeigen.

Die im Test verwendeten 3000 Zellen/Kavität orientieren sich sowohl an eigenen Vorversuchen (siehe Abb. 17a und 17b), als auch an verschiedenen Literaturangaben (siehe Kap. III A 2.3.2).



17a



17b

Abb. 17a und 17b: Vorversuch zum Proliferationstest feIL-2

Effekt der unterschiedlichen Zellzahl auf die Färbung und Absorption des MTT-Tests (MTT-Abs). Die Absorption wird bei 550 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm im ELISA-*reader* gemessen. Standardkurven aus Vorversuch: Aufgetragen werden Verdünnungsreihen von rekombinantem humanem Interleukin 2 (rhuIL-2) kombiniert mit unterschiedlicher Zahl an CTLL-2-Zellen/Kavität (1 U und 4 U konditioniert). Als optimale Zellzahl ergeben sich ca. 3.000-4.000 Zellen/Kavität, sowohl bei der mit 1 U/ml als auch bei der mit 4 U/ml konditionierten Zelllinie (es sind nicht alle Kurven aufgetragen).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 U/ml 1U-kond.	0 U/ml 1U-kond.	0 U/ml 1U-kond.	COS-7 nativ 1U-kond.	COS-7 nativ 1U-kond.	COS-7 nativ 1U-kond.	0 U/ml 4U-kond.	0 U/ml 4U-kond.	0 U/ml 4U-kond.	COS-7 nativ 4U-kond.	COS-7 nativ 4U-kond.	COS-7 nativ 4U-kond.
B	0,5 U/ml 1U-kond.	0,5 U/ml 1U-kond.	0,5 U/ml 1U-kond.	Metafectene 1U-kond.	Metafectene 1U-kond.	Metafectene 1U-kond.	0,5 U/ml 4U-kond.	0,5 U/ml 4U-kond.	0,5 U/ml 4U-kond.	Metafectene 4U-kond.	Metafectene 4U-kond.	Metafectene 4U-kond.
C	1 U/ml 1U-kond.	1 U/ml 1U-kond.	1 U/ml 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	1 U/ml 4U-kond.	1 U/ml 4U-kond.	1 U/ml 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.
D	2 U/ml 1U-kond.	2 U/ml 1U-kond.	2 U/mll 1U-kond.	pBayMCS 1U-kond.	pBayMCS 1U-kond.	pBayMCS 1U-kond.	2 U/ml 4U-kond.	2 U/ml 4U-kond.	2 U/ml 4U-kond.	pBayMCS 4U-kond.	pBayMCS 4U-kond.	pBayMCS 4U-kond.
E	4 U/ml 1U-kond.	4 U/ml 1U-kond.	4 U/ml 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	4 U/ml 4U-kond.	4 U/ml 4U-kond.	4 U/ml 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.
F	8 U/ml 1U-kond.	8 U/ml 1U-kond.	8 U/ml 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	p55pCMVluc 1U-kond.	8 U/ml 4U-kond.	8 U/ml 4U-kond.	8 U/ml 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.	p55pCMVluc 4U-kond.
G	16 U/ml 1U-kond.	16 U/ml 1U-kond.	16 U/ml 1U-kond.-1	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	16 U/ml 4U-kond.	16 U/ml 4U-kond.	16 U/ml 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.
H	32 U/ml 1U-kond.	32 U/ml 1U-kond.	32 U/ml 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	pBay-feIL-2 1U-kond.	32 U/ml 4U-kond.	32 U/ml 4U-kond.	32 U/ml 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.	pBay-feIL-2 4U-kond.

Tab. 18: Aufbau Proliferationstest feIL-2

Die 12 Spalten sind unterteilt in 2 Blöcke mit je 6 Spalten: in einem sind die mit 1 U rhuIL-2/ml konditionierten CTLL-2 Zellen, in dem anderen die mit 4 U/ml konditionierten Zellen. Die ersten drei Spalten enthalten jeweils eine Verdünnungsreihe des rhuIL-2 in Triplets. Die Spalten 4-6 und 10-12 enthalten sowohl die Proben als auch die Negativkontrollen. In Zeile A befindet sich jeweils der native Überstand der COS-7 Zellen; in Zeile B der Überstand der nur mit Metafectene behandelten COS-7 Zellen. Zeilen C, D und F enthalten die Überstände der mit den Kontrollplasmiden (p55pCMV_ivs_luc+ und pBayMCS) transfizierten COS-7 Zellen. Die Zeilen E, G und H enhalten die Überstände der mit pBay-feIL-2 transfizierten Zellen.

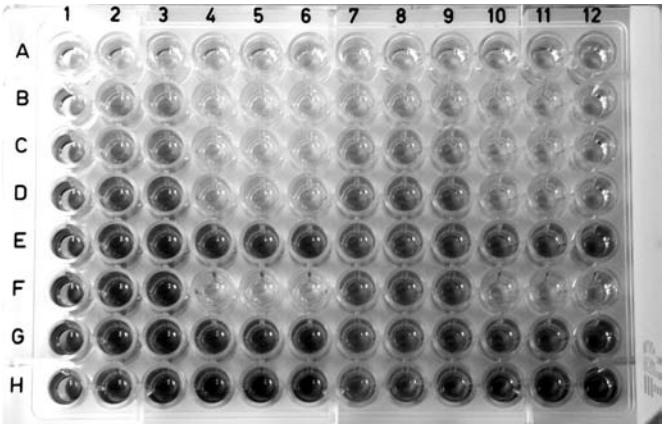


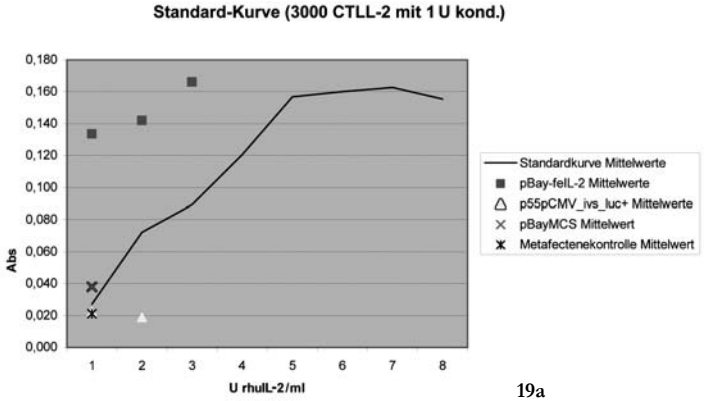
Abb. 18: Proliferationstest feIL-2
Mit MTT-Test ausgewerteter Proliferationstest. Die dunklen Kavitäten enhalten die aufgrund von IL-2 Zugabe proliferierten Zellen, welche viel Substrat in das Formazanprodukt umgesetzt haben. In den farblosen Kavitäten sind die CTLL-2 Zellen abgestorben, da kein IL-2 vorhanden war. (Belegung der Kavitäten siehe Tab. 18)

Der Aufbau sowie das Ergebnis des Proliferationstests sind in Tab. 18 und Abb. 18 dargestellt.

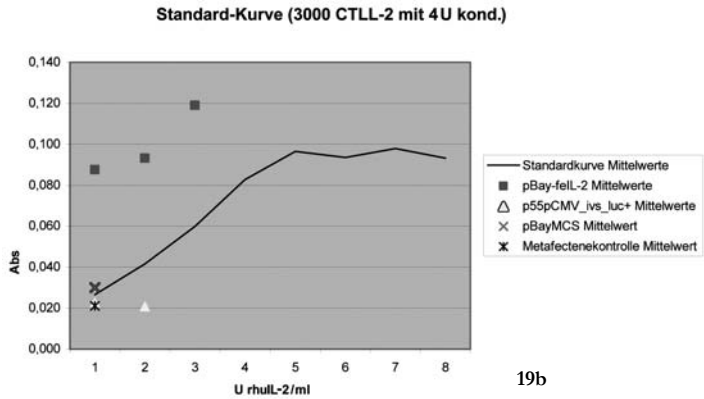
Als Positivkontrolle dient eine Verdünnungsreihe von rhuIL-2 mit einer Endkonzentration von 32 U/ml (in Triplets) (siehe Abb. 18 Spalten 1-3 und 7-9). Aus den Mittelwerten dieser jeweils drei gleichen rhuIL-2 Verdünnungsreihen kann eine Standardkurve erstellt werden.

Je mehr rhuIL-2 sich in den Kavitäten befindet, desto stärker ist die Proliferation der CTLL-2 Zellen und damit auch die metabolische Aktivität das Tetrazoliumsalz des MTT-Tests in das purpurne Formazanprodukt umzuwandeln. Die Farbe der Kavitäten ist also umso dunkler je mehr Proliferation stattgefunden hat und zeigt deshalb eine größere Absorption. Der Überstand der in ganz normalem Medium gewachsenen COS-7 Zellen (nativ) enthält kein IL-2, weshalb die Zellen sterben (z. B. Abb. 18 Kavität A4). Genauso verhält es sich mit der Metafectene-Kontrolle: Hier wurde bei der Transfektion nur das Transfektionsreagenz ohne Plasmid auf die COS-7 Zellen gegeben (z. B. Abb. 18 Kavität B4). Ebensowenig IL-2 Aktivität ist im Überstand der mit p55pCMV_ivs_luc+ (z. B. Abb. 18 Kavität C4) und dem Kontrollplasmid pBayMCS transfizierten COS-7 Zellen (z. B. Abb. 18 Kavität D4). Hingegen zeigen die CTLL-2

Zellen, welche mit dem Überstand aus pBayfeIL-2 transfizierten COS-7 Zellen zusammengegeben werden, eine starke Proliferation (z. B. Abb. 18 Kavität E4), was sich an der hohen Absorption erkennen lässt (siehe Abb. 19a und 19b). Der Überstand der feIL-2 exprimierenden COS-7 Zellen besitzt also eine hohe IL-2 Aktivität, wohingegen die Negativkontrollen keine CTLL-2 Proliferation bewirken.



19a



19b

Abb. 19a und 19b Standardkurven Proliferationstests feIL-2

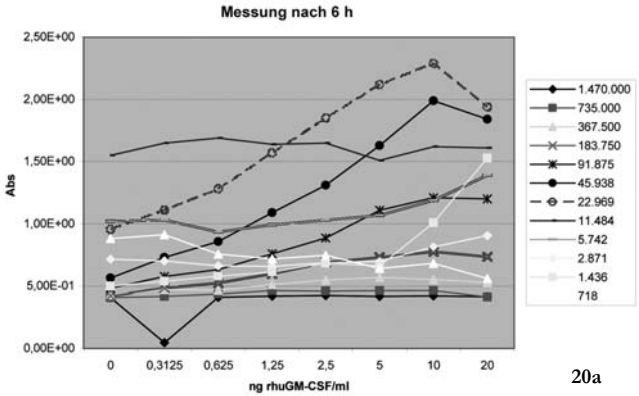
Messung der rhuIL-2 Aktivität auf CTLL-2 Zellen. Die Zellen (3.000/Kavität) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an rhuIL-2 (rekombinantes humanes Interleukin 2) inkubiert. Die Absorbtion (Abs.) steigt mit vermehrter Umsetzung des Substrates in das Formazanprodukt durch proliferierte Zellen. Die Kurve stellt die Standardkurve dar, die sich aufgrund der rhuIL-2 Verdünnungsreihe ergibt. Die Punkte stellen die Absorbtion der Kavitäten dar, welche mit dem Überstand der mit pBay-feIL-2 transfizierten Zellen inkubiert wurden, bzw. mit den Negativkontrollen. Die hohe Absorption zeigt eine vorhandene IL-2 Aktivität im Überstand der mit pBay-feIL-2 transfizierten Zellen, sowohl auf der mit 1 U/ml als auch auf der mit 4 U/ml konditionierten CTLL-2 Zelllinie. Die Absorption wird bei 550 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm im ELISA-*reader* gemessen (die genauen Absorptionswerte finden sich unter Kap. X 1).

Es können kleine Unterschiede zwischen den mit 1 U huIL-2/ml und 4 U huIL-2/ml konditionierten CTLL-2 Zellen im Proliferationstest festgestellt werden: Die Standardkurven der mit 1 U huIL-2/ml konditionierten Zellen zeigen als Reaktion auf die steigenden Konzentrationen huIL-2s eine stärkere Proliferation, welche sich in einer höheren Absorption äußert. Mit den Überständen der mit pBay-feIL-2 transfizierten Zellen verhält es sich genauso: Die Absorption der mit 1 U/ml konditionierten Zellen liegt bei den Proben höher als die der mit 4 U/ml konditionierten Zellen.

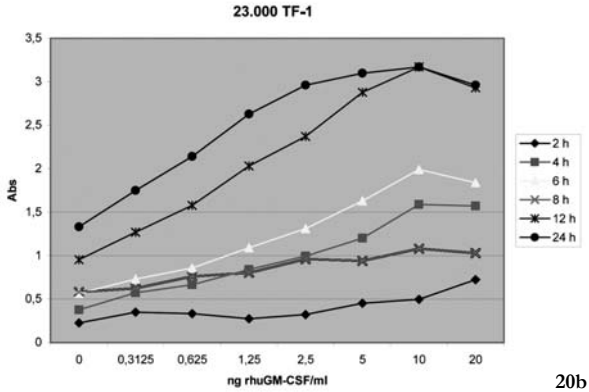
2.2 feGM-CSF

Der GM-CSF Bioassays stellt ebenfalls einen Proliferationstest dar, wobei das Wachstum von GM-CSF abhängigen TF-1 Zellen bestimmt wird.
Die Konzentration des beim XTT-Test entstehenden löslichen Formazanprodukts kann mehrmals photometrisch bestimmt werden, nicht nur einmal wie bei MTT-Test. Die gemessene Konzentration ist ebenfalls umso größer, je mehr Zellen metabolisch aktiv sind.

Aus dem Vorversuch ergeben sich ein optimale Zellzahl von ca. 20.000 Zellen/Kavität und ein optimaler Messzeitpunkt nach 6 h (siehe Abb. 20a und 20b).



20a



20b

Abb. 20a und 20b: Vorversuch zum Proliferationstest feGM-CSF

Abb. 20a zeigt den Effekt der unterschiedlichen Zellzahl auf die Absorption des Tests: Standardkurven aus Vorversuch: Aufgetragen werden Verdünnungsreihen von rhuGM-CSF kombiniert mit unterschiedlicher Zahl von TF-1 Zellen/Kavität. Als optimale Zellzahl ergeben sich ca. 20.000 Zellen/Kavität.

Abb. 20b zeigt den Effekt des Messzeitpunkts auf die Absorption des Tests: Standardkurven aus Vorversuch: Aufgetragen werden Verdünnungsreihen von rhuGM-CSF auf jeweils 23.000 Zellen/Kavität. Als opimaler Messzeitpunkt ergeben sich 6 h. Die Absorption wird bei 485 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm im ELISA-*reader* gemessen.

Der Aufbau sowie das Ergebnis des Proliferationstests sind in Tab. 19 und Abb. 21, 23a, 23b und Abb. 24 dargestellt.

Aus den Mittelwerten der jeweils gleichen rhuGM-CSF (Duplet) und rfeGM-CSF (Triplet) Verdünnungsreihen werden zwei Standardkurven erstellt (Abb. 21 Spalten 1-3 und Spalten 10 und 11). Je mehr rhuGM-CSF oder rfeGM-CSF zugegeben wird, desto stärker ist die Proliferation der TF-1 Zellen und damit auch die metabolische Aktivität das Tetrazoliumsalz in das purpurne Formazanprodukt umzuwandeln. Die Menge an eingesetztem rfeGM-CSF ist höher als die des rhuGM-CSF. Die biologische Wirkung des rhuGM-CSF auf die humanen Zellen ist größer als die des rfeGM-CSF (siehe Abb. 23a und 23b). Der Überstand der mit p55pCMV_ivs_luc+ transfizierten COS-7 Zellen enthält Luciferase, aber kein GM-CSF, weshalb die Zellen sterben (z. B. Abb. 21 Kavität A12 und Abb. 24). Die TF-1 Zellen, die mit dem Überstand aus pBayfeGM-CSF transfizierten COS-7 Zellen in Kontakt waren, zeigen eine starke Proliferation (z. B. Abb. 21 Kavität E4). Der Überstand der feGM-CSF exprimierenden COS-7 Zellen besitzt eine hohe GM-CSF Aktivität, wobei sogar Verdünnungen des Überstands von 1:128 noch eine starke Zellproliferation aufweisen (z. B. Abb. 21 Kavität A4).

Beim Hauptversuch wurden Messungen in regelmäßigen Abständen bis zu 24 Stunden durchgeführt. Im Gegensatz zum Vorversuch war hier die Messung nach 2 h der nach 6 h zu bevorzugen.

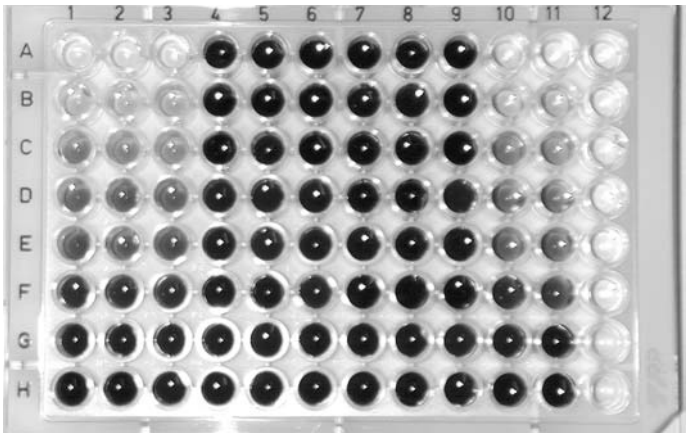


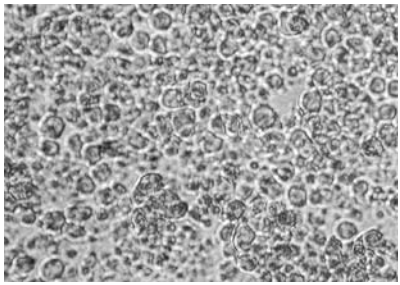
Abb. 21: Proliferationstest feGM-CSF

Mit XTT-Test ausgewerteter Proliferationstest. Die dunklen Kavitäten enthalten die aufgrund von GM-CSF Zugabe proliferierten Zellen, welche viel Substrat in das Formazanprodukt umgesetzt haben. In den farblosen Kavitäten sind die TF-1 Zellen abgestorben, da kein GM-CSF vorhanden war (Belegung der Kavitäten siehe Tab. 19).

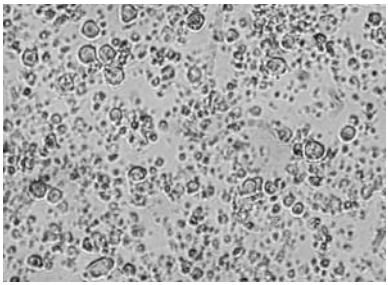
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 ng/ml rfeGM-CSF	0 ng/ml rfeGM-CSF	0 ng/ml rfeGM-CSF	1:128 pBay-feGM-CSF 1	1:128 pBay-feGM-CSF 1	1:128 pBay-feGM-CSF 1	1:128 pBay-feGM-CSF 2	1:128 pBay-feGM-CSF 2	1:128 pBay-feGM-CSF 2	0 ng/ml rhuGM-CSF	0 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
B	1,6 ng/ml rfeGM-CSF	1,6 ng/ml rfeGM-CSF	1,6 ng/ml rfeGM-CSF	1:64 pBay-feGM-CSF 1	1:64 pBay-feGM-CSF 1	1:64 pBay-feGM-CSF 1	1:64 pBay-feGM-CSF 2	1:64 pBay-feGM-CSF 2	1:64 pBay-feGM-CSF 2	0,31 ng/ml rhuGM-CSF	0,31 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
C	3,1 ng/ml rfeGM-CSF	3,1 ng/ml rfeGM-CSF	3,1 ng/ml rfeGM-CSF	1:32 pBay-feGM-CSF 1	1:32 pBay-feGM-CSF 1	1:32 pBay-feGM-CSF 1	1:32 pBay-feGM-CSF 2	1:32 pBay-feGM-CSF 2	1:32 pBay-feGM-CSF 2	0,63 ng/ml rhuGM-CSF	0,63 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
D	6,5 ng/ml rfeGM-CSF	6,5 ng/ml rfeGM-CSF	6,5 ng/ml rfeGM-CSF	1:16 pBay-feGM-CSF 1	1:16 pBay-feGM-CSF 1	1:16 pBay-feGM-CSF 1	1:16 pBay-feGM-CSF 2	1:16 pBay-feGM-CSF 2	1:16 pBay-feGM-CSF 2	1,25 ng/ml rhuGM-CSF	1,25 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
E	12,5 ng/ml rfeGM-CSF	12,5 ng/ml rfeGM-CSF	12,5 ng/ml rfeGM-CSF	1:8 pBay-feGM-CSF 1	1:8 pBay-feGM-CSF 1	1:8 pBay-feGM-CSF 1	1:8 pBay-feGM-CSF 2	1:8 pBay-feGM-CSF 2	1:8 pBay-feGM-CSF 2	2,5 ng/ml rhuGM-CSF	2,5 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
F	25 ng/ml rfeGM-CSF	25 ng/ml rfeGM-CSF	25 ng/ml rfeGM-CSF	1:4 pBay-feGM-CSF 1	1:4 pBay-feGM-CSF 1	1:4 pBay-feGM-CSF 1	1:4 pBay-feGM-CSF 2	1:4 pBay-feGM-CSF 2	1:4 pBay-feGM-CSF 2	5 ng/ml rhuGM-CSF	5 ng/ml rhuGM-CSF	p55pCMVluc
G	50 ng/ml rfeGM-CSF	50 ng/ml rfeGM-CSF	50 ng/ml rfeGM-CSF	1:2 pBay-feGM-CSF 1	1:2 pBay-feGM-CSF 1	1:2 pBay-feGM-CSF 1	1:2 pBay-feGM-CSF 2	1:2 pBay-feGM-CSF 2	1:2 pBay-feGM-CSF 2	10 ng/ml rhuGM-CSF	10 ng/ml rhuGM-CSF	
H	100 ng/ml rfeGM-CSF	100 ng/ml rfeGM-CSF	100 ng/ml rfeGM-CSF	1:1 pBay-feGM-CSF 1	1:1 pBay-feGM-CSF 1	1:1 pBay-feGM-CSF 1	1:1 pBay-feGM-CSF 2	1:1 pBay-feGM-CSF 2	1:1 pBay-feGM-CSF 2	20 ng/ml rhuGM-CSF	20 ng/ml rhuGM-CSF	

Tab. 19: Aufbau Proliferationstest feGM-CSF

Die ersten drei Spalten enthalten eine Verdünnungsreihe des rfeGM-CSF in Triplets, die Spalten 10 und 11 eine Verdünnugnsreihe von rhuGM-CSF in Dublets. Dazwischen sind von Spalte 4-9 Verdünnungsreihen der Überstände, der mit pBay-feGM-CSF transfizierten COS-7 Zellen. In Spalte 12 befinden sich mehrere Ansätze der Negativkontrolle: Überstände der mit p55pCMV_ivs_luc+ transfizierten COS-7 Zellen.



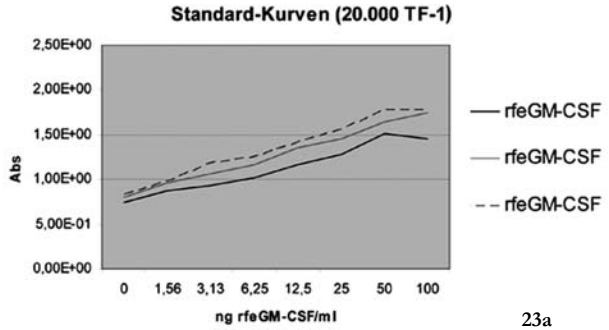
22a



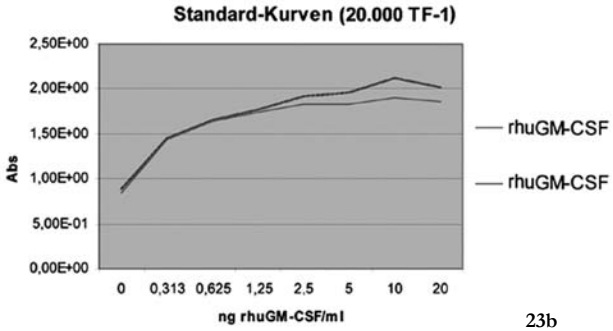
22b

Abb. 22a und 22b: Bilder von TF-1 Zellen

Abb. 22a zeigt lebende Zellen aus dem Proliferationstest, die mit feGM-CSF inkubiert wurden (Abb. 21 Kavität H1). Abb. 22b zeigt abgestorbene Zellen aus dem Proliferationstest, die nicht mit GM-CSF inkubiert wurden (Abb. 21 Kavität A12).



23a



23b

Abb. 23a und 23b: Standardkurven Proliferationstest feGM-CSF

Abb. 23a und 23b zeigen die Proliferation der TF-1 Zellen (20.000 Zellen/Kavität) als Antwort auf rekombinantes humanes und felines GM-CSF. Die Absorption (Abs.) steigt mit vermehrter Umsetzung des Substrates in das Formazanprodukt durch proliferierte Zellen. Die Kurven stellen die Standardkurven dar, die sich aufgrund der Verdünnungsreihen ergeben. Die Absorption wird bei 485 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm im ELISA-*reader* gemessen (die genauen Absorptionswerte finden sich unter Kap. X 2).

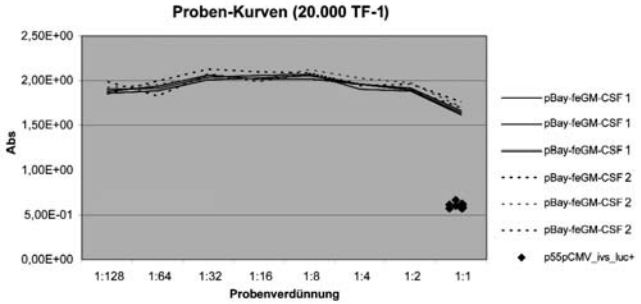


Abb. 24: Probenkurven Proliferationstest feGM-CSF

Abb. 24 zeigt die Proliferation der TF-1 Zellen (20.000 Zellen/Kavität) als Antwort auf die Überstände der COS-7 Zellen. Die Absorbtion (Abs.) steigt mit vermehrter Umsetzung des Substrates in das Formazanprodukt durch proliferierte Zellen. Die Kurven stellen die Probenkurven dar, die sich aufgrund der Verdünnungsreihen mit den Überständen, der mit pBay-feGM-CSF transfizierten COS-7 Zellen ergeben. Überstände der mit pBay-feGM-CSF transfizierten Zellen zeigen biologische Aktivität. TF-1 Zellen, die mit Überständen der mit p55pCMV_ivs_luc+ transfizierten COS-7 Zellen inkubiert wurden (Negativkontrollen) zeigen keine biologische Aktivität (schwarze Rauten im Diagramm).

Die Absorption wird bei 485 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm im ELISA-*reader* gemessen (die genauen Absorptionswerte finden sich unter Kap. X 2).

2.3 feIFNγ

2.3.1 MHC-Induktionstest mit felinen Fibrosarkomzellen

Vorversuch 1: Morphologie der felinen Fibrosarkomzellen

Im Streuungsdiagramm wird durch die Vorwärtsstreuung die Größe und durch die Seitwärtsstreuung die Komplexität der Zellen bestimmt. Fibrosarkomzellen sind große Zellen von unterschiedlicher Komplexität (siehe Abb. 25).

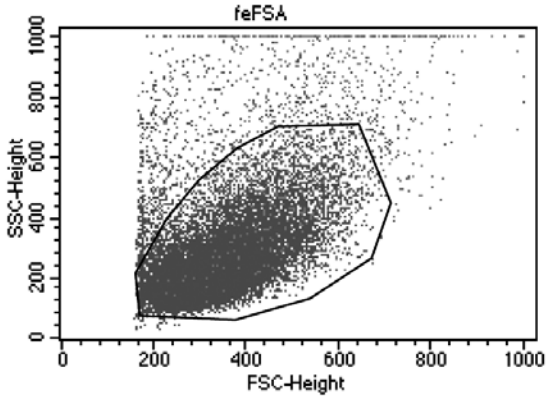


Abb. 25: Streuungsdiagramm feliner Fibrosarkomzellen
Streulicht-Messergebnisse im *dot plot*: Dieses Diagramm, in dem das Seitwärtsstreulicht (SSC-Height) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC-Height) aufgetragen ist, stellt die Morphologie der FSA-Zellen dar. Über das Seitwärtsstreulicht wird die Komplexität und über das Vorwärtsstreulicht die Größe der Zellen reflektiert. Jeder Punkt stellt ein Messereignis dar, d. h. eine Zelle. Man erkennt eine Anhäufung von Zellen, die ähnliche Struktureigenschaften haben. Durch die Auswahl einer Region aus dem Streulichtdiagramm, werden die Zellen *gegatet*, d. h. es werden die Zellen ausgewählt, welche für die Auswertung interessant sind.

Vorversuch 2: Biologische Aktivität von rekombinantem feIFNγ

Die felinen Fibrosarkomzellen werden mit der Fluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer auf das Vorliegen von MHC I- und MHC II-Oberflächenantigene untersucht. Im Vorversuch wird geklärt, ob rfeIFNγ einen Einfluss auf die MHC-Molekülexpression auf Fibrosarkomzellen hat (siehe Abb. 26).

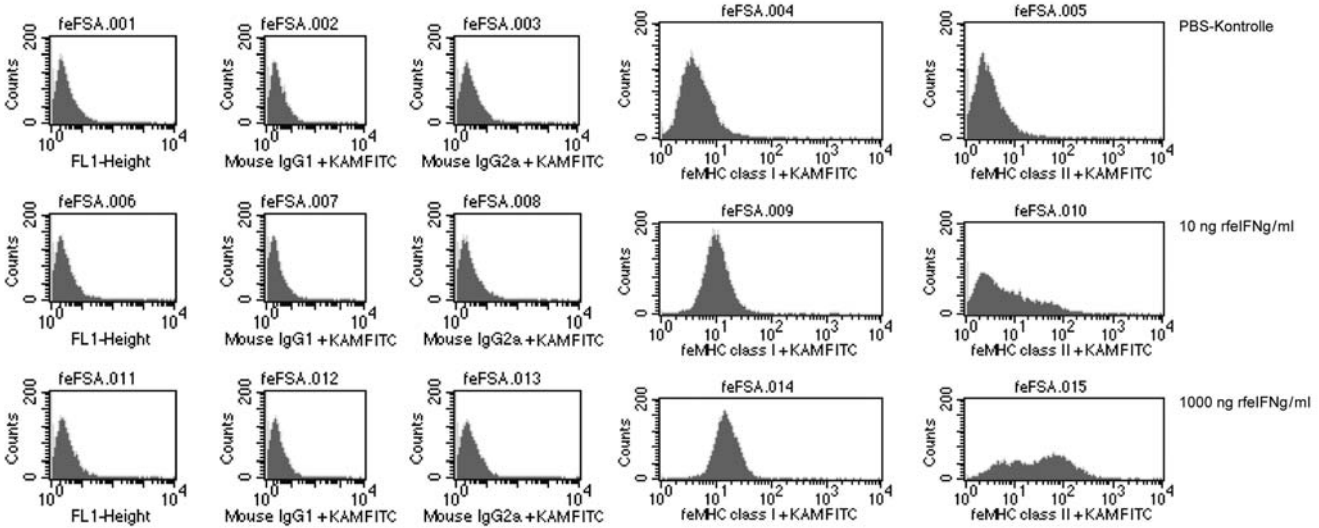


Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse einer rfeINFγ-induzierten MHC Expression auf felinen Fibrosarkomzellen

dot Histogramme: Die Häufigkeit pro Intensitätsstufe auf der y-Achse (*counts*) ist gegen die Fluoreszenzintensität auf x-Achse FL-1 (FL-1 Height) aufgetragen.

Die erste Spalte zeigt die Kontrolle ohne Primärantikörper, die zweite und dritte Spalte die Isotypkontrollen mit Maus IgG1 und Maus IgG2a. Sie zeigen bei den drei Ansätzen den gleicher *peak* (PBS-Kontrolle (*phosphate buffered saline*, ohne IFNγ), mit 10 ng und mit 1000 ng IFNγ). In der vierten Spalte sieht man bei der Markierung mit dem MHC I-Antikörper bei IFNγ-Zugabe im Gegensatz zur PBS-Kontrolle eine deutliche Verschiebung des *peaks* nach rechts, d. h. eine gesteigerte MHC I-Expression auf den felinen FSA-Zellen. Die fünfte Spalte zeigt bei Markierung mit dem MHC II-Antikörper ebenfalls eine Expressionssteigerung, wobei der *peak* hier breiter und flacher ist.

feFSA = feline Fibrosarkomzellen

KAMFITC = markierter Sekundärantikörper

Die Fluoreszenzanalyse mit MHC I und MHC II als Oberflächenmarker zeigt eine deutlich gesteigerte Expression der beiden Moleküle im Gegensatz zu normalen FSA-Zellen, die nicht mit IFNγ stimuliert wurden. Felines IFNγ kann also auf felinen Fibrosarkomzellen sowohl die MHC I- als auch die MHC II-Expression hochregulieren.

Hauptversuch

Ziel des Hauptversuchs ist es, die biologische Aktivität des klonierten feIFNγ zu zeigen. Die Fibrosarkomzellen werden mit dem, das Protein enthaltenden Überstand der mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen inkubiert (siehe Abb. 27).

Einer Inkubation der Zellen mit dem Überstand der pBay-feIFNγ transfizierten Zellen folgend, stellt man eine deutliche Hochregulation der MHC I- und MHC II-Expression verglichen mit der Negativkontrolle (Inkubation mit nativem COS-7 Überstand) fest, wobei die Inkubation mit 90 % Überstand gegenüber der mit 10 % Überstand die Expression sowohl von MHC I als auch von MHC II noch steigern kann.

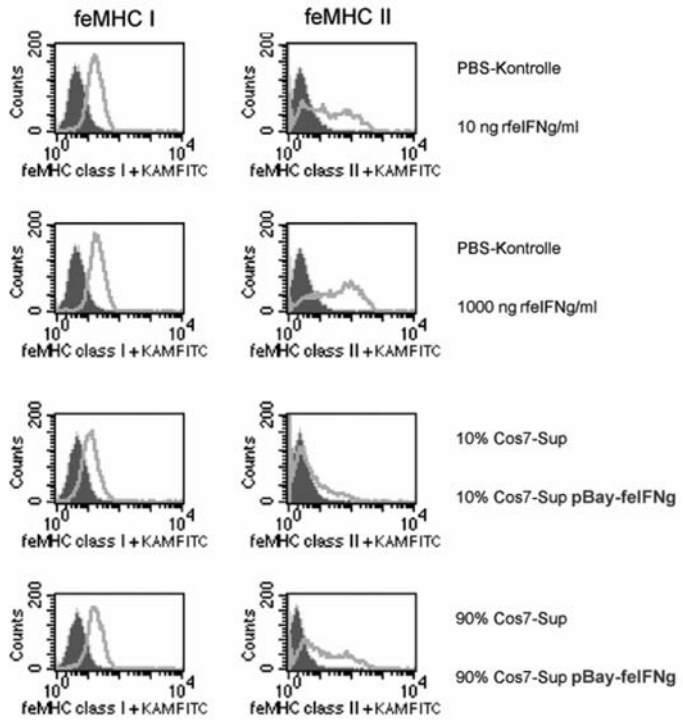


Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse: MHC I- und MHC II-Expression nach Kultivierung von felinen Fibrosarkomzellen im Überstand pBay-feIFNγ-transfizierter COS-7 Zellen

Reihen 1 und 2 zeigen eine Vergleichsdarstellung der Expression von MHC I und MHC II auf felinen Fibrosarkomzellen der Negativkontrolle mit PBS und der Expression auf mit 10 bzw. 1000 ng rfeIFNγ/ml inkubierten Zellen. Sowohl bei der MHC I- als auch bei der MHC II-Expression ist eine deutliche Verschiebung des *peaks* nach rechts zu erkennen, welche sich im Vergleich nach Inkubation mit 1000 ng/ml rfeIFNγ noch verstärkt. Reihen 3 und 4 zeigen eine Vergleichsdarstellung der Expression von MHC I und MHC II auf felinen Fibrosarkomzellen, die mit dem nativen Überstand nicht-transfizierter, COS-7 Zellen inkubiert wurden (COS-7 Sup) und feline Fiborakomzellen, die mit dem Überstand pBay-feIFNγ transfizierter COS-7 Zellen inkubiert wurden (COS-7 Sup pBay-feIFNγ). Im Gegensatz zur Negativkontrolle (nativer COS-7 Überstand) zeigen die Fibrosarkomzellen nach Inkubation mit dem in dieser Arbeit klonierten IFNγ (Überstand pBay-feIFNγ transfizierter COS-7 Zellen) eine deutlich verstärke MHC I- und MHC II-Expression. Die Inkubation mit 90 % Überstand kann gegenüber der mit 10 % Überstand die Expression von MHC I und MHC II noch steigern.
Sup = Überstand

2.3.2 MHC-Induktionstest mit PBMCs

Vorversuch 1: Morphologie der felinen PBMCs

Die felinen PBMCs stellen sich durchflusszytometrisch in verschiedenen Gruppen dar: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Abb. 28).

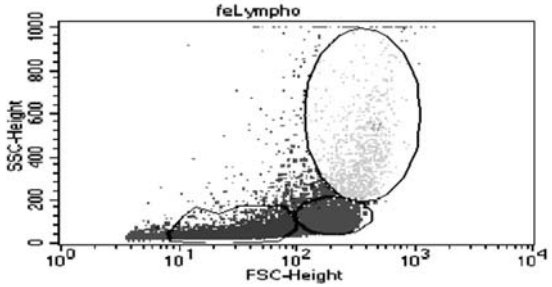


Abb. 28: Streuungsdiagramm feliner PBMCs
Streulicht-Messergebnisse im *dot plot*: Das Seitwärtsstreulicht (SSC-Height) ist gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC-Height) aufgetragen. Die links untern markierte Gruppe von Zellen stellt die Lymphozyten dar, kleinere Zellen mit geringerer Granularität, die mittlere markierte Gruppe die Monozyten und oben liegende größere Gruppe die Granulozyten, größere Zellen mit stärkerer Granularität. Durch die Auswahl der Region aus dem Streulichtdiagramm, können die verschiedenen Zelltypen der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) *gegatet* werden, d. h. es können die Zellen ausgewählt werden, die für die Auswertung interessant sind.

Vorversuch 2: Biologische Aktivität von rekombinantem feIFNγ

Auf felinen PBMCs (ohne und mit Vorstimulation durch ConA) kann für IFNγ keine immunmodulierende Wirkung auf die MHC I- und MHC II-Molekülexpression nachgewiesen werden. Es werden analog zu Kap. III B 2.3.1 durchflusszytometrische Messungen mit felinen peripheren mononukleären Blutzellen durchgeführt. Zur Stimulation eingesetzt werden verschiedene Konzentrationen an rfeIFNγ (Abb. 29, dargestellt sind nur die Endergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der mit rfeIFNγ inkubierten, ohne ConA vorstimulierten PBMCs)

Hauptversuch

Auch bei Inkubation der PMBCs mit verschiedenen Konzentrationen des Überstands der mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen kann sowohl bei nativen als auch bei mit ConA vorstimulierten PBMCs keine Steigerung der MHC I- und MHC II-Expression festgestellt werden (Abb. 29, dargestellt sind nur die Endergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der mit dem Überstand von mit pBay-feIFNγ transfizierten COS-7 Zellen inkubierten, ohne ConA vorstimulierten felinen PBMCs).

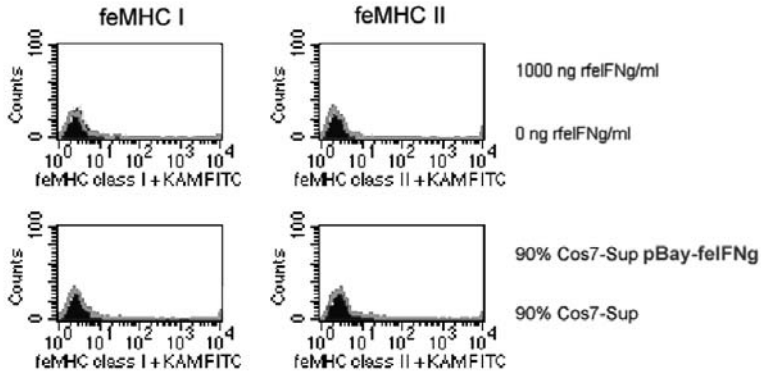


Abb. 29: Durchflusszytometrische Analyse: MHC I- und MHC II-Expression nach Kultivierung von PBMCs mit rfeIFNγ oder mit dem Überstand pBay-feIFNγ-transfizierter COS-7 Zellen

Reihe 1 zeigt die Vergleichsdarstellung der Expression von MHC I und MHC II auf felinen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), welche mit 0 bzw. 1000 ng rfeIFNγ/ml inkubiert wurden (grauer bzw. schwarzer *peak*). Es ist keine Hochregulierung der MHC I- und MHC II-Expression durch rfeIFNγ zu erkennen.

Reihe 2 zeigt die Vergleichsdarstellung der Expression von MHC I und MHC II auf PBMC, die mit dem Überstand nicht-transfizierter COS-7 Zellen (grauer *peak*) oder mit dem Überstand pBay-feIFNγ transfizierter COS-7 Zellen (schwarzer *peak*) inkubiert wurden . Es ist kein Unterschied zwischen der Negativkontrolle (nativer COS-7 Überstand) und den mit 90 % Überstand (pBay-feIFNγ transfizierter COS-7 Zellen) inkubierten PBMCs zu erkennen. Die in dieser Analyse genutzten felinen PBMCs waren nicht mit Concanavalin A vorstimuliert.

Sup = Überstand

3 Schwammbeschichtung

Da sich die Proteine aller drei klonierten Zytokin-Gene als biologisch aktiv erwiesen haben, wird in Folge der Kollagenschwamm mit der PEI-PROCOP-Formulierung der Plasmid-DNA nach beschriebener Methode beschichtet (siehe Kap. III A 3) (Abb. 30) und kommt in einer Phase I-Studie zum klinischen Einsatz (165).

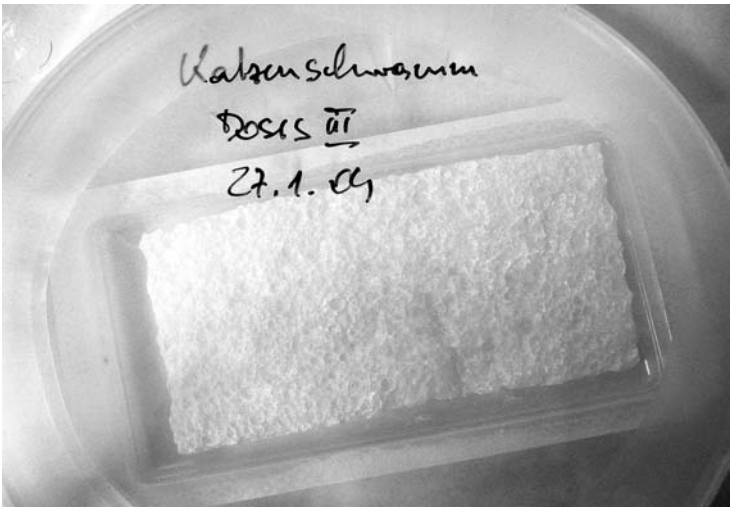


Abb. 30: Mit Plasmid-DNA beschichteter Kollagenschwamm
Das steril in einer mit Parafilm verschlossenen Petrischale verpackte Gentherapeutikum kann bis zum Einsatz in der klinischen Studie bei 4 °C gelagert werden. Der Schwamm wird nach *en-bloc* Exstirpation des Fibrosarkoms in das Tumorbett der Katze implantiert.

IV Diskussion

1 Arbeitsverlauf

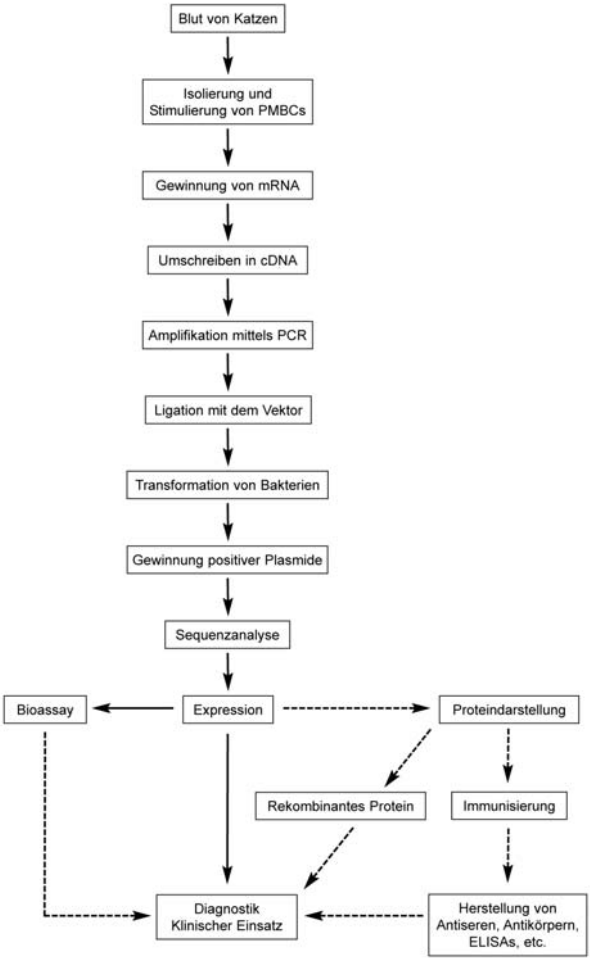


Abb. 31: Arbeitsverlauf

Überblick über den Arbeitsverlauf. Gestrichelte Pfeile verdeutlichen dabei noch ausstehende Versuche, um nicht nur den Einsatz der Genvektoren in der Gentherapie zu ermöglichen, sondern auch die rekombinanten Proteine in verschiedenen Bereichen nutzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei cDNAs, die für feline Zytokine kodieren, in einen Expressionsvektor kloniert und die von einer eukaryotischen Zelllinie exprimierten Proteine in unterschiedlichen Bioassays auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht (siehe Abb. 31).

Die Klonierung und Sequenzierung der felinen Zytokin-Gene schafft die Möglichkeit diese auch zu exprimieren. Eine biochemische Charakterisierung der Proteine wäre so möglich. Des Weiteren könnten Untersuchungen am felinen Immunsystem mit diesen speziesspezifischen Zytokinen durchgeführt werden. Mit entsprechenden Antikörpern und ELISAs etc. könnte nun die Funktion dieser Zytokine im Netzwerk immunologischer Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, genauer untersucht werden. Von besonderem Interesse wäre hierbei, in Bezug auf die adjuvante Gentherapie des Fibrosarkoms, das immunologische Monitoring der Studien (siehe auch 225).
Die Entwicklung immunologischer *in vitro* Assays speziell für feline Zytokine könnte genutzt werden um auch eventuelle Wirkungsunterschiede der felinen Zytokine im Vergleich zu anderen Tierarten oder dem Menschen aufzuspüren.
Aber auch die Rolle der Zytokine bei anderen Erkrankungen, wie FIP oder FeLV, wo je nach Krankheitsverlauf unterschiedliche Zytokinmuster bzw. eine Dysregulation der Zytokinproduktion vermutet werden (319), könnte erforscht werden. Vielleicht läßt sich auch bei felinen Tumoren, ähnlich dem oralen Melanom des Hundes, eine mangelnde Aktivierung des Immunsystems nachweisen, wie sie aufgrund der übermäßigen Expression von immunsuppressiven Zytokinen vermutet wird (38) (siehe auch Kap. II 2.1). Nach entsprechenden Studien könnten rekombinante Proteine dieser Zytokine eventuell sogar therapeutisch angewandt werden, wie es derzeit beim felinen Interferon omega (Virbagen omega®) der Fall ist.

Auch beim Einsatz der Vektoren in der Gentherapie sind verschiedene Ansätze denkbar. Neben dem postoperativen Gentransfer mittels Kollagenschwamm könnten die drei Zytokin-Gene entweder zusammen oder auch einzeln präoperativ intratumoral injiziert werden und mittels Magnetofektion oder anderer Verfahren lokal an den gewünschten Zielzellen konzentriert werden. Auch eine Kombination beider Methoden ist möglich, so dass die Katzen sowohl präoperativ die Vektoren intratumoral erhalten, als auch die auf dem Kollagenschwamm befindlichen Zytokin-Gene ihre Wirkung postoperativ entwickeln.

2 Speziesspezifische Zytokine

Eine Änderung in Bezug auf die vorausgegangenen Gentherapiestudien des felinen Fibrosarkoms (173, 184, 192, 286, 337, 338) ist die Verwendung von speziesspezifischem IL-2 und GM-CSF.

Die Verwendung des humanen IL-2 führt - dies konnte im Rahmen des immunologischen Monitorings der schon beendeten Studien nachgewiesen werden - nach einigen Tagen dazu, dass die Katzen neutralisierende Antikörper gegen das fremde Protein bilden (225). Solche Antikörper können unter Umständen den therapeutischen Nutzen der Proteine blockieren und sich außerdem theoretisch gegen das entsprechende endogene Protein des Tierpatienten richten und so den Krankheitsverlauf noch verschärfen (4). Die in bislang durchgeführten Studien behandelten Katzen zeigten klinisch keinerlei Hinweise auf eine Neutralisierung des katzeneigenen IL-2, was sich in einer allgemeinen Immunsuppression der Katzen hätte äußern müssen. Aufgrund der geringen Patientenzahl dieser Studien, kann jedoch weder das Risiko der Entwicklung neutralisierender Antikörper noch deren klinische Relevanz mit letzter Sicherheit abgeschätzt werden. Auch fehlen noch Daten bezüglich Kreuzreaktion und Neutralisierung des feIL-2 durch die anti-huIL-2 Antikörper (225).
Der Einsatz von felinen Zytokin-Genen ist in diesem Fall von Vorteil, da das Problem der Antikörperbildung nicht auftritt. Die eingebrachten Gensequenzen werden von Zellen der Katze in die entsprechende Aminosäurensequenz übersetzt und dieses Protein anschließend posttranslational modifiziert, so dass keine Abweichungen in der Faltung zu erwarten sind.
Wenn eine Antikörperbildung ausbleibt, spricht auch nichts gegen einen mehrmaligen gentherapeutischen Einsatz der gleichen Zytokin-Gene.

Bezüglich der Verwendung rekombinanter speziesspezifischer Zytokine *in vivo*, ist bei dieser Applikationsform im Gegensatz zum Gentransfer sehr wohl eine Antikörperproduktion möglich. Die hier zu beobachtende Antigenität beruht jedoch auf der Sekundärstruktur der Proteine (siehe auch Kap. IV 7).

Die speziesspezifische Aktivität von Zytokinen ist neben der Antikörperbildung ein weiterer zu berücksichtigender Punkt. IFNγ, welches als strikt speziesspezifisch gilt (119, 276), wurde aus diesem Grund in den vorausgegangenen Studien nie als humanes

sondern immer nur als felines Gen eingesetzt (192, 286, 337, 338).
Das entsprechende humane Protein muss nicht unbedingt die vollständige Wirkungsweise des felinen Zytokins widerspiegeln. Cozzi *et al.* können zeigen, dass der biologische Effekt von rhuIL-2 auf feline PBMCs geringer ausfällt als der von rfeIL-2 in gleicher Dosierung (60).
Auch bei GM-CSF wird die Speziesspezifität diskutiert. Während Metcalf *et al.* eine strikt speziesspezifische Wirkung vermuten (214), können andere Autoren eine biologische Wirkung von rhuGM-CSF auf feline Zellen zeigen (4, 80). Allerdings zeigt rhuGM-CSF nur einen limitierten Effekt auf feline Knochenmark-Progenitorzellen *in vitro* (80). An FIV- und SPF-Katzen verabreicht, erreichen Arai *et al.* ebenfalls nur einen sehr moderaten Effekt (4) (siehe Kap. II 4.2). Sowohl in der vorliegenden Arbeit, als auch in einer weiteren Arbeit (80), kann gezeigt werden, dass feGM-CSF auf humanen TF-1 Zellen biologische Aktivität besitzt. Vergleicht man jedoch die Standardkurve von rhuGM-CSF mit der von rfeGM-CSF fällt die Absorption beim rfeGM-CSF trotz der ca. 5-fachen eingesetzten Menge deutlich geringer aus (siehe Abb. 23a und 23b in Kap. III B 2.2).

Ein weiterer wichtiger Grund für den Einsatz feliner Zytokin-Gene in der Katze ist die Übertragbarkeit auf den Menschen, da bei der Tumor-Gentherapie des Menschen auch speziesspezifische humane Zytokin-Gene eingesetzt werden.

3 Tumormodell

Das Fibrosarkom der Katze ist ein lokal hoch aggressiver Tumor mit geringem metastatischem Potential, so dass das Rezidiv die klinisch signifikante Hürde darstellt, welche zu überwinden ist. Sowohl das spontane Auftreten, beeinflusst von den gleichen umweltbedingten Carcinogenesefaktoren, die biologischen Parameter als auch die Ausführung der Behandlungsmodalitäten unter ähnlichen Klinikkonditionen erlauben eine Übertragung der Ergebnisse von der Katze auf den Menschen; besser als dies von der Maus oder anderen experimentellen Systemen möglich wäre. Auch lassen sich Haustiertumoren in Bezug auf Größe und Zellkinetik besser mit humanen Tumoren vergleichen als Nagertumormodelle (325).

Das feline Fibrosarkom stellt ein relevantes Modell für die therapeutische

Vorgehensweise beim humanen STS (*soft tissue sarcoma*) dar, da beide Tumoren in ähnlicher Art und Weise auf konventionelle Chemotherapie, Bestrahlung oder Chirurgie reagieren (199, 211, 325). Sowohl beim STS als auch bei anderen soliden Tumoren mit Rezidivproblematik wäre der Einsatz eines mit Genvektoren beschichteten Kollagenschwamms denkbar. So könnte diese Art der Gentherapie auch beim Prostatakarzinom, Mammakarzinom oder Ovarialkarzinom des Menschen zur Verhinderung eines lokalen Rezidivs beitragen.
Das feline Fibrosarkom wird bereits in einigen experimentellen und klinischen Studien für die Evaluierung von Tumor-Gentherapien genutzt (siehe Kap. II 1 und II 2.1).

Nachteile des Haustiertumormodells "felines Fibrosarkom" sind allerdings trotz des Fortschritts molekularer Techniken immer noch die teilweise fehlenden speziesspezifischen "Werkzeuge" für weitergehende Untersuchungen, Diagnostik und therapeutischen Gebrauch: wie z. B. ELISAs, Antikörper oder auch rekombinante Proteine. Mit der Klonierung der drei felinen Zytokin-Gene in dieser Arbeit ist ein zusätzlicher Schritt in diese Richtung getan, weitere Arbeiten werden dazu beitragen, die Proteine zu charakterisieren, poly- und monoklonale Antikörper herzustellen und daraus wiederum ELISAs zu etablieren (siehe auch 165), die ein verfeinertes immunologisches Monitoring der Gentherapiestudien ermöglichen würden (siehe auch Kap. IV 1).
Neben den Ergebnissen, welche die Studie für die Humanmedizin liefert, ist dieser gentherapeutische Ansatz natürlich auch von großer Bedeutung für die Tiermedizin eine erfolgversprechende Behandlungmöglichkeit für das feline Fibrosarkom zu finden.

4 Nonviraler Gentransfer mit Kollagenschwamm

Neben der Verwendung speziesspezifischer Zytokin-Gene ist ein weiterer Vorteil gegenüber den bisherigen Studien die Applikationsart der Gene. Der Kollagenschwamm als Trägermaterial von Genvektoren besitzt, verglichen mit den in vorausgegangenen Studien angewandten adenoviralen Vektoren (192, 286, 337, 338), eine größere Praxisrelevanz und garantiert eine einfachere Handhabung des Gentransfers: Der Schwamm wird *intra operationem* nach der Tumorexstirpation ins Tumorbett eingelegt. Diese Applikation würde die Anwendung durch jeden praktischen Tierarzt ermöglichen. Auch für die Katze ist diese Methode schonender, da die Injektionen in den Tumor und ins Operationsgebiet entfallen. Auch eine mögliche Verschleppung der Tumorzellen

durch eine intratumorale Injektion wird verhindert. Und gerade im Hinblick auf die Ätiopathogenese des felinen Fibrosarkoms sollten Injektionen wohlüberlegt eingesetzt werden. Auch unter dem Aspekt, dass es sich bei den betroffenen Katzen um Tiere mit einer Prädisposition handeln könnte, die auf Injektionen erneut mit einer chronischen Entzündung und nachfolgend mit einem Fibrosarkom reagieren könnten (siehe auch Kap. IV 4.1).
Der nonvirale Gentransfer hat gegenüber der adenoviralen Gentherapie weitere große Vorteile: Durch den Einsatz von rekombinanten viralen Vektoren kommt es in den Katzen zur Bildung von anti-adenoviralen Antikörpern, die möglicherweise den therapeutischen Effekt limitieren können (225). Darüber hinaus bedeutet die Verwendung viraler Vektoren einen größeren organisatorischen Aufwand - nach dem Gentechnikgesetz ist ein S2-Labor zur Lagerung und ein S1-Raum zur Anwendung nötig - dies entfällt bei der geplanten Studie.

Nachteile des nonviralen Gentransfers mittels Kollagenschwamm sind sicherlich die geringere Effektivität des Gentransfers verglichen mit der adenoviralen Gentherapie.

4.1 Eingesetzter Kollagenschwamm

Aufgrund vorangegangener Arbeiten in denen der Kollagenschwamm in experimentellen Tiermodellen eine gute Biokompatibilität zeigt (283, 287, 333), kommt er auch in dieser Studie zum Einsatz. Durch die lockere Struktur und das Einsprossen der Zellen entlang der Kollagenfasern ins Innere des Schwamms stellt er sich als geeignet heraus (283).
Das histologische Bild des Kollagenschwamms in Maus und Ratte zeigt eine geringgradige Entzündungsreaktion (283, 287). Trotz der beschriebenen sehr guten Biokompatibilität des Kollagens finden sich mehrkernige Fremdkörper-Riesenzellen, welche auf eine konsekutive Entzündung aufgrund eines Fremdkörperreizes durch den Kollagenschwamm hinweisen (283). Dies bewirkt einerseits eine verstärkte Immunantwort, welche zusammen mit der Entzündung sogar von Vorteil für eine gute Genexpression sein kann (283). Andererseits sollte man die Ätiologie und Pathogenese des felinen Fibrosarkoms nicht außer Acht lassen, da hier eine granulomatöse Entzündung in Kombination mit anderen Faktoren als primärer Auslöser dieser Malignität gilt (167) (siehe auch Kap. IV 4.2).

4.2 Schwammbeschichtung

Plasmidherstellung

Die Herstellung der Plasmid-DNA in den benötigten Mengen übernimmt die Firma Plasmid Factory, Bielefeld. Es soll sichergestellt werden, dass eine einzige Charge in den Katzen zum Einsatz kommt. Bei mehreren Plasmidpräparationen hätten Varianzen der einzelnen Chargen auftreten können. Zudem wird die DNA unter standardisierten, internationalen Methoden, mit standardisierten Produktionsabläufen hergestellt. Da mit synthetischen Medien gearbeitet wird, kommte es zu einem höheren Aufreinigungsgrad und zu einer geringeren Kontamination, wie z. B. mit Lipopolysacchariden, bakterieller genomischer DNA oder auch Proteinen. Diese könnten nämlich unter Umständen in der Katze zu Entzündungen führen, was wiederum aufgrund der Ätiopathogenese des felinen Fibrosarkoms bedenklich wäre. Auch wird die strukturelle Homogenität sichergestellt, d. h. nur das zirkuläre, spiralisierte Monomer des Plasmids ist in der Präparation vorhanden. Bei einer linearen Form des Plasmids wäre eventuell eine Integration ins Genom möglich.

PEI-PROCOP

In einer vorausgegangenen Arbeit wird reportergentragende pDNA sowohl alleine, in Kombination mit PEI als auch in Kombination mit PEI und PROPCOPs auf Kollagenschwämmen *in vitro* und *in vivo* getestet (283). Dabei stellt sich der Gentransfer mit einer pDNA-PEI-PROCOP-Kombination auf dem Kollagenschwamm als am effektivsten heraus, weshalb sowohl die Methoden der Komplexherstellung als auch der Schwammbestückung analog durchgeführt werden.

Schwammbeschichtung

Bei der Schwammbeschichtung finden alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank statt, d. h. sobald der Kollagenschwamm aus der sterilen Originalverpackung entnommen ist, muss durch sorgfältiges Arbeiten die Sterilität des beschichteten Kollagenschwamms absolut gewahrt werden. Die Petrischale, in welcher der Schwamm verwahrt wird, wird möglichst luftdicht abgeschlossen. Auch die Luft, die zur Aufhebung des Vakuums in den Lyophilisator gelangt wird über einen virendichten Filter zugeführt. Ein nicht steriler Schwamm kann unter Umständen nach Applikation in die Katze zu Entzündungsreaktionen führen. Bei der folgenden Phase II-Studie müssen diese Schritte der Schwammbeschichtung medizintechnisch optimiert werden um eine 100%ige

Sterilität zu garantieren.

Die Zytokin-Gen-Dosis auf dem Schwamm wird für die geplante Phase I-Studie aus vorausgegangenen Studien abgeleitet (283, 333) und so angesetzt, dass zunächst bei der ersten Dosis keine Nebenwirkungen zu erwarten sind (vgl. auch 165).
Sollten jedoch, wider Erwarten, Nebenwirkungen aufgrund zu hohen lokalen Zytokin-Gentransfers mit so genanntem *dose dumping*, d. h. Diffusion der rekombinanten Proteine vom Ort des Gentransfers in den Blutstrom (24), auftreten, kann der Kollagenschwamm jederzeit chirurgisch entfernt werden (241). Auch bei lokalen überschießenden Entzündungsreaktionen wäre dies möglich.
Das Auftreten von Nebenwirkungen durch Zytokin-DNA-Abschwemmung kann aufgrund der hohen Effizienz des DNA-Katabolismus im Blut als auch durch die niedrige Transfektionseffizienz in anderen Geweben fast ausgeschlossen werden (24).

5 Plasmid

Das Plasmid p55pCMV_ivs_luc+ wurde bereits bei experimentellen gentherapeutischen Einsätzen, sowohl in der Zellkultur, als auch *in vivo* bei den Versuchstieren Maus und Ratte verwendet (283, 333). Auch in klinischen Gentherapiestudien wird das Plasmid, huGM-CSF enthaltend, bei Katzen eingesetzt (284) (siehe Kap. II 1).

Der Promoter des Plasmids, hCMV (Promotor aus dem Genom des humanen Cytomegalievirus) ist ein starker viraler Promotor (264, 267). Als konstitutiver Promotor, d. h. als Promotor, welcher in fast jedem Gewebe zu hoher Genexpression führt, soll hCMV als Standardgentherapie-Vektor eine gute Wahl für den Einsatz in der Tumor-Gentherapie sein (269). Er erreicht hohe Expressionslevel *in vivo*, wobei diese jedoch nur transient sind (264, 267). Dafür verantwortlich ist vielleicht die Abschwächung der Promotoraktivität, speziell im inflammatorischen Milieu, so auch in der Tumorumgebung (264). Es ist bekannt, dass Zytokin-mediierte Signale Einfluss auf die Promotoraktivität haben können (252, 264). So hat IFNγ einen negativen regulatorischen Effekt auf virale Promotor (129, 252, 264). Da IFNγ durch Inhibition auf mRNA-Level in verschiedensten Zelllinien die CMV-Promotor abhängige Transgenexpression hemmt, ist dieser Promotor vielleicht nicht die optimale Wahl für einen Zytokin-Gentransfer (129, 252).

Im Fall des Zytokin-Gen-beladenen Kollagenschwamms könnte also die primäre Interferonexpression durch Inhibition des hCMV Promotors zu einer niedrigeren sekundären Expression sowohl der anderen beiden Zytokine als auch des Interferons selbst führen.
Allerdings werden diese Ergebnisse auch kontrovers diskutiert und es ist sicher, dass die Aktivität eines Promotors stark von verschiedensten Faktoren abhängig ist, wie z. B. vom transfizierten Zelltyp, vom Zytokin-Milieu, etc. (264). Sollte sich *in vitro* in Versuchen mit dem beladenen Kollagenschwamm herausstellen, dass IFNγ die Expression der Zytokine hemmt, könnte als Alternative die Verwendung eines Säuger Promotors, wie z. B. dem für das MHC I-Gen (129) oder des zellulären Promotors ß-Actin (252) angedacht werden.

Das *backbone* des Plasmids enthält, wie andere Standardplasmide auch, unmethylierte CpG Motive (wie in mikrobieller und viraler DNA), welche im Sinne einer Lymphozytenaktivierung immunstimulierend wirken können (21, 24, 176). Dies stellt jedoch für die Wirksamkeit der Therapie kaum einen Nachteil dar.
Bei einer Studie am murinen B16F10-Melanom Tiermodell konnte sowohl durch einen mit dem Kontrollplasmid p55pCMV_ivs als auch durch einen, mit den die Transgene muIL-2 und muGM-CSF tragenden Plasmiden beladenen, Kollagenschwamm eine Immunstimulierung nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen Therapiegruppe und Kontrollgruppe mit Leervektor konnte für die Parameter Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors sowie Überlebenszeit der Mäuse nicht festgestellt werden. Mit unbeschichtetem Schwamm behandelte Mäuse zeigten keinen Unterschied zu unbehandelten Mäusen der Kontrollgruppe, d. h. der unbeschichtete Schwamm bewirkte keine Immunstimulation, wohingegen der mit dem Leervektor beschichtete Schwamm die gleiche immunstimulierende Wirkung in den Mäusen hatte, wie der mit den Zytokin-Gen-tragenden Vektoren (333).
Kontrollgruppen, in denen die Katzen nur den Leervektor p55pCMV_ivs oder einen unbeschichteten Schwamm erhalten, waren aus ethischen Gründen bei der durchgeführten Studie nicht geplant (vgl. auch 165). Eine durch die Gentherapie der drei Zytokin-Gene erreichte Immunstimulation kann also diesen nicht klar zugeordnet werden, sondern könnte auch durch die CpG Motive des Plasmids bedingt sein.
Ähnlich verhält es sich mit Jourdier *et al.*`s Gentherapiestudie des felinen Fibrosarkoms (157) (siehe Kap. IV 1 und 2.1). Diese Arbeitsgruppe verwendet Kanariepocken- bzw. Vacciniaviren als Vektor für Interleukin 2 und erreicht mit dieser Immuntherapie eine

Senkung der Rezidivrate. Leider fehlt der Vergleich mit einer Kontrollgruppe, in welcher die Katzen nur die viralen Vektoren, ohne das therapeutische Gen IL-2, erhalten. Dies wäre von Bedeutung, da Pockenviren dafür bekannt sind, das unspezifische Immunsystem zu stimulieren (206) und in dieser Studie folglich der immunstimulierende Effekt nicht eindeutig der Zytokin-Gentherapie zugeordnet werden kann. Aufgrund der paraspezifischen Aktivität der Pockenviren könnte die erreichte Senkung der Rezidivrate auch allein auf der Verwendung der viralen Vektoren beruhen, die eine Induktion von IFNα, IL-2 und IL-12 bewirken sowie Kolonie-stimulierende Aktivität besitzen und so die Phagozytoserate und die NK-Zellaktivität steigern können (329).

6 PCR und Sequenzierung

Die in den drei PCRs amplifizierten DNA-Banden zeigen verglichen mit einem Längenstandard die richtige, der jeweiligen Zytokin-DNA entsprechende Größe. Jedoch hätten auch andere DNA-Stücke amplifiziert werden können. Die Probleme bei der Amplifikation von feGM-CSF konnten in der vorliegenden Arbeit durch einen neuen *reverse*-Primer gelöst werden. Auch Dunham und Bruce haben Probleme feGM-CSF als einzelne vollständige Sequenz zu klonieren. Sie amplifizieren schließlich zwei sich überlappende Fragmente mit vier Primern. Der anschließend zusammengesetzten Sequenz fehlen jeoch die ersten neun Nukleotide (80).

Nach Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor werden die Plasmide der transformierten Bakterien mittels analytischer Spaltung genauer untersucht. Durch Restriktionsverdau mit verschiedenen Endonukleasen erhält man unterschiedlich große Fragmente. Entsprechen diese in der Gelelektrophorese in ihrer Anzahl und Größe den zuvor errechneten Bruchstücken, so werden diese Plasmide als positiv angesehen. Eine Verifizierung der in der PCR amplifizierten DNA erfolgt letztendlich durch die Sequenzierung der Plasmid-*insert*s positiver Klone.

6.1 Sequenzergebnis feIL-2

Felines IL-2 ist 465 bp lang und kodiert für 154 Aminosäuren. Davon stellen 134 AS das reife Protein nach Abspaltung der Signalsequenz (20 AS) dar. Die vier Cysteinreste (Positionen 9, 78, 126 und 146) sind bei allen Spezies konserviert, wobei sich der erste in der Signalsequenz befindet. Die anderen drei sind wahrscheinlich maßgeblich an der aktiven Konformation des Proteins beteiligt; die Cysteinreste an den Positionen 78 und 126 bilden eine Disulfidbrücke (59, 78). Eine potentielle N-Glycosylierungsstelle weißt nicht nur das feIL-2 auf (Position 111), sondern auch das bovine, equine, caprine, ovine und canine IL-2, nicht jedoch das murine und humane (59, 78).
Die Sequenzergebnisse des in der vorliegenden Arbeit klonierten feIL-2, sowie des von Cozzi *et al.* (L19402) veröffentlichten (59, 111) stimmen weitestgehend überein. Der einzige Basenunterschied in den klonierten Nukleotidsequenzen führt auch zu einem Unterschied in der Aminosäurensequenz: Glutamin oder Arginin (siehe Abb. 6 und Abb. 7 in Kap. III B 1.1).
Diese unterschiedliche Base könnte entweder auf eine fehlerhafte Aktivität der DNA-Polymerase während der PCR zurückzuführen sein oder auf eine neu entstandene Mutation am Plasmid in den transformierten Bakterien. Auch ein Sequenzierfehler kommt in Frage, ist aber aufgrund der doppelten sowohl in *sense-* als auch in *antisense-*Richtung durchgeführten Sequenzreaktion fast auszuschließen. Es könnte sich auch um einen Nukleotidpolymorphismus handeln. Bei anderen Spezies steht an dieser Stelle, wie bei Sequenz L19402 ein Adenin (111), und nicht wie bei der in dieser Arbeit klonierten Sequenz ein Guanin. Im Vergleich der Aminosäurensequenzen der unterschiedlichen Spezies ist allerdings auch zu erkennen, dass diese Region nicht sehr stark konserviert ist.
Um einen Polymorphismus auszuschließen oder zu beweisen sollte die Klonierung an verschiedenen Katzenrassen wiederholt werden. Eventuell besteht auch eine Abhängigkeit vom Geschlecht der Katzen.

6.2 Sequenzergebnis feGM-CSF

Die cDNA von felinem GM-CSF ist 435 Basenpaare lang und kodiert für ein reifes Protein von 127 Aminosäuren, sowie für ein Signalpeptid von 17 Aminosäuren (80). Von fünf vorhandenen Cysteinresten sind vier (Positionen 71, 105, 113 und 138) an der

Bildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt, die auch bei anderen Spezies konserviert sind (80). Sie bilden eine stabilisierende ähnliche Sekundärstruktur (240). Der fünfte Cysteinrest ist in der Signalsequenz lokalisiert (Position 14). Das GM-CSF der Katze besitzt drei potentielle N-Glycosylierungsstellen (Positionen 44, 45 und 54) (80).

Die veröffentlichten vier feGM-CSF Sequenzen zeigen auf Nukleotidlevel einige unterschiedliche Basen, welche sich auch auf die Aminosäurensequenzen auswirken (siehe Abb. 10 und Abb. 11 in Kap. III B 1.2). Aufgrund der Anzahl der Sequenzunterschiede können Fehler der DNA-Polymerase, welche mit eine Fehlerrate von weniger als 10^{-8} pro Basenpaar eine hohe Genauigkeit aufweist, und auch Mutationen im Bakterium fast ausgeschlossen werden. Da die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz doppelt analysiert wurde und Dunham und Bruce multiple Klone verschiedener PCR-Reaktionen sequenziert haben (80), handelt es sich sehr wahrscheinlich um Nukleotidpolymorphismen. Dies ist nicht weiter ungewöhnlich, da vergleichbare Polymorphismen auch bei der Sequenzierung von unabhänig isolierten G-CSF Sequenzen auftreten (79, 80, 344).

Um das Ergebnis der Sequenzanalysen zu verifizieren, könnten weitere feGM-CSF-Klone sequenziert werden.

6.3 Sequenzergebnis feIFNγ

Felines IFNγ ist 504 bp lang und kodiert für ein Protein von 167 Aminosäuren Länge. Bei den ersten 23 AS handelt es sich um die Signalsequenz, welche vom reifen 167 AS langen reifen Protein abgespalten wird. Das Protein besitzt drei Cysteinreste (Positionen 13, 17 und 23), welche sich alle innerhalb der Signalsequenz befinden. Eine der drei möglichen N-Glycosylierungsstellen ist im Signalpeptid lokalisiert (Positionen 2, 39 und 97) (5, 62, 279).

Die von Sequi-Serve ermittelte Sequenz für das in dieser Arbeit klonierte feIFNγ stimmt mit den bereits in der GenBank (D30619 und X86972) veröffentlichten identischen Sequenzen (5, 111, 279) weitestgehend überein (siehe Kap. III B 1.3). Die drei Basenunterschiede in der Nukleotidsequenz wirken sich jedoch nicht auf die Aminosäurensequenz aus. Auch in diesem Fall kommt sowohl ein Fehler der DNA-Polymerase, eine Mutation in den Bakterien, ein Sequenzierfehler oder ein Nukleotidpolymorphismus in Frage (siehe auch Kap. IV 6.1 und 6.2). Sehr wahrscheinlich ist auch hier von einem Nukleotidpolymorphismus auszugehen.

7 Expressionssystem

Im Hinblick auf die Zielsetzung der Arbeit, die biologische Aktivität der entstandenen Proteine nachzuweisen, wird mit den COS-7 Zellen ein eukaryotisches Expressionssystem gewählt. Alternativen wären neben Säugerzellen auch Bakterien, Hefen, Pflanzenzellen oder Insektenzellen.

Probleme, die bei der Expression von Proteinen in E. coli auftreten können, sind vor allem die fehlenden posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung, aber auch die richtige Faltung. Besonders bei IFNγ müsste das prokaryotische System fähig sein, die erzeugten Monomere zu den gewünschten Homodimeren zusammenzulagern. Sowohl für feIFNγ als auch für viele andere Zytokine ist jedoch bekannt, dass auch prokaryotische Systeme biologisch aktive Proteine synthetisieren können (6, 60, 256, 257, 265).
Neben der biologischen Aktivität kann der Grad der Glycosylierung auch Antigenität, Toxizität und Pharmakokinetik (z. B. die Halbwertszeit *in vivo*) des Proteins beeinflussen (6, 8). Deshalb sollte bei genauerer Proteincharakterisierung oder dem Einsatz der rekombinanten Proteine *in vivo* die glykosylierte Form der Proteine bevorzugt werden. Bei der Verwendung der nicht-glykosylierten Form *in vivo* kann es zur Antikörperbildung kommen (121).

8 Biologische Wirksamkeit

Immunologische Assays, wie z. B. der ELISA, benötigen zytokinspezifische Antikörper und sind für viele Zytokine kommerziell erhältlich. Sie messen allerdings auch biologisch inaktive Zytokine oder Fragmente dieser Faktoren, d. h. sie erlauben keinen Rückschluss auf die biologische Aktivität des Zytokins (335). Zum Nachweis der von den COS-7 Zellen exprimierten Zytokin-Proteine wird jeweils ein Bioassay verwendet, da dieser im Gegensatz zum ELISA die biologisch aktiven Formen und damit klinisch relevante Wirkungen des Proteins messen kann (65). Ein ELISA zur Konzentrationsbestimmung ist darüber hinaus derzeit für keines der drei Zytokine kommerziell erhältlich.

8.1 Proliferationstest feIL-2

Es gibt zwei verschiedene Methoden die biologische Aktivität von IL-2 zu prüfen. Sowohl in mit ConA stimulierten Lymphozytenkulturen als auch in IL-2 abhängigen T-Zelllinien wird in Assays die proliferative Wirkung des IL-2 nachgewiesen (110). Beide Proliferationsassays sind sowohl für Maus und Mensch als auch für die Katze etabliert (59, 65).

Cozzi *et al.* erbringen den Nachweis der biologischen Aktivität, indem sie einen Proliferationstest mit peripheren Blutleukozyten durchführen. Zu diesen mit ConA vorstimulierten Zellen wird feIL-2 bzw. der Überstand der mit feIL-2 transfizierten COS-7 Zellen gegeben und die Zellproliferation mittels ^{3}H-Thymidin Inkorporation gemessen (60). Diese früher mittels radioaktiver Methoden ausgewerteten Tests werden heute mittels MTT-, XTT- oder WST-Coloriemetrie-Assay beurteilt.

In der vorliegenden Arbeit wird die biologische Wirksamkeit des feIL-2 in einem Proliferationsassay mit der IL-2 abhängigen zytotoxischen T-Zelllinie CTLL-2 untersucht, wobei gezeigt werden kann, dass das klonierte feIL-2 die Proliferation dieser Zelllinie hervorruft und damit biologisch aktiv ist.

Da CTLL-2 Zellen sowohl IL-2 als auch IL-4 abhängig sind, verwenden Cozzi *et al.* spezifische Antikörper um die IL-4 Aktivität zu blockieren (59). Auf dies wird in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da im Überstand der COS-7 Zellen kein anderes Zytokin, als das vom Plasmid kodierte feIL-2 zu erwarten ist. Bei der Messung von IL-2 Aktivität im Serum hätte dies berücksichtigt werden müssen. Ebenso wäre ein Ansatz nötig gewesen, in dem sowohl die IL-2 als auch die IL-4 Aktivität mit Antikörpern zu blockieren ist um die Aktivität unentdeckter Zytokine auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wird nach der Feststellung der biologischen Aktivität auf eine Bestimmung der Laboreinheiten verzichtet, da die exprimierten Proteine nicht aufgereinigt vorliegen, sondern sich nur im Überstand der transfizierten COS-7 Zellen befinden. Eine quantitative Auswertung wäre rein theoretisch anhand einer extrapolierten Standardkurve möglich, ist jedoch für die vorliegende Fragestellung nicht nötig. Darüber hinaus hätte ein Vergleich mit huIL-2 stattfinden müssen, da rfeIL-2 derzeit nicht kommerziell erhältlich ist.

8.2 Proliferationstest feGM-CSF

Es gibt verschiedene Bioassays um die biologische Aktivität von GM-CSF nachzuweisen: Eine Möglichkeit ist, die Wirkung auf hämatopoetische Progenitorzellen auszunutzen: Diese Zellen, z. B. aus dem Knochenmark, proliferieren und differenzieren sich unter dem Einfuss von GM-CSF zu Kolonien mit spezifischer Morphologie (*bone-marrow colony-forming assays*). Mit einem Mikroskop ist es möglich diese zu charakterisieren und auszuzählen (55, 80).
Eine weitere Methode, die auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt, ist der Proliferationstest: Die GM-CSF abhängige Zelllinie proliferiert nur in Anwesenheit von GM-CSF. Der Proliferationstest mit TF-1 Zellen ist für den Mensch etabliert und wird auch bereits bei der Katze angewandt (55, 80).
Das in dieser Arbeit klonierte feline GM-CSF zeigt als Protein in diesem Test biologische Aktivität. Es kann daher, trotz der beschriebenen Unterschiede in der Nukleotid- bzw. Aminosäurensequenz, von einer korrekten Faltung des Proteins und einer erfolgreichen Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor ausgegangen werden.
Auf eine Blockierung der GM-CSF Wirkung durch anti-feGM-CSF Antikörper als Negativkontrolle wird ebenfalls aus schon beschriebenen Gründen verzichtet (siehe Kap. IV 8.1).
Mit Hilfe von rekombinantem feGM-CSF kann eine dosisabhängige Kurve erstellt werden und so die proportionale Aktivität des Zytokins für eine qualitative Beurteilung bestimmt werden. Die Beurteilung der biologischen Aktivität des im Zellkulturüberstand der COS-7 Zellen vorliegenden feGM-CSF erfolgt in dieser Arbeit nur qualitativ, da das exprimierte Protein nicht aufgereinigt vorliegt.
Auffällig ist, dass rekombinantes feGM-CSF in etwa der 5-fachen Menge -verglichen mit rhuGM-CSF - eingesetzt werden muss um eine ähnlich starke Proliferation zu erreichen (siehe auch Kap. III B 2.2).
Beim Vorversuch wird der optimale Messzeitpunkt nach 6 h ermittelt, im Hauptversuch ist jedoch die Messung nach 2 h zu bevorzugen. Nach 2 h haben die lebenden Zellen noch nicht so viel Substrat des XTT-Tests umgesetzt, weshalb der Anstieg der Standardkurven besser zu sehen ist. Bei einer späteren Messung nach 6 h ist bereits so viel Substrat umgesetzt, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Verdünnungsstufen des GM-CSF kaum mehr zu erkennen sind, d. h. die Standardkurve von huGM-CSF zeigt nach einem steilen Anstieg ein Plateau. Auch ist zu beobachten, dass die Probenkurve bei hoher feGM-CSF Aktivität nach unten abfällt und nicht auf

dem erwarteten Plateau bleibt (siehe Abb. 24 in Kap. III B 2.2). Ein solches Verhalten wäre zu erklären, wenn in der Plateauphase wieder vermehrt TF-1 Zellen absterben; vielleicht aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen.
Um eine ansteigende Probenkurve zu erhalten, hätte der Zellkulturüberstand stärker verdünnt oder weitere Modifikationen des Tests, z. B. eine Messung nach kürzerer Zeit vorgenommen werden müssen.

8.3 Bioassay feIFNγ

8.3.1 Bioassay mit felinen Fibrosarkomzellen

Für feIFNγ Protein sind verschiedene Methoden beschrieben um die biologische Aktivität nachzuweisen.
Zum einen der Nachweis der antiviralen Wirkkomponente. Beim VSV-Inhibitionstest wird der zytopathische Effekt (CPE) den das Vesikulär-Stomatitis-Virus (VSV) auf bestimmte Zelllinien hat durch feIFNγ dosisabhängig reduziert, was auch wiederum durch anti-feline IFNγ-Antikörper verhindert werden kann (6, 256). Während eine Quelle die feline Nierenzelllinie CRFK verwendet (256), benutzen Argyle *et al.* die feline Embryonenzelllinie FEA für diesen Assay (6).
Antivirale Assays werden in dieser Arbeit aus verschiedenen Gründen nicht verwendet: Zum einen weist der VSV-Inhibitionstest nur die antivirale Wirkkomponente des Interferons nach, nicht die immunmodulatorische, zum anderen besitzt er eine geringere Sensitivität (288). Die von Argyle *et al.* weiterhin erwähnten viralen Assays mit felinem Herpesvirus (FHV) oder felinem Calicivirus (FCV) kommen aus den gleichen Gründen sowie der schlechten Reproduzierbarkeit nicht in Frage (6).
Eine weitere Möglichkeit des Nachweises ist die Induktion des Fc-Rezeptors auf Makrophagen, welche jedoch nicht standardisiert ist und weder für murines noch humanes IFNγ routinemäßig verwendet wird (330).

Da die geplante gentherapeutische Anwendung die immunregulatorische Wirkkomponente des Zytokins erfordert, wird versucht mittels Durchflusszytometrie den Einfluss von feIFNγ in Bezug auf die MHC I- und MHC II-Expression darzustellen. Argyle *et al.* führen einen MHC II-Induktionstest durch, welcher auf der immunmodulatorischen, antiproliferativen Wirkung des Zytokins beruht. Sie benutzen die

FeLV-positive Katzenzelllinie F422, auf welcher MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche induzierbar sind. Mittels Durchflusszytometrie kann gezeigt werden, dass IFNγ auf diesen Zellen die Expression von MHC II hochreguliert (6, 261).
Ebenfalls von einer Fluoreszenzanalyse berichtet Müller-Heidelberg, jedoch ohne genauere Angaben: Eine Zellkultur von felinen transformierten Astrozyten (PG 4-Zellen) wird mit einem Kulturüberstand von Zellen inkubiert, die mit einem das rekombinante feIFNγ-Gen-tragenden Adenovirus infiziert worden sind. Die Exposition gegenüber feIFNγ löste bei den PG4-Zellen eine starke MHC I-Induktion aus (225).

Bei MHC-Induktionsassays ist aufgrund der Speziesspezifität von IFNγ die Wahl der Zellen sehr wichtig. Zum einen muss es sich um Zellen der gleichen Spezies handeln, zum anderen muss MHC auf diesen Zellen induzierbar sein (288). Der erste in dieser Arbeit entwickelte Bioassay weist die Induktion der MHC I- und MHC II-Expression auf felinen Fibrosarkomzellen nach, da diese Wirkung auch beim immuntherapeutischen Einsatz in der Katze erwünscht ist.
Da sich das Protein im Bioassay als biologisch aktiv erweist, kann daraus geschlossen werden, dass es posttranslational modifiziert wurde, d. h. die Signalsequenz abgespalten wurde und sich Homodimere geformt haben.
Eine Quantifizierung des Interferons in Laboreinheiten wird aus bereits beschriebenen Gründen nicht vorgenommen. Der Nachweis erfolgt rein qualitativ. Eine Modifikation des Protokolls hätte mit einer Blockade der IFNγ-Wirkung durch anti-feline IFNγ-Antikörper durchgeführt werden können. Darauf wird aus ebenfalls zuvor erläuterten Gründen verzichtet (siehe Kap. IV 8.1).

8.3.2 Bioassay mit felinen PBMCs

In einer weiteren durchflusszytometrischen Messung kann für IFNγ keine immunmodulierende Wirkung auf MHC I- und MHC II-Molekülexpression nachgewiesen werden. Es werden feline periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) verwendet. Walrand *et al.* können für bovines IFNγ sowohl eine MHC I- als auch eine MHC II-Expressionssteigerung auf bovinen PBMCs zeigen (331).

Die unstimulierten felinen PBMCs zeigen hier bereits eine sehr hohe MHC I- und MHC II-Expression, so dass nach IFNγ-Zusatz keine weitere Expressionssteigerung

nachgewiesen werden kann. Dies liegt im Fall von MHC II wahrscheinlich an der - verglichen mit dem Menschen - generell sehr hohen Expression auf felinen PBMCs (36, 149, 234, 262, 296).
Allerdings zeigen Versuche von Rimstad *et al.*, dass feliner TNFα auf Katzen-PBMCs eine dosisabhängige Steigerung von MHC II bewirkt. Eine Stimulation der MHC I-Expression erreicht er mit feTNFα nicht (263).
Die in dieser Arbeit verwendeten felinen PBMCs stammen aus dem Blut einer Katze aus der Chirurgischen Tierklinik. Diese Katze war zwar klinisch gesund, könnte jedoch aufgrund der Auseinandersetzung mit diversen Keimen in der Tierklinik bereits eine maximale Immunstimulation aufgewiesen haben, weshalb vielleicht keine weitere Hochregulation von MHC I und II mehr möglich war.
Rimstad *et al.* verwenden ebenfalls Blut von "vier verschiedenen normalen Spender-Katzen", wobei er keine genaueren Angaben zur Herkunft der Katzen macht (263). Eine Wiederholung dieser Messungen mit PBMCs aus dem Blut von SPF-Katzen könnte eventuell genauere Ergebnisse liefern.

9 Feline Fibrosarkomzellen

Eine universelle Strategie der immuntherapeutischen Tumorbekämpfung ist leider nicht möglich. Immuntherapien mit der Zytokinkombination IL-2, IFNγ und GM-CSF sind in der Vergangenheit zwar bei einigen Tumoren effektiv, bei anderen Tumormodellen aber auch weniger erfolgreich (20).
Da jeder Tumor anders entsteht, ist das Wissen, welcher exakte Mechanismus hinter dem *tumour escape* steckt, für die Entscheidung wichtig, welche Behandlungsstrategie verfolgt werden soll. Wenn die Veränderungen in der Antigenpräsentation strukturelle Gene betreffen sind diese irreversibel. Sind jedoch regulatorische Prozesse betroffen, könnten diese auf Zytokin-Behandlung sensitiv reagieren (272).

Deshalb ist es wichtig auch beim felinen Fibrosarkom noch genauere molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen. MHC II-Moleküle sind nur auf einigen Tumoren nachweisbar (1). Die Fibrosarkomzellen, die in dieser Arbeit benutzt werden sind MHC II-positiv. Interessant wäre, ob alle Fibroarkome MHC II exprimieren, oder ob auch MHC II-negative vorkommen. Ein weiterer Punkt ist die MHC I-Expression dieser Tumorzellen. Ist sie normal oder im Sinne eines *tumour escape* herunter reguliert? Oder

zeigen die MHC-Moleküle einen abweichenden Aufbau? Sollte sich herausstellen, dass auf Fibrosarkomzellen MHC vermindert exprimiert wird, wäre der immuntherapeutische Ansatz mit IFNγ optimal, da ja auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden kann, dass IFNγ auf Zellen eines bestimmten Fibrosarkoms sowohl MHC I- als auch MHC II-Expression induziert. Dann stellt sich jedoch die Frage: Ist diese MHC-Induktion nur auf dieser Primärkultur von Fibrosarkomzellen möglich, oder auf allen Fibrosarkomzellen? So gibt es z. B. bei Melanomen fas+ und fas- Tumoren. Es eignen sich allerdings nur die fas+ für eine Gentherapie mit *fas-ligand* um Apoptose der Tumorzellen zu induzieren (15). Auch bei verschiedenen Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms werden Unterschiede in der IFNγ-induzierten MHC I- und MHC II-Expression beobachtet (9). Es würden sich für eine IFNγ-Immuntherapie nur solche Tumoren besonders eignen, auf welchen IFNγ diesen Effekt der MHC-Hochregulation auch zu bewirken vermag.

Sollte es Fibrosarkome geben, auf denen IFNγ keine Wirkung auf die MHC-Expression hat, wäre weiterhin interessant, ob bei diesen eine Immuntherapie mit IFNγ total versagt, bzw. ob der klinische Erfolg (Rezidivfreiheit, mittlere Überlebenszeit) bei Katzen mit Tumoren, auf denen MHC induzierbar ist, im immunologischen Monitoring mit dieser Tatsache korreliert.

Das Ziel weiterer Untersuchungen wäre, möglichst viele Fibrosarkome von erkrankten Katzen nach der Operation aufzubereiten, als Primärkultur zu etablieren und analog zu dieser Arbeit die MHC I- und MHC II-Expression mit und ohne Zugabe von feIFNγ durchflusszytometrisch zu messen.
Weitere wichtige Fragestellungen um das feline Fibrosarkom genauer zu charakterisieren, wären z. B. das Vorhandensein von tumorspezifischen Antigenen, Expression von *fas* oder *fas-ligand* oder auch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, etc.

V ZUSAMMENFASSUNG

Klonieren der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze

Das feline Fibrosarkom ist ein maligner Bindegewebstumor, der mit einer Rezidivrate von etwa 70 % auch nach radikaler Tumoroperation eine sehr schlechte Prognose hat. Verschiedene Gentherapieprotokolle wurden bereits adjuvant zur Tumorexstirpation durchgeführt. Bei der folgenden Studie soll ein lokaler, nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene Interleukin 2, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor und Interferon γ stattfinden. Für den gentherapeutischen Einsatz in der Katze wird ein Kollagenschwamm als Trägermaterial mit der Plasmid-DNA in PEI-PEG-Formulierung beladen. Die immunmodulierenden Zytokine sollen die Antigenpräsentation verbessern, Effektorzellen des Immunsystems aktivieren und Memory-Zellen gegen die spezifischen Tumorantigene generieren. Ziel ist das Abtöten von Tumorzellen und die Bildung einer Antitumorimmunität um ein lokales Rezidiv des Fibrosarkoms zu verhindern oder die rezidivfreie Zeit und damit auch die Überlebenszeit der Katzen zu verlängern. Der Einsatz dieses Gentherapeutikums erfolgt zunächst in einer Phase I-Studie, in der die Verträglichkeit geprüft werden soll. Diese Immuntherapie soll adjuvant mit der chirurgischen Standardtherapie kombiniert werden.

Aus dem Blut klinisch gesunder Katzen wurden periphere mononukleäre Blutzellen isoliert, angezüchtet und mit Concanavalin A stimuliert. Anschließend wurde aus den Zellen die mRNA gewonnen und mit Hilfe reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize für die PCR, mit der die einzelnen Zytokin-Sequenzen amplifziert wurden. Spezifische, von den bereits veröffentlichten Sequenzen abgeleitete Primer führten Restriktionsschnittstellen in das amplifizierte Produkt ein. Sowohl die PCR-Produkte als auch der Vektor wurden mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach Ligation der PCR-Produkte in das Expressionsplasmid p55pCMV_ivs_luc+ und Transformation von DH 10 B-Bakterien wurden die *inserts* der als positiv befundenen Plasmide sequenziert.
Vor dem therapeutischen Einsatz der Zytokin-Gene wurde ihre biologische Aktivität überprüft. Die rekombinanten Proteine wurden in der Säugerzelllinie COS-7 exprimiert. In Proliferationsassays konnte die Bioaktivität von feIL-2 und feGM-CSF demonstriert

werden, wobei die Zelllinien CTLL-2 und TF-1 benutzt wurden, welche in ihrem Wachstum vom entsprechenden Zytokin abhängig sind. Die biologische Aktivität von feIFNγ wurde durchflusszytometrisch mit MHC I- und MHC II-Induktionstests auf felinen Fibrosarkomzellen nachgewiesen.

Nach Konjugation der Plasmid-DNA mit dem Polykation Polyethylenimin wurde dieser Komplex mit protektiven Kopolymeren (Polyethylenglycol) umhüllt und unter sterilen Bedingungen auf den Kollagenschwamm aufgebracht. Der Schwamm kann bis zur Implantation ins Tumorbett steril gelagert werden.

SUMMARY

Cloning of feline cytokines IL-2, GM-CSF, and IFNγ for adjuvant nonviral gene-therapy of feline fibrosarcoma

The feline fibrosarcoma is a spontaneous malignant soft tissue sarcoma. Due to the high recurrence rate of approximatelly 70 % even after radical surgical excision the prognosis is very poor. There have been carried out different gene-therapy protocolls adjuvant to tumour excision, yet. In the following study a local, nonviral gene-transfer with the feline cytokine-genes Interleukin 2, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Interferon γ is conducted. As local gene delivery system serves a collagen-sponge loaded with a plasmid-DNA-PEI-PEG-formulation. The immunomodulating cytokines are expected to improve the antigen presentation, to activate immune effector cells and to generate memory cells against specific tumour-antigens. The goal is to enhance tumour cell killing and anti cancer immune response to extend the tumour free survival time or even to decrease the recurrence rate in fibrosarcoma bearing cats. First a phase I dose escalation study is carried out using these vector-loaded collagen sponge. The adjuvant immunotherapy is combined with the surgical standard treatment of the feline fibrosarcoma.

Blood was collected from healthy cats. Feline peripheral mononuclear blood cells were separated, cultured and stimulated *in vitro* by Concanavalin A. mRNA was isolated and reverse transcribed in cDNA. The cDNA served as template for the PCR amplification. Specific primers are based on already published sequences and introduced restriction endonuclease sequences in the amplified product. PCR products and expression vector were cut with these restriction enzymes. After ligation of PCR products and expression vector p55pCMV_ivs_luc+ transformation in DH 10 B-bacteria was performed. Further analysed inserts were sequenced.

Before therapeutic use the cytokines had to show biological activity. Recombinant proteins are expressed in the mammalian cell line COS-7. The feIL-2 and feGM-CSF bioactivity is demonstrated in proliferation assays, using the IL-2 and GM-CSF dependent cell lines CTLL-2 and TF-1. The biological acitivty of feIFNγ is measured by FACS analysis. A MHC I and II induction assay was performed on feline fibrosarcoma cells.

After plasmid DNA preparation with polykation polyethylenimine and protective

copolymers (polyethylene glycol) the collagen sponge is loaded with these gene vectors under sterile conditions. The vector loaded sponge is stored at 4 °C till implanted in the tumour bed of fibrosarcoma bearing cats.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas AK, Lichtman AH (Hrsg):
Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.
WB Saunders, **2004**

2. Abraham D, McGrath KG:
Hypersensitivity to aldesleukin (interleukin-2 and proleukin) presenting as facial angioedema and erythema.
Allergy Asthma Proc **2003**; 24: 291-294

3. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J:
Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness.
Nat Genet **2001**; 28: 92-95

4. Arai M, Darman J, Lewis A, Yamamoto JK, Darmen J:
The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats.
Vet Immunol Immunopathol **2000**; 77: 71-92

5. Argyle DJ, Smith K, McBride K, Fulton R, Onions DE:
Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interferon-gamma (IFNgamma).
DNA Seq **1995**; 5: 169-171

6. Argyle DJ, Harris M, Lawrence C, McBride K, Barron R, McGillivray C, Onions DE:
Expression of feline recombinant interferon-gamma in baculovirus and demonstration of biological activity.
Vet Immunol Immunopathol **1998**; 64: 97-105

7. Argyle DJ:
Gene therapy in veterinary medicine.
Vet Rec **1999**; 144: 369-376

8. Armitage JO:
Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood **1998**; 92: 4491-4508

9. Arosarena OA, Baranwal S, Strome S, Wolf GT, Krauss JC, Bradford CR, Carey TE:
Expression of major histocompatibility complex antigens in squamous cell carcinomas of the head and neck: effects of interferon gene transfer.
Otolaryngol Head Neck Surg **1999**; 120: 665-671

10. Baldeschi C, Gache Y, Rattenholl A, Bouille P, Danos O, Ortonne JP, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G:
Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors.
Hum Mol Genet **2003**; 12: 1897-1905

11. Bauer RM, Olsen RG:
Parameters of production and partial characterization of feline interleukin 2.
Vet Immunol Immunopathol **1988**; 19: 173-183

12. Bauvois B, Wietzerbien J:
Interferone: Biologische Aktivitäten und klinische Anwendungen.
In: Virbac (Hrsg.): *Interferone in der Kleintiermedizin* **2002**; 1. Ausgabe: 8-27

13. Beall CJ, Phipps AJ, Mathes LE, Stromberg P, Johnson PR:
Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector.
Gene Ther **2000**; 7: 534-539

14. Beyer JC, Stich RW, Hoover DS, Brown WC, Wheevers WP:
Cloning and expression of caprine interferon-gamma.
Gene **1998**; 210: 103-108

15. Bianco SR, Sun J, Fosmire SP, Hance K, Padilla MP, Ritt MG, Getzy DM, Duke RC, Withrow SJ, Lana S, Matthiesen DT, Dow SW, Bellgrau D, Cutter GR, Helfand SC, Modiano JF:
Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis.
Cancer Gene Ther **2003**; 10: 726-736

16. Blackwood L, O`Shaughnessy PJ, Reid SW, Argyle DJ:
E. coli nitroreductase/CB 1954: in vitro studies into a potential system for feline cancer gene therapy.
Vet J **2001**; 161: 269-279

17. Blackwood L, Argyle DJ:
Feline hyperthyroidism: advances towards novel molecular therapeutics.
J Small Anim Pract **2002**; 43: 58-66

18. Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, Cohen-Haguenauer O, Gänsbacher B, Sorrentino B, Velu T:
European School of Oncology position paper. Gene therapy for the medical oncologist.
Eur J Cancer **1995**; 31A: 1531-1537

19. Blakeslee J, Noll G, Olsen R, Triozzi PL:
Adoptive immunotherapy of feline leukemia virus infection using autologous lymphnode lymphocytes.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **1998**; 18: 1-6

20. Blankenstein T:
Increasing tumour immunogenicity by genetic modification.
Eur J Cancer **1994**; 30A: 1182-1187

21. Blattman JN, Greenberg PD:
Cancer immunotherapy: a treatment for the masses.
Science **2004**; 305: 200-205

22. Bocci V:
Pharmacology and side-effects of interferons.
Antiviral Res **1994**; 24: 111-119

23. Boehringer Mannheim:
Cell Proliferation Kit II (XTT) (Catalog Number 1465015) - *Product information* **2003**

24. Bonadio J:
Tissue engineering via local gene delivery: Update and future prospects for enhancing the technology.
Adv Drug Del Rev **2000**; 44: 185-194

25. Botti C, Seregni E, Ferrari L, Martinetti A, Bombardieri E:
Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression.
Int J Biol Markers **1998**; 13: 51-69

26. Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP:
A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo - polyethylenimine.
Proc Natl Acad Sci USA **1995**; 92: 7297-7301

27. Briscoe CM, Lipscomb TP, McKinney L:
Pulmonary metastasis of a feline vaccination-site sarcoma.
J Vet Diagn Invet **1998**; 19: 79-82

28. Brockstedt DG, Diagana M, Zhang Y, Tran K, Belmar N, Meier M, Yang A, Boissiere F, Lin A, Chiang Y:
Development of anti-tumor immunity aganist a non-immunogenic mammary carcinoma through in vivo somatic GM-CSF, IL-2, and HSVtk combination gene therapy.
Mol Ther **2002**; 6: 627-636

29. Brown NO, Patnaik AK, Mooney S, Hayes A, Harvey HJ, MacEwen EG:
Soft tissue sarcomas in the cat.
J Am Vet Med Assoc **1978**; 173: 744-749

30. Buchsel PC, Forgey A, Grape FB, Hamann SS:
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches.
Clin J Oncol Nurs **2002**; 6: 198-205

31. Buddle BM, Ryan TJ, Poloock JM, Andersen P, de Lisle GW:
Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing.
Vet Microbiol **2001**; 80: 37-46

32. Bujdoso R, Williamson M, Roy D, Hunt P, Blacklaws B, Sargan D, McConnell I:
Molecular cloning and expression of DNA encoding ovine interleukin 2.
Cytokine **1995**; 7: 223-231

33. Bull ME, Vahlenkamp TW, Dow JL, Collisson EW, Winslow BJ, Phadke AP, Tompkins MB, Tompkins WA:
Spontaneous T cell apoptosis in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats is inhibited by IL2 and anti-B7.1 antibodies.
Vet Immunol Immunopathol **2004**; 99: 25-37

34. Bundesärztekammer:
Richtlinien zum Gentransfer in menschliche Körperzellen.
Sonderdruck Deutsches Ärzteblatt - Ärztliche Mitteilungen, **1995**; 92. Jahrgang/Heft 11, A: Seite 789-794; B: Seite 583-588; C: Seite 507-512; Postverlagsort Köln

35. Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A:
Vaccine-associated-like Fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat.
Vet J **2002**; 163: 105-107

36. Byrne KM, Kim HW, Chew BP, Reinhart GA, Hayek MG:
A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes.
Vet Immunol Immunopathol **2000**; 73: 167-182

37. Calderwood MA, White RE, Whitehouse A:
Development of herpesvirus-based episomally maintained gene delivery vectors.
Expert Opin Biol Ther. **2004**; 4: 493-505

38. Catchpole B, Gould SM, Kellett-Gregory LM, Dobson JM:
Immunosuppressive cytokines in the regional lymph node of a dog suffering from oral malignant melanoma.
J Small Anim Pract **2002**; 43: 464-467

39. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J:
GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.
Nature **1992**; 360: 258-261

40. Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, Cantrell MA, Anderson D, Gillis S, Cosman D, Baker PE:
Cloning, sequence, and expression of bovine interleukin 2.
Proc Natl Acad Sci USA **1986**; 83: 3223-3227

41. Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, Cosman D, Gillis S, Baker PE:
Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma.
J Immunol **1986**; 136: 4561-4564

42. Chai JG, Bartok I, Chandler P, Vendetti S, Antoniou A, Dyson J, Lechler R:
Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo.
Eur J Immunol **1999**; 29: 686-692

43. Chan MM, Oglehart JD:
Viral oncolysis: Tumor-tailored therapy.
Curr Surg **2005**, 62: 25-30

44. Chauvet AE, Kesava PP, Goh CS, Badie B:
Selective intraarterial gene delivery into a canine meningioma.
J Neurosurg **1998**; 88: 870-873

45. Chauvet AE, Hogge GS, Sandin JA, Lipsitz D:
Vertebrectomy, bone allograft fusion, and antitumor vaccination for the treatment of vertebral fibrosarcoma in a dog.
Vet Surg **1999**; 28: 480-488

46. Check E:
Gene therapy put on hold as third child develops cancer.
Nature **2005**; 433: 561.

47. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Lindsey PS:
Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4.
Cell **1992**; 71: 1093-1102

48. Cherington V, Chiang GG, McGrath CA, Gaffney A, Galanopoulos T, Merrill W, Bizinkauskas CB, Hansen M, Sobolewski J, Levine PH, Greenberger JS, Hurwitz DR:
Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX in vitro and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion.
Hum Gene Ther **1998**; 9: 1397-1407

49. Ciftci K, Trovitch P:
Applications of genetic engineering in veterinary medicine.
Adv Drug Deliv Rev **2000**; 43: 57-64

50. Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN:
Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine.associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000).
J Am Vet Med Assoc **2001**; 219: 1582-1589

51. Collins RA, Tayton HK, Gelder KI, Britton P, Oldham G:
Cloning and expression of bovine and porcine interleukin-2 in baculovirus and analysis of species cross-reactivity.
Vet Immunol Immunopathol **1994**; 40: 313-324

52. Collins CA, Morgan JE:
Duchenne`s muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies.
Int J Exp Pathol **2003**; 84: 165-172

53. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC:
Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells.
Biotech **2000**; 29: 314-331

54. Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD:
Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy.
Blood **1996**; 88: 3846-3853

55. Cooper SH, Broymeyer HE:
Measurement of interleukin 3 and other hematopoietic cytokines, such as GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Erythropoietin, Steel factor, and Flt-3 Ligand.
In: *Current protocols on Immunology* **2000**; 6.4.1-6.4.6; John Wiley and Sons, Inc.

56. Correale P, Campoccia G, Tsang KY, Micheli L, Cusi MG, Sabatino M, Bruni G, Sestini S, Petrioli R, Pozzessere D, Marsili S, Fanetti G, Giorgi G, Francini G:
Recruitment of dendritic dells and enhanded antigen-specific immune reactivity in cancer patients treated with hr-GM-CSF (Molgramostim) and hr-IL-2. Results from a phase Ib clinical trial.
Eur J Cancer **2001**; 37: 892-902

57. Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR:
Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions.
Vet Pathol **2002**; 39: 33-41

58. Coyne MJ, Reeves NCP, Rosen DK:
Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992.
J Am Vet Med Assoc **1997**; 210: 249-251

59. Cozzi PJ, Padrid PA, Takeda J, Alegre ML, Yuhki N, Leff AR:
Sequence and functional characterization of feline interleukin 2.
Biochem Biophys Res Commun **1993**; 194: 1038-1043

60. Cozzi PJ, Padrid P, Tompkins MB, Alegre ML, Takeda J, Leff AR:
Bioactivity of recombinant feline interleukin-2 on human and feline leukocytes.
Vet Immunol Immunopathol **1995**; 48: 27-33

61. Curran JA, Argyle DJ, Cox P, Onions DE, Nicolson L:
Nucleotide sequence of the equine interferon gamma cDNA.
DNA Seq **1994**; 4: 405-407

62. Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia, **2003**
Version 10.3
www.copewithcytokines.de

63. Dalley DJ, Hogarth PJ, Hughes S, Hewinson RG, Chambers MA:
Cloning and sequencing of badger (Meles meles) interferon gamma and its detection in badger lymphocytes.
Vet Immunol Immunopathol **2004**; 101: 19-30

64. Da Pozzo LF, Hough KL, Holder WD Jr:
Toxicity and immunologic effects of continous infusion of recombinant human interleukin-2 administered by selective hepativ perfusion in dogs.
Surgery **1992**; 111: 326-334

65. Davis LS, Lipsky PE, Bottomly K:
Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4.
In: *Current protocols on Immunology* **2000**; 6.3.1-6.3.13; John Wiley and Sons, Inc.

66. Den Otter W, Hill FW, Klein WR, Koten JW, Steerenberg PA, De Mulder PH, Rutten VP, Ruitenberg EJ:
Low doses of interleukin-2 can cure large bovine ocular squamous cell carcinoma.
Anticancer Res **1993**; 13: 2453-2455

67. Den Otter W, Hill FW, Klein WR, Koten JW, Steerenberg PA, De Mulder PH, Rhode C, Stewart R, Faber JA, Ruitenberg EJ, et al.:
Therapy of bovine ocular squamous-cell carcinoma with local doses of interleukin-2: 67% complete regression after 20 months of follow-up.
Cancer Immunol Immunother **1995**; 41: 10-14

68. Devos R, Plaetinck G, Cheroutre H, Simons G, Degrave W, Tavernier J, Remaut E, Fiers W:
Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in E. coli.
Nucleic Acids Res **1983**; 11: 4307-4323

69. Devos K, Duernick F, Van Audenhove K, Fiers W:
Cloning and expression of canine interferon gamma gene.
J Interferon Res **1992**; 12: 95-102

70. Digby MR, Lowenthal JW:
Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene.
J Interferon Cytokine Res **1995**; 15: 939-945

71. Dijkmans R, Vandenbroeck K, Beuken B, Billiau A, Roger K, Koen V, Erik B, Alfons B:
Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene.
Nucleic Acids Res **1990**; 18: 4259

72. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janowitz EB:
Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites.
J Comp Pathol **1996**; 114: 165-174

73. Dohmann K, Wagner B, Horohov DW, Leibold W:
Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4.
Vet Immunol Immunopathol **2000**; 77: 243-256

74. Domzig W, Sstadler BM, Herberman RB:
Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity.
J Immunol **1983**; 130: 1970-1973

75. Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C, Potter TA:
In vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma.
J Clin Invest **1998**; 101: 2404-2414

76. Draghia-Akli R, Hahn KA, King GK, Cummings KK, Carpenter RH:
Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severly debiliated dogs with cancer.
Mol Ther **2002**; 6: 830-836

77. Dubielzig RR, Everitt J, Shadduck JA, Albert DM:
Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats.
Vet Pathol **1990**; 27: 62-65

78. Dunham SP, Argyle DJ, Onions DE:
The isolation and sequence of canine interleukin-2.
DNA Seq **1995**; 5: 177-180

79. Dunham SP, Onions DE:
Isolation, nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding feline granulocyte colony-stimulating factor.
Cytokine **2001**; 14: 347-351

80. Dunham SP, Bruce J:
Isolation, expression and bioactivity of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Gene **2004**; 332: 97-106

81. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM:
Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview.
J Gene Med **2004**; 6: 597-602

82. Eisner RM, Husain A, Clark JI:
Case report and brief review: IL-2-induced myocarditis.
Cancer Invest **2004**; 22: 401-404

83. Ellison MD, Povlishock JT, Merchant RE:
Blood-brain barrier dysfunction in cats following recombinant interleukin-2 infusion.
Cancer Res **1987**; 47: 5765-5770

84. Elmslie RE, Dow SW, Ogilvie GK:
Interleukins: biological properties and therapeutic potential.
J Vet Intern Med **1991**; 5: 283-293

85. Elmslie RE, Dow SW:
Genetic immunotherapy for cancer.
Semin Vet Med Surg (Small Anim) **1997**; 12: 193-205

86. English LA, Binns RM, Licence ST:
Characterization of pig T cell growth factor and its species-restricted activity on human, mouse and sheep cells.
Vet Immunol Immunopathol **1985**; 9: 59-69

87. Esplin DG, Bigelow M, McGill LD, Wilson SR:
Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection site in a cat.
Vet Cancer Soc Newsletter **1999**; 23: 8-9

88. Farrar WL, Johnson HM, Farrar JJ:
Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2.
J Immunol **1981**; 126: 1120-1125

89. Farrar MA, Schreiber RD:
The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor.
Ann Rev Immunol **1993**; 11: 571-611

90. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M:
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proc Natl Acad Sci USA **1987**; 84: 7413-7417

91. Fenwick BW, Schore CE, Osburn BI:
Human recombinant interleukin-2(125) induced in vitro proliferation of equine, caprine, ovine, canine and feline peripheral blood lymphocytes.
Comp Immunol Microbiol Infect Dis **1988**; 11: 51-60

92. Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C:
Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery.
Gene Ther **2000**; 7: 1183-1192

93. Fischer A, Abina SH, Thrasher A, von Kalle C, Cavazzana-Calvo M:
LMO2 and gene therapy for severe combined immunodeficiency
N Engl J Med. **2004**, 350: 2526-2527

94. Fischer HG, Frosch S, Reske K, Reske-Kunz AB:
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function.
J Immunol **1988**; 141: 3882-3888

95. Foa R, Guarini A, Gänsbacher B:
IL2 treatment for cancer: from biology to gene therapy.
Br J Cancer **1992**; 66: 992-998

96. Foley R, Ellis R, Walker I, Wan Y, Carter R, Boyle M, Bracial T, Addison C, Graham F, Gauldie J:
Intramarrow cytokine gene transfer by adenoviral vectors in dogs.
Hum Gene Ther **1997**; 8: 545-553

97. Fong S, Doyle MV:
Response of bovine and porcine peripheral blood mononuclear cells to human recombinant interleukin 2(125).
Vet Immunol Immunopathol **1986**; 11: 91-100

98. Forrest ML, Meister GE, Koerber JT, Pack DW:
Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery.
Pharma Res **2004**; 21: 365-371

99. Frewert S, Stockhammer F, Warschewske G, Zenclussen AC, Rupprecht S, Volk HD, Woiciechowsky C:
Intratumoral infusion of interleukin-1beta and interferon-gamma induces invasion with macrophages and lymphocytes in a rat glioma model.
Neurosci Lett **2004**; 364: 145-148

100. Friess W:
Collagen - biomaterial for drug delivery.
Euro J Pharmac and Biopharmac **1998**; 45: 113-136

101. Frisbie DD, McIlwraith CW:
Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis.
Clin Orthop **2000**; 379 Suppl: S273-287

102. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW:
Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene.
Gene Ther **2002**; 9: 12-20

103. Fujita T:
Molecular cloning of human and murine interleukin-2 genes and their expression in various host cells.
J Invest Dermatol **1985**; 85 (1 Suppl): 180s-182s

104. Gänsbacher B:
Cytokine gene therapy.
Mt Sinai J Med **1994**; 61: 301-309

105. Gänsbacher B:
Policy statement on the social, ethical and public awareness issues in gene therapy.
J Gene Med **2002**; 4: 687-691

106. Gascan H, Moreau JF, Jacques Y, Soulillou JP:
Response of murine IL3-sensitive cell lines to cytokines of human and murine origin.
Lymphokine Res **1989**; 8: 79-84

107. Gaucher D, Chadee K:
Molecular cloning and expression of gerbil granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.
Gene **2002**; 294: 233-238

108. Geiger M, Li RH, Friess W:
Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2.
Adv Drug Del Rev **2003**; 55: 1613-1629

109. Gillis S, Smith KA:
Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells.
Nature **1977**; 268: 154-156

110. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA:
T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity.
J Immunol **1978**; 120: 2027-2032

111. GenBank des NCBI, **2004**
www2.ncbi.nkm.nih.gov/cgi.bin/genbank

112. Gobar GM, Kass PH:
World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats.
J Am Vet Med Assoc **2002**; 220: 1477-1482

113. Goitsuka R, Hirota Y, Hasegawa A, Tomoda I:
Feline interleukin 2 activity.
Nippon Juigaku Zasshi **1986** ; 48 : 529-537

114. Gonsalves SF, Landgraf BE, Ciardelli TL, Borison HL:
Early toxicity of recombinant interleukin-2 in cats.
Arch Int Pharmacodyn Ther **1991**; 310: 175-185

115. Goodall JC, Emery DC, Perry AC, English LS, Hall L:
cDNA cloning of ovine interleukin 2 by PCR.
Nucleic Acids Res **1990**; 18: 5883

116. Goodall JC, Emery DC, Bailey M, English LS, Hall L:
cDNA cloning of porcine interleukin 2 by polymerase chain reaction.
Biochim Biophys Acta **1991**; 1089: 257-258

117. Gough NM, Gouch J, Metcalf D, Leso A, Grail D, Nicola NA, Burgess AW, Dunn AR:
Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor.
Nature **1984**; 309: 763-767

118. Gray PW, Leung DW, Pennica D, Yelverton E, Najarian R, Simonsen CC, Derynck R, Sherwood PJ, Wallace DM, Berger SL, Levinson AD, Goeddel, DV:
Expression of human interferon cDNA in E. coli and monkey cells.
Nature **1982**; 295: 503-508

119. Gray PW, Goeddel DV:
Structure of the human immune interferon gene.
Nature **1982**; 298:859-863

120. Gray PW, Goeddel DV:
Cloning and expression of murine interferon cDNA.
Proc Natl Acad Sci USA **1983**; 80: 5842-5846

121. Gribben JG, Devereux S, Thomas NS, Keim M, Jones HM, Goldstone AH, Linch DC:
Development of antibodies to unpotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF.
Lancet **1990**; 335: 434-437

122. Grösslinger K, Alton K, Lorison D:
Histologische Bestimmung der Tumorgrenzen und Evaluierung der Rezidivrate beim felinen vakzine-induzierten Fibrosarkom.
Kleintierprax **2003**; 48: 261-268

123. Grüning G, Himmler A, Antczak DF:
Cloning and sequencing of horse interferon cDNA.
Immunogenetics **1994**; 39: 448-449

124. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Lebouloch P, Lim A, Asbourne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergest U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calco M:
LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.
Science **2003**; 302: 415-419

125. Hallek M, Büning H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendter CM:
Grundlagen der Gentherapie: Prinzipien und Stand der Entwicklung.
Internist (Berl) **2001**; 42: 1306-1313

126. Hammerschmid E:
Persönliche Mitteilung, München, November **2002**

127. Hampel V:
Vet Med Diss, in Vorbereitung, München

128. Hantzopoulos PA, Gänsbacher B:
Gentherapie - Stand und Ausblick.
Chirurg **1996**; 67: 980-983

129. Harms JS, Splitter GA:
Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promotors but augments expression driven by the mammalian MHC I promotor.
Hum Gene Ther **1995**; 6: 1291-1297

130. Hartmann K:
Impfungen - notwendig, überflüssig, schädlich?
Vortrag, München, **2003**

131. Hartmann M:
Einsatz von Interferonen in der Kleintiermedizin.
Veterinärspiegel **2003**; 2: 85-90

132. Heike M, Schlaak J, Schulze-Bergkamen H, Heyl S, Herr W, Schmitt U, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH:
Specificities and functions of CD4+ HLA class II-restricted T cell clones against a human sarcoma: evidence for several recognized antigens.
J Immunol **1996**; 156:2205-2213

133. Heimann DM, Schwartzentruber DJ:
Gastrointestinal perforations associated with interleukin-2 administration.
J Immunother **2004**; 27; 254-258

134. Heiss MM, Lamerz R, Lersch C, Schlimok G, Weber B:
Tumorimmunologie und Tumorendokrinologie.
Manual Gastrointestinale Tumoren **2001**, Tumorzentrum München

135. Helfand SC, Soergel SA, MacWilliams PS, Hank JA, Sondel PM:
Clinical and immunological effects of human recombinant interleukin-2 given by repetitive weekly infusion to normal dogs.
Cancer Immunol Immunother **1994**; 39: 84-92

136. Helfand SC, Soergel SA, Modiano JF, Hank JA, Sondel PM:
Induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in canine lymphocytes with low dose human rekombinant interleukin-2 in vitro.
Cancer Biother **1994**; 9: 237-244

137. Hendrick MJ, Goldschmidt MH:
Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats?
J Am Vet Med Assoc **1991**; 199: 968

138. Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP:
Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminium.
Cancer Res **1992**; 52:5391-5394

139. Hendrick MJ, Brooks JJ:
Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry.
Vet Pathol **1994**; 31: 126-129

140. Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM:
Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcomas after excision: 61 cases (1986-1996).
J Am Vet Med Assoc **2000**; 216: 58-61

141. Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ:
Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenic protein-7.
J Orthop Res **2003**; 21: 573-583

142. Hirai T, Oikawa M, Inumaru S, Yokomizo Y, Kusakari N, Mori K:
Effects of recombinant bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on bovine peripheral blood neutrophil functions in vitro and in vivo.
J Vet Med Sci **1999**; 61: 1249-1251

143. Hirschberger J, Kessler M:
Das feline Fibrosarkom.
Tierärztl Prax **2001**; 29: 66-71

144. Hofer C, van Randenborgh H, Lehmer A, Hartung R, Breul J:
Transcutaneous IL-2 uptake mediated by Transfersomes depends on concentration and fractionated application.
Cytokine **2004**; 25: 141-146.

145. Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, Albertini MR, Dubielzig RR, Keller ET, Yang NS, MacEwen EG:
Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines fort he treatment of spontaneous canine cancer.
Hum Gene Ther **1998**; 9: 1851-1861

146. Hornick JL, Khawli LA, Hu P, Sharifi J, Khanna C, Epstein AL:
Pretreatment with a monoclonal antibody/interleukin-2 fusion protein directed against DNA enhances the delivery of therapeutic molecules to solid tumors.
Clin Cancer Res **1999**; 5: 51-60

147. Howell JM, Lochmüller H, O´Hara A, Fletcher S, Kakulas BA, Massie B, Nalbantoglu J, Karpati G:
High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: prolongation of expression with immunosuppression.
Hum Gene Ther **1998**; 9: 629-634

148. Huang A, Scougall CA, Lowenthal JW, Jilbert AR, Kotlarski I:
Structural and functional homology between duck and chicken interferon-gamma.
Dev Comp Immunol **2001**; 25: 55-68

149. Hunt P, McConnell I, Grant CK, Else RW, Hopkins J:
Variable expression of major histocompatibility complex class II in the domestic cat.
Res Vet Sci **1995**; 59: 195-200

150. Inoue Y, Itou T, Oike T, Sakai T:
Cloning and sequencing of the bottle-nosed dolphik (Tursiops truncatus) interferon-gamma gene.
J Vet Med Sci **1999**; 61: 939-942

151. InterMune:
Actimmune - Product information **2002**

152. Inumaru S, Takamatsu H:
cDNA cloning of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Immunol Cell Biol **1995**; 73: 474-476

153. Iwata H, Yamamoto M, Hasegawa A, Kurata K, Inoue T:
Expression of porcine interleukin-2 in Escherichia coli.
J Vet Med Sci **2000**; 62: 1101-1104

154. Jacobs JJ, Sparendam D, Den Otter W:
Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumourally.
Cancer Immunol Immunother **2005**

155. Jain A, Slansky JE, Matey LC, Allen HE, Pardoll DM, Schulick RD:
Synergistic effect of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor vaccine and systemic interleukin-2 in the treatment of murine colorectal cancer hepatic metastases.
Ann Surg Oncol **2003**; 10: 810-820.

156. Jorger K:
Hauttumoren bei Katzen. Vorkommen und Häufigkeit im Untersuchungsgut (Biopsien 1984-1987) des Instituts für Veterinärpathologie Zürich.
Schweiz Arch Tierheilk **1988**; 130: 559-569

157. Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P:
Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2).
Gene Ther **2003**; 10: 2126-2132

158. Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P:
Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle.
Clin Diagn Lab Immunol **2002**; 9: 453-460

159. Kamijo R, Shapiro D, Le J, Huang S, Aguet M, Vilcek J:
Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor.
Proc Natl Acad Sci USA **1993**; 90: 6626-6630

160. Kashima N, Nishi-Takaoka C, Fujita T, Taki S, Yamada G, Hamuro J, Taniguchi T:
Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs.
Nature **1985**; 313: 402-404

161. Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR:
Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats.
J Am Vet Med Assoc **1993**; 201: 396-405

162. Katayama R, Huelsmeyer MK, Marr AK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM:
Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activitiy and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma.
Cancer Chemother Pharmacol **2004**; 54: 25-33

163. Kaushansky K:
The molecular biology of the colony-stimulating factors.
Blood Cells **1987**; 13: 3-15

164. Keller ET, Burkholder JK, Shi F, Pugh TD, McCabe D, Malter JS, MacEwen EG, Yang NS, Ershler WB:
In vivo particle-mediated cytokine gene transfer into canine oral mucosa and epidermis.
Cancer Gene Ther **1996**; 3: 186-191

165. Kempf C:
Nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFNγ und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze - eine klinische Phase I-Studie.
Vet Med Diss, in Vorbereitung, München

166. Kessler M:
Studies on the epidemiology of feline vaccine-associated fibrosarcomas in Germany.
Abstr FECAVA, Berlin **2001**

167. Kessler M:
Das Fibrosarkom bei der Katze.
Abstr Fortbildungsveranstaltung Katzenkrankheiten, Boehringer Ingelheim, Nürnberg **2003**

168. Khanna C, Anderson PM, Hasz DE, Katsanis E, Neville M, Klausner JS:
Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases.
Cancer **1997**; 79: 1409-1421

169. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O:
Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study.
J Gene Med **2001**; 3: 135-144

170. Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML:
Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas.
Am J Vet Res **2001**; 62: 1990-1994

171. King GK, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR:
The effect of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on sontaneous canine and feline fibrosarcomas.
J Am Anim Hosp Assoc **1995**; 31: 439-447

172. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F:
Establishment and charcterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin.
J Cell Physiol **1989**; 140: 323-334

173. Kjaergaard N, Wiedmann K, Brill T, Köstlin R, Ludwig J, Wieland S, Henke J, Schillinger U, Gänsbacher B, Hirschberger J:
Phase I-Studie zur adjuvanten Therapie des felinen Fibroarkoms mit GM-CSF.
Abstr. (Vortrag), DVG-Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Labordiagnostik", München, **2003**

174. Klimp AH, deVries EG, Scherphof GL, Daemen T:
A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer.
Crit Rev Oncol Hematol **2002**; 44: 143-161

175. Knapp DW, Williams JS, Andrisani OM:
Cloning of the canine interleukin-2-encoding cDNA.
Gene **1995**; 159: 281-282

176. Krieg AM:
Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy.
J Gene Med **1999**; 1: 56-63

177. Kuball J, Huber C, Schuler M:
Gentherapie solider Tumore.
Internist (Berl) **2001**; 42: 1321-1327

178. LeCouteur RA:
Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumors in dogs and cats.
J Small Anim Pract **1999**; 40: 411-416

179. Leong SR, Flaffs GM, Lawman MJ, Gray PW:
Cloning and expression of the cDNA for bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Vet Immunol Immunopathol **1989**; 21: 261-278

180. Lindsay P, Schulera U, Sonneborn HH:
The species specificity of interleukin 2.
In: Khan A, Hill NO, Dumonde DC (Hrsg.):
Human lymphokines, Academic Press, New York **1982**; 479-485

181. Linenberger ML, Deng T:
The effects of feline retroviruses on cytokine expression.
Vet Immunol Immunopathol **1999**; 72: 343-368

182. Liu G, Ashbourne Excoffon KJ, Wilson Je, McManus BM, Rogers QR, Miao L, Katelein JJ, Lewis ME, Hayden MR:
Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer.
Hum Gene Ther **2000**; 11: 21-32

183. Loa CC, Hsieh MK, Wu CC, Lin TL:
Molecular identification and characterization of turkey IFN-gamma gene.
Comp Bichem Physiol B Biochem Mol Biol **2001**; 130: 579-584

184. Löcher A:
Vet Med Diss, in Vorbereitung, München

185. Loftus DJ, Squarcina P, Nielsen MB, Geisler C, Castelli C, Odum N, Appella E, Parmiani G, Rivoltini L:
Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8+ T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitope MART1(27-35).
Cancer Res **1998**; 58: 2433-2439

186. Lohr F, Hu K, Huang Q, Zhang L, Samulski TV, Dewhirst MW, Li CY:
Enhancement of radiotherapy by hyperthermia-regulated gene therapy.
Int J Radiat Oncol Biol Phys **2000**; 48: 1513-1518

187. Lohr F, Huang Q, Hu K, Dewhirst MW, Li CY:
Systemic vector leakage and transgene expression by intratumorally injected recombinant adenovirus vectors.
Clin Cancer Res **2001**; 7: 3625-3628

188. Lollini PL, Bosco MC, Cavallo F, De Giovanni C, Giovarelli M, Landuzzi L, Musiani P, Modesti A, Nicoletti G, Palmieri G, et al.:
Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene.
Int J Cancer **1993**; 55: 320-329

189. Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlan JM, Klebanoff SJ, Waltersdorph A, Wong G, Clark SC, Vadas MA:
Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival.
J Clin Invest **1986**; 78: 1220-1228

190. Lotze MT, Grimm EA, Mazunder A, Strausser JL, Rosenberg SA:
Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor.
Cancer Res **1981**; 41: 4420-4425

191. Lowenthal JW, O`Neil TE, David A, Strom G, Andrew ME:
Cytokine therapy: a natural alternative for diesease control.
Vet Immunol Immunopathol **1999**; 72: 183-188

192. Ludwig J, Wieland S, Homann H, Köstlin R, Brill T, Wiedmann K, Kjaergaard N, Henke J, Schillinger U, Erhardt W, Gänsbacher B, Hirschberger J:
Phase II-Studie zur adjuvanten Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Ad-IL-2 und Ad-IFNγ.
Abstr. (Vortrag), DVG-Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Labordiagnostik", München, **2002**

193. Macy DW:
The potential role and mechanism of FeLV vaccine-induced neoplasms.
Semin Vet Med Surg (Small Anim) **1995**; 10: 234-237

194. Macy DW, Hendrick MJ:
The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats.
Vet Clin North Am Small Anim Pract **1996**; 26: 103-109

195. Macy DW, Couto CG:
Prevention and treatment of injeciton-site sarcomas.
J Fel Med Surg **2001**; 3: 169-170

196. Mahvi DM, Conhaim RL, Harms BA, Storm FK:
Interleukin-2 does not sequester activated lymphocytes into lung lymph of sheep.
J Surg Res **1996**; 60: 163-167

197. Maini A, Nishisake N, Kinoshita Y, Jones RF, Wang CY, Haas GP:
Combination of radiation and vaccination with autologous tumor cells expressing IL-2, IFN-gamma and GM-CSF for treatment of murine renal carcinoma.
In Vivo **2003**; 17: 119-123

198. Maliszewski CR, Schoenborn MA, Cerretti DP, Wignall JM, Picha KS, Cosman D, Tushinski RJ, Gillis S, Baker PE:
Bovine GM-CSF: molecular cloning and biological activity of the recombinant protein.
Mol Immunol **1988**; 25: 843-850

199. Marini FC 3rd, Cannon JP, Belmont JW, Shillioe EJ, Lapeyre JN:
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 **1995**; 6: 1215-1223

200. Marsters SA, Pennica D, Bach E, Schreiber RD, Ashkenazi A:
Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain.
Proc Natl Acad Sci USA **1995**; 92: 5401-5405

201. Martin R, Schwulera U, Menke G, Rudolph W, Buch K, Fasold H, Lissner R, Thrun A, Krauseneck P, Bogdahn U:
Interleukin-2 and blood brain barrier in cats: pharmacokinetics and tolerance following intrathecal and intravenous administration.
Eur Cytokine Netw **1992**; 3: 399-406

202. Matsuguchi T, Zhao Y, Lilly MB, Kraft AS:
The cytoplasmic domain of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor alpha subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation.
J Biol Chem **1997**; 272: 17450-17459

203. Matteucci ML, Anyarambhatla G, Rosner G, Azuma C, Fisher PE, Dewhirst MW, Needham D, Thrall DE:
Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas.
Clin Cancer Res **2000**; 6: 3748-3755

204. Mauel S:
Klonierung und Expression von eq.IFNg, eq.GM-CSF und eq.IL-4 und deren Einfluß auf die monozytären Zellen des Pferdes.
Vet Med Diss, Berlin **2002**

205. Mauz-Korholz C, Banning U, Korholz D:
Regulation of interleukin-2 induces soluble Fas ligand release from human peripheral blood mononuclear cells.
Immunol Invest **2004**; 33: 251-260

206. Mayr A:
Development of a non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: a new type of vaccine.
New Microbiol **2003**; 26: 7-12

207. McInnes CJ, Logan M, Redmond J, Entrican G, Baird GD:
The molecular cloning of the ovine gamma-interferon cDNA using the polymerqase chain reaction.
Nucleic Acids Res **1990**; 18: 4012

208. McInnes CJ, Haig DM:
Cloning and expression of a cDNA encoding ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Gene **1991**; 105: 275-279

209. McKnight AJ, Mason DW, Barclay AN:
Sequence of rat interleukin 2 and anomalous binding of a mouse interleukin 2 cDNA probe to rat MHC class II-associated invariant chain mRNA.
Immunogenetics **1989**; 30: 145-147

210. McLachlan G, Davidson H, Davidson D:
DOTAP as a vehicle for efficient gene delivery in vitro and in vivo.
Biochemica **1994**; 11: 19-21

211. McNiel EA:
Vaccine-associated sarcomas in cats: a unique cancermodel.
Clin Orthop **2001**; 382: 21-27

212. Melero I, Bach N, Chen L:
Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens.
Life Sci **1997**; 60: 2035-2041

213. Metcalf D, Johnson GR, Burgess AW:
Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells.
Blood **1980**; 55: 138-147

214. Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF, Williamson DJ, Wong GG, Clark SC, Wang WA:
Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood **1986**; 67: 37-45

215. Minagawa T, Ishiwata K, Kajimoto T:
Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection.
Vet Microbiol **1999**; 69: 51-53

216. Mir LM, Roth C, Orlowski S, Quintin-Colonna F, Fradelizi D, Belehradek J Jr, Kourilsky P:
Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2.
J Immunther Emphasis Tumor Immunol **1995**; 17: 30-38

217. Mir LM, Devauchelle P, Quintin-Colonna F, Delisle F, Doliger S, Fradelizi D, Belehradel J Jr, Orlowski S:
First clinicl trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemtherapy.
Br J Cancer **1997**; 76: 1617-1622

218. Monroy RL, Davis TA, MacVittie TJ:
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: more than a hemopoietin.
Clin Immuno Immunopathol **1990**; 54: 333-346

219. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R:
Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.
Science **1976**; 193: 1007-1008

220. Mosmann T:
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
J Immunol Methods **1983**; 65: 55-63

221. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL:
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
J Immunol **1986**; 136: 2348-2357

222. Mount JD, Herzog RW, Tillson DM, Goodman SA, Robinson N, McClelland ML, Bellinger D, Nichols TC, Arruda VR, Lothrop CD Jr, High KA:
Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with factor IX nullmutation by liver-directed gene therapy.
Blood **2002**; 99: 2670-2677

223. Muldoon LL, Neuwelt EA, Pagel MA, Weiss DL:
Characerisation of the molecular defect in a feline model for type II GM2-gangliosidosis (Sandhoff disease).
Am J Pathol **1994**; 144: 1109-1118

224. Mullen JT, Tanabe KK:
Viral oncolysis.
Oncologist **2002**; 7: 106-119

225. Müller-Heidelberg M:
Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze - Zytokinkinetik und humorale Antwort auf Vektor und Transgen.
Vet Med Diss, München **2003**

226. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H:
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Sprin Harb Symp Quant Biol **1986**; 51: 263-273

227. Munday JS, Stedman NL, Richey LJ:
Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas.
Vet Pathol **2003**; 40: 288-293

228. Murakami K, Uchiyama A, Kohuho T, Mori Y, Yada T, Tanigawa M, Kuwano A, Nagaya H, Ishiyama S, Kaki H, Yokomizo Y, Inumaru S:
Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by to different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae.
Cytokine **2001**; 13: 18-24

229. Murakami K, Sentsui H, Inoshima Y, Inumaru S:
Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with Bovine Leukemia Virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma.
Vet Immunol Immunopathol **2004**; 101: 61-71

230. Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA:
Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas.
Vet Pathol **2001**; 38: 236-238

231. Narfstrom K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM, Caro L, Lai CM, Rakoczy PE:
Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog.
Invest Ophtalmol Vis Sci **2003**; 44: 1663-1672

232. Nash RA, Schuening F, Appelbaum F, Hammond WP, Boone T, Morris CF, Slichter SJ, Storb R:
Molecular cloning and in vivo evaluation of canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood **1991**; 78: 930-937

233. Nash RA, Schuening FG, Seidel K, Appelbaum FR, Boone T, Deeg HJ, Graham TC, Hackman R, Sullivan-Pepe M, Storb R:
Effect of recombinant canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation.
Blood **1994**; 83: 1963-1970

234. Neefjes JJ, Hensen EJ, de Kroon TI, Ploegh HL:
A biochemical characterization of feline MHC products: ununsually high expression of class II antigens on peripheral blood lymphocytes.
Immunogenetics **1986**; 23: 341-347

235. Niidome T, Huang L:
Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors.
Gene Ther **2002**; 9: 1647-1652

236. Nishikawa Y, Mishima M, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, Mikami T:
Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with Neospora caninum.
Parsitology **2001**; 123: 25-31

237. Noguchi P:
Risks and benefits of gene therapy.
N Engl J Med **2003**; 348: 193-194

238. Nonaka I:
Animal models of muscular dystrophies.
Lab Anim Sci **1998**; 48: 8-17

239. Novosad CA:
Principles of treatment for vaccine-asociated sarcomas.
Clin Tech Small Anim Pract **2003**; 18: 115-117

240. O`Brien PM, Rothel JS, Seow HF, Wood PR:
Cloning and sequencing of the cDNA for ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).
Immunol Cell Biol **1991**; 69: 51-55

241. Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M:
Biomaterials for gene delivery: acetocollagen-mediated controlled release of molecular medicines.
Curr Gene Ther **2001**; 1: 31-52

242. Odbileg R, Lee SI, Yoshida R, Chang KS, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M:
Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity.
Vet Immunol Immunopathol **2004**; 99: 1-10

243. Okano F, Satoh M, Ido T, Okamoto N, Yamada K:
Production of canine INF-gamma in silkworm by recombinant baculovirus and characterization of the product.
J Interferon Cytokine Res **2000**; 20: 1015-1022

244. Ortmann U:
Die Hauttumoren der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Fibrosarkome.
Vet Med Diss, München **1986**

245. Pan PY, Li Y, Li Q, Gu P, Martinet O, Thung S, Chen SH:
In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-SF gene delivery.
Cancer Immunol Immunother **2004**; 53: 17-25

246. Panelli MC, White R, Foster M, Martin B, Wang E, Smith K, Marincola FM:
Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration.
J Transl Med **2004**; 2: 17

247. Pardoll DM, Topalian SL:
The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity.
Curr Opin Immunol **1998**; 10: 588-594

248. Pawelec G:
Immunotherapy and immunoselection - tumour escape as the final hurdle.
FEBS Lett **2004**; 567: 63-66

249. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE:
Interferons and their actions.
Ann Rev Biochem **1987**; 56: 727-777

250. Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C, Anton M:
Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with supermagnetic nanoparticles and magentic fields.
J Liposome Res **2003**; 13: 29-32

251. Pollack MS, Hayes A, Mooney S, Pedersen NC, Cook RG:
The detection of conventional class I and class II I-E homologue major histocompatibility complex molecules on feline cells.
Vet Immunol Immunopathol **1988**; 19: 79-91

252. Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS:
Promotor attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression.
Hum Gene Ther **1997**; 8: 2019-2029

253. Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M:
Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2.
Gene Ther **1996**; 3: 1104-1112

254. Radford AJ, Hodgson AL, Rothel JS, Wood PR:
Cloning and sequencing of the ovine gamma-interferon gene.
Aust Vet J **1992**; 68: 82-84

255. Rawle FE, Lillicrap D:
Preclinical animal models for hemophilia gene therapy: predictive value and limitations.
Semin Thromb Hemost **2004**; 30: 205-213

256. R&D Systems:
Recombinant feline IFNγ (Catalog Number 764-FG) - *Product information* **2001**

257. R&D Systems.
Recombinant feline GM-CSF (Catalog Number 987-FL) - *Pruduct information* **2001**

258. R&D Systems:
Anti-feline IFNg Antibody (Catalog Number AF764) - *Ordering information* **2001**

259. Reeves R, Spies AG, Nissen MS, Buck CD, Weinberf AD, Barr PJ, Magnuson NS, Magnuson JA:
Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA.
Proc Natl Acad Aci USA **1986**; 83: 3228-3232

260. Ribas G, Butterfield LH, Economou JS:
Genetic immunotherapiy for cancer
The Oncologist **2000**; 5:87-98

261. Rickard CG, Post JE, Noronha F, Barr LM:
A transmissible virus-induces lymphocytic leukemia of the cat.
J Natl Cancer Inst **1969**; 42: 987-1014

262. Rideout BA, Moore PF, Pedersen NC:
Persistent upregulation of MHC class II antigen espression on T-lymphocytes from cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus.
Vet Immunol Immunopathol **1992**; 35: 71-81

263. Rimstad E, Reubel GH, Dean GA, Higgins J, Pedersen NC:
Cloning, expression and charqacterization of biologically acive feline tumour necrosis factor-alpha.
Vet Immunol Immunopathol **1995**; 45: 297-310

264. Ritter T, Brandt C, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, Volk HD:
Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promotor activity in human endothelial cells.
Cytokine **2000**; 12: 1163-1170

265. Roche Diagnostics:
Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Faktor, human (hGM-CSF) - *Product information* **2002**

266. Roche Diagnostics:
Interleukin-2, human (hIL-2) - *Product information* **2002**

267. Roskrow MA, Gänsbacher B:
Recent developments in gene therapy for oncology and hematology.
Crit Rev Oncol Hematol **1998**; 28: 139-151

268. Roth C, Mir LM, Cressent M, Quintin-Colonna F, Levy V, Fradelizi D, Kourilsky P:
Inhibition of tumor growth by histoincompatible cells expressing interleukin-2.
Int Immunol **1992**; 4: 1429-1436

269. Roth JA, Cristiano RJ:
Gene therapy for cancer: what have we done and were are we going?
J Natl Cancer Inst **1997**; 89: 21-39

270. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR:
A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle.
Aust Vet J **1990**; 67: 134-137

271. Rudolph C, Schillinger U, Plank C, Gessner A, Nicklaus P, Muller R, Rosenecker J:
Nonviral gene deivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine.
Biochem Biophys Acta **2002**; 1573: 75-83

272. Ruiz-Cabello F, Garrido F:
Tumor evasion of immune system.
In: Parmiani G, Lotze MT (Hrsg): *Tumor immunology*
Taylor & Francis, London, **2002**; 1: 177-203

273. Ruiz de Almodovar D, Lopez-Rivas A, Ruiz-Ruiz C:
Interferon-gamma and TRAIL in human breast tumor cells.
Vitam Horm **2004**; 67: 291-318

274. Rutten V:
Canine interferon-gamm as an adjuvant in immunisation of dogs with Leishmania crude antigens.
www.stw.nl/projecten/U/udg3703.html; **1999**

275. Scallan CD, Lillicrap D, Jiang H, Qian X, Patarroyo-White SL, Parker AE, Liu T, Vargas J, Nagy D, Powell SK, Wright JF, Turner PV, Tinlin SJ, Webster SE, McClelland A, Couto LB:
Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector.
Blood **2003**; 102: 2031-2037

276. Scheerlinck JP:
Functional and structural comparison of cytokines in different species.
Vet Immunol Immunopathol **1999**; 72: 39-44

277. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, Gänsbacher B, Plank C:
Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo.
Gene Ther **2002**; 9: 102-109

278. Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C:
Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo.
J Gene Med **2002**; 4: 634-643

279. Schijns VE, Wierda CM, Vahlenkamp TW, Horzinek MC, de Groot RJ:
Molecular cloning and expression of cat interferon-gamma.
Immunogenetics **1995**; 42: 440-441

280. Schijns VE, Wierda CM, van Dam EJ, Vahlenkamp TW, Horzinek MC:
Molecular cloning of cat interleukin-4.
Immunogenetics **1995**; 42: 434-435

281. Schijns VE, Horzinek MC:
Cytokines in Veterinary Medicine.
Cab International, Wallingford, UK, **1997**

282. Schijns VE, Scholtes NC, Zuilekom HI, Sanders LE, Nicolson L, Argyle DJ:
Facilitation of antibody forming response to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline IFN-gamma.
Vaccine **2002**; 20: 1718-1724

283. Schillinger U:
Verschiedene Applikationsformen nicht-viraler Genvektoren im Tiermodell unter besonderer Berücksichtigung des lokalen Gentransfers.
Vet Med Diss, München **2002**

284. Schillinger U, Kjaergaard N, Wiedmann K, Löcher A, Schlemmer S, Schwarz B, Kempf T, Hirschberger J, Köstlin R, Plank C, Gänsbacher B, Brill T:
Immuno gene therapy of feline fibrosarcoma using intratumoral Magnetofection for gene delivery - Preliminary results of a veterinary clinical study.
Abstr, ASGT-Kongress, Minneapolis, USA, Juni **2004**

285. Schmidinger M, Steger G, Wenzel C, Locker GJ, Budinsky AC, Brodowicz T, Kramer G, Marberger M, Zielinski CC:
Sequential administration of interferon-gamma, GM-CSF, and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial.
J Immunther **2001**; 24: 257-262

286. Schlemmer-Petters S:
Vet Med Diss, in Vorbereitung, München

287. Scholdra D:
Lokaler Gentransfer in vivo mit Kollagenschwämmen als Träger für Genvektoren - Etablierung eines Tiermodells.
Vet Med Diss, München **2001**

288. Schreiber RD:
Measurement of mouse and human Interferon g.
In: *Current protocols on Immunology* **2000**; 6.8.1-6.8.7; John Wiley and Sons, Inc.

289. Schuening FG, Storb R, Goehle S, Nash R, Graham TC, Appelbaum FR, Hackman R, Sandmaier BM, Urdal DL:
Stimulation of canine hematopoiesis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Exp Hematol **1989**; 17: 889-894

290. Schwartz RN, Stover L, Dutcher J:
Managing toxicities of high-dose interleukin-2.
Oncology (Huntingt) **2002**; 16 (11 Suppl 13):11-20

291. Schwartzentruber D, Lotze MT, Rosenberg SA:
Colonic perforation: An unusual complication of the therapy with high-dose interleukin-2.
Cancer **1998**; 62: 2350-2353

292. Seguin B:
Injection site sarcomas in cats.
Clin Tech Small Anim Pract **2002**; 17: 168-173

293. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S:
HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells.
Semin Cancer Biol **2002**; 12: 3-13

294. Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, Yokoyama T, Inumaru S:
Anti-viral effect of recombinant bovine interferon gamma on bovine leukaemia virus.
Cytokine **2001**; 16: 227-231

295. Seow HF, Rothel JS, Radford AJ, Wood PR:
The molecular cloning of ovine interleukin 2 gene by the polymerase chain reaction.
Nucleic Acids Res **1990**; 18: 7175

296. Serotec:
Mouse anti feline MHC class II - Serotec Product Datasheet MCA2040S **2002**

297. Shi FS, Weber S, Gan J, Rakhmilevich AL, Mahvi DM:
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF.
Cancer Gene Ther **1999**; 6: 81-88

298. Shin IS, Nam MJ, Park SJ, Youn HY, Han HR:
Cloning of canine GM-CSF and SCF genes.
J Vet Sci **2001**; 2: 159-166

299. Shoda LK, Brown WC, Rice-Ficht AC:
Sequence and characterization of phocine interleukin 2.
J Wildl Dis **1998**; 34: 81-90

300. Simpson E:
Immunotherapy and gene therapy:
IDrugs **2004**; 7: 105-108

301. Slobbe L, Lockhart E, Jones S, Kelly J, Buchan G:
The production and biological assessment of cervine interferon gamma.
Cytokine **2000**; 12: 1211-1217

302. Somani J, Lonial S, Rosenthal H, Resnick S, Kakhniashvili I, Walle EK:
A randomized, placebo-controlled trial of subcutaneous administration of GM-CSF as a vaccine adjuvant: effect on cellular and humoral immune responses.
Vaccine **2002**; 21: 221-230

303. Spirito F, Charlesworth A, Linder K, Ortonne JP, Baird J, Meneguzzi G:
Animal models for skin blistering conditions: absence of laminin 5 causes hereditary junctional mechanobullous disease in the Belgian horse.
J Invest Dermatol **2002**; 119: 684-691

304. Steger-Lieb A, Kostorz A, Hauser B, Sumova A, Kaser-Hotz B:
Einsatz der Strahlentherapie bei vakzine-assoziierten Sarkomen der Katze.
Erfahrungen aus 18 Fällen (1994-1999).
Tierärztl Prax **2002**; 30: 35-40

305. Steinbach F, Mauel S, Beier I:
Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity.
Vet Immunol Immunopathol **2002**; 84: 83-95

306. Steinbach F, Wolfinger U, Roes F:
Treatment of fibrosarcomas in dogs by local application of recombinant human IL-2 - a clinical approach.
Poster und *persönliche Mitteilung* von F. Roes, November **2003**

307. Stepaniak JA, Shuster JE, Hu W, Sundick RS:
Production and in vitro characterization of recombinant chicken interleukin-2.
J Interferon Cytokine Res **1999**; 19: 515-526

308. Stern AC, Jones TC:
The side-effect profile of GM-CSF.
Infection **1992**; 20: 124-127

309. Stevenson LM, Jones DG:
Cross-reactivity amongst recombinant haematopoietic cytokines from different species for sheep bone-marrow eosinophils.
J Comp Pathol **1994**; 111: 99-106

310. Stiglmair-Herb MT:
Hauttumoren bei Katzen - eine retrospektive Studie.
Tierärztl Umschau **1987**; 42: 681-686

311. Sweeney SJ, Emerson C, Eriks IS:
Cloning, sequencing, and expression of interferon-gamma from elk in North America.
J Wildl Dis **2001**; 37: 164-171

312. Takeda K, Okumura K:
Current advances and expectations in tumor immunology.
Hum Cell **2001**; 14: 159-163

313. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J:
Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.
Nature **1983**; 302: 205-310

314. Tatsumi M, Sata T:
Molecular cloning and expression of cynomolgus monkey interferon-gamma.
Int Arch Allergy Immunol **1997**; 114: 229-236

315. Tavernor AS, Allen WR, Butcher GW:
cDNA cloning of equine interleukin-2 by polymerase chain reaction.
Equine Vet J **1993**; 25: 242-243

316. Tennant B:
Feline injection-site fibrosarcomas: resulte of a BSAVA survey.
J Small Anim Pract **2000**; 41: 181-182

317. Tizard IR, Schubot RM (Hrsg.):
Veterinary Immunology: An introduction
WB Saunders, **2004**

318. Thamm DH, Kurzman ID, MacEwen EG, Feinmehl R, Towell TL, Longhofer SL, Johnson CM, Geoly FJ, Stinchcomb DT:
Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors.
Cancer Immunol Immunother **2003**; 52: 473-480

319. Tompkins MB, Ogilvie GK, Franklin RA, Kelley KW, Tompkins WA:
Induction of IL-2 and lymphokine activated killer cells in the cat.
Vet Immunol Immunopathol **1987**; 16: 1-10

320. Tompkins MB, Novotney C, Grindem CB, Page R, English R, Nelson P, Tompkins WA:
Human recombinant interleukin-2 induces maturation and activation signals for feline eosinophils in vivo.
J Leukoc Biol **1990**; 48: 531-540

321. Toray Industries:
Research and Developments
In: *Annual Report* **2001**; 18-19

322. Townsend SE, Allison JP:
Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells.
Science **1993**; 259: 368-370

323. Tüting T, Storkus WJ, Lotze MT:
Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer.
J Mol Med **1997**; 5: 478-491

324. Vaccine Associated Feline Sarcoma Task Force (VAFSTF) **2004**
www.avma.org/vafstf/sitercmnd.asp

325. Vail DM, MacEwen EG:
Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer.
Cancer Invest **2000**; 18: 781-792

326. Vandergrifft EV, Horohov DW:
Molecular cloning and expression of equine interleukin 2.
Vet Immunol Immunopathol **1993**; 39: 395-406

327. Vascellari M, Melchiotti E, Bozza MA, Mutinelli F:
Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **2003**; 50: 286-291

328. Vile R, Russell SJ:
Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer.
Gene Ther **1994**; 1: 88-98

329. Vilsmeier B:
Paramunity-inducing effects of vaccinia strain MVA.
Berl Münch Tierärztl Wochenschr **1999**; 112: 329-333

330. Vogel SN, Friedman RM, Hogan MM:
Measurement of antiviral activity induced by interferons α, β, and γ.
In: *Current protocols on Immunology* **2000**; 6.9.1-6.9.8; John Wiley and Sons, Inc.

331. Walrand F, Picard F, McCullough K, Martinod S, Levy D:
Recombinant bovine interferon-gamma enhances expression of class I and class II bovine lymphocyte antigens.
Vet Immunol Immunopathol **1989**; 22: 379-383

332. Wang Y, Pei G, Cai YC, Zhao ZQ, Wanf JB, Jiang CL, Zheng ZC, Liu XY:
Human interleukin-2 could bind to opioid receptor and induce corresponding signal transduction.
Neuroreport **1996**; 20: 11-14

333. Weisser C:
Anit-Tumor-Immunogentherapie durch nicht-viralen Matrix-vermittelten Gentransfer in murinem B16F10-Melanom-Tiermodell.
Vet Med Diss, München **2005**

334. Wheelock EF:
Interferon-like virus inhibitors induced in human leucocytes by phythemagglutinin.
Science **1965**; 149: 310-311

335. Whitesides TL:
Cytokine assays.
Biotechniques **2002**; 33: 4-15

336. Whitley EM, Bird AC, Zucker KE, Wolfe LG:
Modulation by canine interferon-gamma of major hisocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mamary tumor and melanoma cell lines.
Anticancer Res **1995**; 15: 923-929

337. Wiedmann K:
Klinische Phase I-Studie zur neoadjuvanten immunstimulierenden Therapie des felinen Fibrosarkoms mit Interleukin-2 und Interferon-γ.
Vet Med Diss, München **2005**

338. Wieland S:
Klinische Phase I-Studie zur gentherapeutischen Immunstimulation durch Interleukin-2 und Interferonγ als adjuvanter Behandlung des felinen Fibrosarkoms.
Vet Med Diss, München **2002**

339. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P:
Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.
Biotechniques **1997**; 22: 474-476, 478-481

340. Wolfe JH, Sands MS, Harel N, Weil MA, Parente MK, Polesky AC, Reilly JJ, Hasson C, Weimelt S, Haskins ME:
Gene transfer of low levels of beta-glucuronidase corrects hepatic lysosomal storage on a large animal model of mucopolysacchridosis VII.
Mol Ther **2000**; 2: 552-561

341. Wonderling R, Powell T, Baldwin S, Morales T, Snyder S, Keiser K, hunter S, Best E, McDermott MJ, Milhausen M:
Cloning, expression, purification, and biological activity of five type I interferons.
Vet Immunol Immunopathol **2002**; 89: 13-27

342. Wu D, Murakami K, Liu N, Inoshima Y, Yokoyama T, Kokuho T, Inumaru S, Matsamura T, Kondo T, Nakano K, Sentsui H:
Expression of biologically active recombinant equine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae.
Cytokine **2002**; 20: 63-69

343. Wu GY, Wu CH:
Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system.
J Biol Chem **1987**; 262: 4429-4432

344. Yamamoto A, Iwata A, Tuchiya K, Katsumata A, Oishi K, Saito T, Tsujimoto H, Hasegawa A, Ueda S:
Molecular cloning and expression of the cDNA encoding feline granulocyte colony-stimulating factor.
Gene **2001**; 274: 263-269

345. Yang I, Kremen TJ, Giovannone AJ, Paik E, Odesa SK, Prins RM, Liau LM:
Modulation of major histocompatibility complex Class I molecules and major histo compatibility complex-bound immunogenic peptides induces by interferon-alpha and interferon-gamma treatment of human glioblastoma multiforme.
J Neurosurg **2004**; 100: 310-319

346. Yashiro K, Lowenthal JW, O`Neil TE, Ebisu S, Takagi H, Moore RJ:
High-level production of recombinant chicken interferon-gamma by brevibacillus choshinensis.
Protein Expr Purif **2001**; 23: 113-120

347. Yi Y, Hahm SH, Lee KH:
Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions.
Curr Gene Ther **2005**; 5: 25-35.

348. Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, Anson DS:
Evaluation of fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI.
Biochim Biophys Acta **1999**; 1453: 284-296

349. Yokota T, Arai N, Lee F, Rennick D, Mosmann T, Arai K:
Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells.
Proc Natl Acad Sci USA **1985**; 82: 68-72

350. Young HA, Hardy KJ:
Role of interferon-gamma in immune cell regulation.
J Leukoc Biol **1995**; 58: 373-381

351. Zeiss CJ, Johnson EM, Dubielzig RR:
Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium.
Vet Pathol **2003**; 40: 355-362

352. Zhang Z, de la Concha-Bermejillo A:
Cloning and expression of ovine interferon gamm (oIFN-g).
Sheep and Goat, Wool and Mohair CPR **2002**; 114-120

353. Zier KS, Gänsbacher B:
Tumour cell vaccines that secrete interleukin-2 (IL-2) and interferon gamma (IFN gamma) are recognised by T cells while resisting destruction by natural killer (NK) cells.
Eur J Cancer **1996**; 32A: 1408-1412

354. Zucker K, Lu P, Esquenazi V, Miller J:
Cloning of the cDNA for canine interferon-gamma.
J Interferon Res **1992**; 12: 191-194

VII TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Sequenzierprimer	50
Tab. 2:	Primer	63
Tab. 3:	PCR-Ansatz feIL-2	64
Tab. 4:	PCR-Temperaturprotokoll feIL-2 und feIFNγ	65
Tab. 5:	PCR-Ansatz feGM-CSF	65
Tab. 6:	PCR-Temperaturprotokoll feGM-CSF	66
Tab. 7:	PCR-Ansatz feIFNγ	66
Tab. 8:	Verdau des Plasmids p55pCMV_ivs_luc+ mit Restriktionsenzymen	71
Tab. 9:	Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen	72
Tab. 10:	Ligationsansatz	73
Tab. 11:	PCR-Ansatz Sequenzierprimer	77
Tab. 12:	PCR-Temperaturprotokoll Sequenzierprimer	77
Tab. 13:	FACS-Ansätze	88
Tab. 14:	IL-2 *alignment*	95
Tab. 15:	feGM-CSF *alignment*	99
Tab. 16:	GM-CSF *alignment*	100
Tab. 17:	IFNγ *alignment*	104
Tab. 18:	Aufbau Proliferationstest feIL-2	106
Tab. 19:	Aufbau Proliferationstest feGM-CSF	112

VIII ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Felines Fibrosarkom in typischer Lokalisation mit Tendenz zur Ulzeration	3
Abb. 2:	Schematischer Aufbau des Plasmids p55pCMV_ivs_luc+	68
Abb. 3:	Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme HindIII und FseI	70
Abb. 4:	Elektrophorese des PCR-Produkts der feIL-2 Gen-Amplifikation	92
Abb. 5:	Vektor mit feIL-2 (pBay-feIL-2)	93
Abb. 6:	Vergleich feIL-2 cDNA Sequenzen	94
Abb. 7:	Vergleich feIL-2 Protein	94
Abb. 8:	Elektrophorese des PCR-Produkts der feGM-CSF Gen-Amplifikation	96
Abb. 9:	Vektor mit feGM-CSF (pBay-feGM-CSF)	97
Abb. 10:	Vergleich feGM-CSF cDNA Sequenzen	98
Abb. 11:	Vergleich feGM-CSF Protein	99
Abb. 12:	Vergleich GM-CSF Protein	100
Abb. 13:	Elektrophorese des PCR-Produkts der feIFNγ Gen-Amplifikation	101
Abb. 14:	Vektor mit feIFNγ (pBay-feIFNγ)	102
Abb. 15:	Vergleich feIFNγ cDNA Sequenzen	103
Abb. 16:	Vergleich feIFNγ Protein	104
Abb. 17a und 17b:	Vorversuch zum Proliferationstest feIL-2	105
Abb. 18:	Proliferationstest feIL-2	107
Abb. 19a und 19b:	Standardkurven Proliferationstests feIL-2	108
Abb. 20a und 20b:	Vorversuch zum Proliferationstest feGM-CSF	110
Abb. 21:	Prolifertionstest feGM-CSF	111
Abb. 22a und 22b:	Bilder von TF-1 Zellen	113
Abb. 23a und 23b:	Standardkurven Proliferationstest feGM-CSF	113
Abb. 24:	Probenkurven Proliferationstest feGM-CSF	114
Abb. 25:	Streuungsdiagramm feliner Fibrosarkomzellen	115
Abb. 26:	Durchflusszytomentrische Analyse einer rfeIFNγ-induzierten MHC-Expression auf felinen Fibrosarkomzellen	116
Abb. 27:	Durchflusszytometrische Analyse: MHC I- und MHC II-Expression nach Kultivierung von felinen Fibrosarkomzellen im Überstand pBay-feIFNγ-transfizierter COS-7 Zellen	118
Abb. 28:	Streuungsdiagramm feliner PBMCs	119
Abb. 29:	Durchflusszytometrische Analyse: MHC I- und MHC II-Expression nach Kultivierung von felinen PBMCs mit rfeIFNγ oder mit dem Überstand pBay-feIFNγ-transfizierter COS-7 Zellen	120
Abb. 30:	Mit Plasmid-DNA beschichteter Kollagenschwamm	121
Abb. 31:	Arbeitsverlauf	122

IX ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AAV	adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bidest.	bidestilliert
BMP	*bone morphogenic protein*
bo-	bovines
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca-	canines
ca.	ungefähr
cap-	caprines
CB1954	[5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide]
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
COS-7	Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen
CPE	zytopathischer Effekt
CpG	Cytosin und Guanin verknüpft über Phosphatgruppe
CTCAE	*common terminology criteria for adverse events*
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLL-2	murine zytotoxische T-Zellllinie
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DMD	*duchenne muscular dystrophy*
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-Trimethylammoniopropan
DOTMA	1,2-Dioleoyloxypropyl-3-Trimethylammoniumbromid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*enzyme-linked-immuno sorbent assay*

eq-	equines
et al.	*et alii* (und Mitarbeiter)
Fa.	Firma
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
FCS	fetales Kälberserum
FCV	felines Calici-Virus
fe-	felines
FeLV	felines Leukämie-Virus
FeSV	felines Sarkom-Virus
FHV	felines Herpes-Virus
FIV	feline Immundefizienz-Virus
FIP	feline infektiöse Peritonotis
FITC	*Fluorescein Isothiocyanate Isomer I*
FL1	Fluoreszenz-Kanal 1
FL2	Fluoreszenz-Kanal 2
FL3	Fluoreszenz-Kanal 3
FSA	Fibrosarkom
FSC	*forward scatter*
G	Guanin
GAL-TEK	Fusionsprotein β-Galactosidase und HSV-tk
GAM	*gene activated matrix*
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GHRH	*growthhormone-releasing hormone*
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
hCMV	humanes Cytomegalie Virus
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazin-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSA	humanes Serumalbumin
HSV-tk	Thymidinkinase des Herves simplex Virus
hu-	humanes
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
ivs	*intervening sequence*
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
LAK-Zelle	*lymphokine activated killer cell*
LB	Luria-Bertani
LC	Langerhans`sche Zelle
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Luc	Luciferase
MCS	*multiple cloning site*
M-CSF	Malrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	*major histocompatibility complex*
Mio.	Millionen
M-MLV	*Maloney Murine Leukemia Virus*
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazoliumbromid
mu-	murines
multi-CSF	Interleukin-3
n	Anzahl
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NIH	*National Institutes of Health*
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N/P Verhältnis	Stickstof:Phophat Verhältnis
Nr.	Nummer
NTP	Nukleotidtriphosphat
NTR	Nitroreduktase
Ol-	Oligonukleotid
ori	*origin of replication*
ov-	ovines
PBL	periphere Blutleukozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	*platelet derived growth factor*
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
Pen.	Penicillin
PGE_2	Prostaglandin E_2
PHA	Phythämagglutinin
po-	porcines
PROCOP	*protective copolymer*
P6YE5C	Hüllpolymer mit PEI-Gerüst mit einem MW von 3400
r-	rekombinantes
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SCID	*severe combined immunodeficiency*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEA	Staphylokokkenenterotoxin A
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
snRNA	*small nuclear* Ribonukleinsäure
sog.	sogenannte
SPF	spezifisch pathogen frei
SSC	*side scatter*
Strep.	Streptomycin
STS	*soft tissue sarcoma*
SV 40	Simian Virus 40
SV 40 poly A	Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40
T	Thymin
T75	75 cm^2 Zellkulturflasche
TAA	tumorassoziiertes Antigen

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
TBE	Tris-Borat
TCR	*t-cell receptor*
TCGF	*t-cell growth factor*
TE	Tris-EDTA
TF-1	humane erythroleukämische Zellline
TGFβ	*transforming growth factor* β
TH1	Typ-1-Lymphozytenantwort
TH2	Typ-2-Lymphozytenantwort
TIL	tumorinfiltrierender Lymphozyt
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tp	*total particles*
TRAIL	*TNF-related apoptosis-inducing ligand*
Tris	Trihydroxylmethylaminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TU	Technische Universität
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
VAFSTF	*Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force*
VEGF	*vascular-endothelial growth factor*
vgl.	vergleiche
VSV	Vesikulär-Stomatitis-Virus
WST-1	4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate
XTT	sodium 3´-(1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolim)-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
Da	Dalton
G	*gauge*
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
I. E.	Internationale Einheiten
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MW	Molekulargewicht

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
pg	Pikogramm
rpm	*rounds per minute*
sec	Sekunde
U	*units*
U/min	Umdrehung pro Minute
V	Volt
%	Prozent

1 Proliferationstest feIL-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,74E-02	2,71E-02	2,68E-02	2,31E-02	2,26E-02	2,17E-02	2,60E-02	2,70E-02	2,70E-02	2,24E-02	2,25E-02	2,25E-02
B	7,20E-02	7,29E-02	7,18E-02	2,13E-02	2,10E-02	2,09E-02	4,22E-02	4,27E-02	3,99E-02	2,07E-02	2,07E-02	2,18E-02
C	8,94E-02	8,52E-02	9,30E-02	2,28E-02	2,23E-02	2,18E-02	5,99E-02	6,05E-02	5,92E-02	2,29E-02	2,21E-02	2,30E-02
D	1,17E-01	1,20E-01	1,25E-01	3,95E-02	3,75E-02	3,71E-02	8,02E-02	8,70E-02	8,12E-02	2,97E-02	2,95E-02	3,07E-02
E	1,52E-01	1,59E-01	1,60E-01	1,35E-01	1,30E-01	1,35E-01	9,92E-02	9,37E-02	9,68E-02	9,18E-02	8,63E-02	8,49E-02
F	1,58E-01	1,61E-01	1,62E-01	1,88E-02	1,88E-02	1,92E-02	9,25E-02	9,21E-02	9,60E-02	2,02E-02	2,05E-02	2,19E-02
G	1,62E-01	1,62E-01	1,64E-01	1,41E-01	1,40E-01	1,45E-01	9,54E-02	9,59E-02	1,03E-01	9,31E-02	9,32E-02	9,34E-02
H	1,55E-01	1,54E-01	1,58E-01	1,65E-01	1,69E-01	1,64E-01	9,07E-02	9,20E-02	9,69E-02	1,19E-01	1,18E-01	1,20E-01

Anhang 1: Extinktionen Proliferationstest feIL-2

Die Extinktionen des mit einem MTT-Colorimetrie-Assay ausgewerteten Prolifertationstests von feIL-2 wurden bei 550 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm spektralphotometrisch im ELISA-*reader* gemessen und im angeschlossenen Computer analysiert. Die Werte in dieser Tabelle wurden nach 24 h gemessen.

Der Aufbau des Proliferationstests findet sich in Tab. 18 in Kap. III B 2.1, die Ergebnisse in Abb. 18, Abb. 19a und 19b in Kap. III B 2.1

2 Proliferationstest feGM-CSF

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7,38E-01	7,98E-01	8,25E-01	1,90E+00	1,86E+00	1,88E+00	1,85E+00	1,92E+00	1,98E+00	8,87E-01	8,48E-01	6,77E-01
B	8,66E-01	9,66E-01	9,69E-01	1,91E+00	1,88E+00	1,93E+00	1,99E+00	1,95E+00	1,82E+00	1,45E+00	1,44E+00	6,16E-01
C	9,26E-01	1,06E+00	1,18E+00	2,04E+00	2,01E+00	2,06E+00	2,13E+00	2,04E+00	2,07E+00	1,66E+00	1,64E+00	6,19E-01
D	1,02E+00	1,16E+00	1,26E+00	2,06E+00	2,03E+00	2,02E+00	2,10E+00	2,02E+00	1,99E+00	1,78E+00	1,74E+00	6,10E-01
E	1,16E+00	1,35E+00	1,41E+00	2,07E+00	2,05E+00	2,02E+00	2,09E+00	2,12E+00	2,08E+00	1,92E+00	1,84E+00	5,73E-01
F	1,28E+00	1,45E+00	1,56E+00	1,90E+00	1,96E+00	1,96E+00	1,94E+00	2,03E+00	1,96E+00	1,96E+00	1,84E+00	5,82E-01
G	1,51E+00	1,65E+00	1,77E+00	1,88E+00	1,89E+00	1,92E+00	1,96E+00	1,97E+00	1,90E+00	2,12E+00	1,91E+00	
H	1,46E+00	1,74E+00	1,78E+00	1,61E+00	1,64E+00	1,66E+00	1,76E+00	1,70E+00	1,69E+00	2,02E+00	1,86E+00	

Anhang 2: Extinktionen Proliferationstest feGM-CSF

Die Extinktionen des mit einem XTT-Colorimetrie-Assay ausgewerteten Prolifertationstests von feGM-CSF wurden bei 485 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm spektralphotometrisch im ELISA-*reader* gemessen und die Daten im angeschlossenen Computer analysiert. Die Werte in dieser Tabelle wurden nach 2 h gemessen.

Der Aufbau des Proliferationstests findet sich in Tab. 19 in Kap. III B 2.2, die Ergebnisse in Abb. 21, Abb. 23a, 23b und Abb. 24 in Kap. III B 2.2

XI DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Arbeit mit den Katzen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Brill für die fachliche Betreuung, sowie für die Verbesserungsvorschläge des Manuskripts.

Herrn Dr. Christian Plank danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Der Hanns-Seidel-Stiftung sei für die Förderung durch ein Stipendium aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung vielmals gedankt.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Tina Kempf für die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen unseres Projekts.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Edelburga Hammerschmid für die wertvolle Hilfe im Labor.

Frau Dr. Ulrike Schillinger möchte ich ganz herzlich für ihre regelmäßigen Motivationshilfen und Hilfsbereitschaft danken sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Dr. Judith Kiessling und Frau Dr. Birgit Glaser möchte ich für Durchsicht des Manuskripts danken.

Frau Verena Hampel, den Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik, vor allem aber dem Pflegerteam, sowie dem gesamten Labor 1.35 danke ich für die Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern. Sie standen hinter meiner beruflichen Entscheidung und haben mich immer tatkräftig unterstützt.

Zuletzt möchte ich mich bei Herrn Frank Donoth bedanken für die große Geduld und permanente Unterstützung während meiner Arbeit sowie die wertvolle Hilfe am PC.

XII LEBENSLAUF

Name:	Bianca Christine Schwarz
Geboren:	03.03.1976 in Kötzting/Opf.
Eltern:	Michael Schwarz, Volksschullehrer Berta Schwarz, geb. Weichenrieder, Volksschullehrerin
Schule:	1982-1986 Besuch der Grundschule in Böbrach 1986-1995 Besuch des Dominicus-von-Linprun Gymnasiums in Viechtach
Abitur:	1995
Fortbildung:	1995 Hospitanz Kleintierklinik Dr. Leonhards, Zwiesel 1996 Sprachaufenthalt in Manchester, GB
Universität:	1996-2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Tierspital der Universität Zürich
Staatsexamen:	August 2002
Approbation:	September 2002
Praktische Erfahrung:	seit Mai 2003 Teilzeitassistentin in der Tierarztpraxis Dr. Hörl, Dachau Nov./Dez. 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München
Promotion:	seit Oktober 2002 Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Forschungsförderung:	seit Januar 2004 Promotionsstipendiatin der Hanns-Seidel-Stiftung e.V.

Publikationen:

Schillinger U, Kjaergaard N, Wiedmann K, Löcher A, Schlemmer S, Schwarz B, Kempf T, Hirschberger J, Köstlin R, Plank C, Gänsbacher B, Brill T:
Immuno gene therapy of feline fibrosarcoma using intratumoral Magnetofection for gene delivery - Preliminary results of a veterinary clinical study.
Abstr (Poster), ASGT-Kongress, Minneapolis, USA, Juni **2004**

Schwarz B, Kempf T, Brill T, Schillinger U, Plank C, Köstlin R, Gänsbacher B, Hirschberger J:
Klonieren der felinen Zytokin-Gene IL-2, GM-CSF und IFNγ zum adjuvanten, nonviralen gentherapeutischen Einsatz beim Fibrosarkom der Katze.
Vortrag (Abstr), 13. DVG-Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Labordiagnostik", München, Februar **2005**

Kempf T, Schwarz B, Brill T, Schillinger U, Plank C, Köstlin R, Hampel V, Gänsbacher B, Hirschberger J:
Nonviraler Gentransfer der felinen Zytokin-Gene IL-2, IFNγ und GM-CSF als adjuvante Immuntherapie beim Fibrosarkom der Katze - Eine klinische Phase I-Studie.
Vortrag (Abstr), 13. DVG-Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Labordiagnostik", München, Februar **2005**