

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Janni

**Untersuchung der Effizienz und Spezifität einer MDR-gesteuerten
Krebstherapie des Ovarialkarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anca Dragoi

2010

Als Inauguraldissertaion gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

gez.: Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: PD Dr. med. Daniel Rein

Korefferent: Prof. Dr. med. Stephan Baldus

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung

1.1 Gynäkologische Malignome- das Ovarialkarzinom	1
1.2 Klassische Therapieansätze des Ovarialkarzinoms	3
1.3 Resistenzentwicklung- Das MDR1- Gen	4
1.4 Gentechnologische Therapieansätze in der Behandlung maligner Tumore	5
1.5 Adenovirale Gentherapie	8
1.5.1 Morphologie des Adenovirus	9
1.5.2 Zelleintritt und adenoviraler Replikationszyklus	9
1.5.3 Adenoviraler Gentransfer	11
1.5.4 Steuerung der adenoviralen Replikation- CRAd's	11
1.5.4.1 Transduktionales Targeting	13
1.5.4.2 Transkriptionales Targeting	14
1.5.5 Verwendung MDR1-Promotor gesteuerter, tropismusmodifizierter CRAd's für die Therapie des Ovarialkarzinoms	16
1.5.5.1 Die 5/3 Fiberchimerisierung	16
1.5.5.2 Der induzierbare MDR1- Promotor	17
1.5.5.3 Die Δ 24-E1A Deletion	17
1.5.5.4 Applikation der Vektoren	18
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	20

2) Material und Methoden

2.1 Zellkultur	22
2.1.1 Kultivierung der Zellen	22
2.1.2 Subkultivierung	22
2.1.3 Bestimmung des Zelltiters	23
2.1.4 Kryokonservierung	23
2.2 Tierexperiment	23
2.2.1 Versuchstiere	23
2.2.2 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	23

2.2.3	Verwendete Zellen	25
2.2.4	Verwendete Adenoviren	26
2.2.5	Chemotherapie	27
2.2.6	Experimentelles Design	27
2.2.7	Probenentnahme der Mäuse	30
2.3	DNA- Analytik	31
2.3.1	DNA- Isolation aus Gewebe	31
2.3.1.1	Probengewinnung mit Hilfe des Dismembrators	31
2.3.1.2	Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol (PCI)- Extraktion	32
2.3.1.3	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	32
2.3.2	Real Time PCR zur Bestimmung der Viruslast in Leber, Peritoneum und Tumor	32
2.3.2.1	Grundlagen der Real time PCR	33
2.3.2.2	Real Time PCR zum Nachweis des adenoviralen E4- Gens	34
2.3.2.3	Schmelzkurvenanalyse	37
2.3.2.4	Optimierung der PCR- Bedingungen	37
2.3.2.5	Agarosegel	37
2.4	Immunhistochemie	39
2.4.1	Immunhistochemische Färbung nach der ABC- Methode	39
2.4.2	Vorbehandlung und Färbung des Untersuchungsgewebes	40
2.5	HE- Färbung	42
2.6	Statistische Auswertung	42
3)	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung der verwendeten CRAd's	44
3.2	Untersuchung des Effektivität in einem Tierexperiment	45
3.2.1	Ergebnisse der Gruppe mit Chemotherapie	45
3.2.2	Ergebnisse der Gruppe ohne Chemotherapie	47
3.2.3	Untersuchung der Tumoren	48
3.3	Quantitative Real-Time PCR	50
3.4	Untersuchung der Anti- Tumor- Effektivität der CRAd`s	54
3.4.1	Quantitative Bestimmung des E4 Gens im Tumor der Maus	54

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis des E1A Proteins im Tumor	55
3.5 Untersuchung der CRAAd Spezifität und Toxizität	56
3.5.1 Untersuchung der Lebertoxizität	57
3.5.1.1 Quantitative Bestimmung des E4 Gens in der Leber der Maus	57
3.5.1.2 Histopathologische Untersuchung der Lebertoxizität im Mausmodell	58
3.5.1.3 Bestimmung der Tumor/Leber Ratio	59
3.5.2 Untersuchung des Peritoneum	60
3.5.2.1 Quantitative Bestimmung des E4 Gens im Peritoneum der Maus	60
4) Diskussion	
4.1 Ovarialkarzinom- Problem der Resistenzentwicklung unter Zytostatikatherapie	61
4.2 Gentherapieansätze	61
4.2.1 Genetische Retargetingstrategien beim Ovarialkarzinom	62
4.2.2 Synergismus Chemotherapie- Gentherapie	63
4.3 Tiermodelle- Möglichkeiten und Grenzen	64
4.4 Ergebnisse der MDR1- gesteuerten Gentherapie ohne Chemotherapie	65
4.4.1 Effektivität der Therapie im Mausmodell	65
4.4.2 Spezifität und Toxizität der Therapie	67
4.5 Ergebnisse der Kombinationstherapie	72
5) Zusammenfassung	75
6) Literatur	77
7) Abkürzungsverzeichnis	95
8) Danksagung	98
9) Erklärung	100
10) Curriculum vitae	101

1. Einleitung

1.1 Gynäkologische Malignome- das Ovarialkarzinom

Malignomerkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen, wie auch in Deutschland nach Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar. Die Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland beträgt etwa 426.800, wobei 229.200 Erkrankungen auf Männer und 197.600 auf Frauen entfallen. Die Anzahl der im Jahr durch Krebs verursachten Todesfälle beträgt etwa 210.930 Die häufigsten Krebstodesursachen beim Mann bilden in absteigender Reihenfolge das Bronchialkarzinom, das Kolonkarzinom und das Prostatakarzinom. Bei Frauen sind dies das Mammakarzinom, das Kolonkarzinom und das Bronchialkarzinom. An fünfter Stelle mit knapp 5640 Sterbefällen pro Jahr steht das Ovarialkarzinom (aus: Krebs in Deutschland, Robert- Koch- Institut, 2010).

Das Ovarialkarzinom ist mit einer Inzidenz von 9.670 Fällen pro Jahr, nach dem Endometriumkarzinom, der zweithäufigste Genitaltumor, hat jedoch aufgrund seiner schlechten Prognose eine höhere Mortalität. Meist handelt es sich um epitheliale Tumore, es kommen jedoch auch Keimzell- sowie Keimstrangdrüsen-Tumore und Sarkome vor. Die Anzahl der Neuerkrankungen nimmt bis zum 80. Lebensjahr kontinuierlich zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 67 Jahren, wobei jedoch 10 % der Ovarialkarzinomerkrankungen, meist vom Keimzelltyp, bei Frauen unter 45 Jahren auftreten. Zu den statistischen Risikofaktoren an einem epithelialen Ovarialkarzinom zu erkranken gehören eine frühe Menarche und späte Menopause, Nulliparität und fehlende Stillzeiten. Eine Erklärung ist die bei der Ovulation entstehende, wiederholte Verletzung des Oberflächenepithels welches anschließend durch Zellproliferation regenerieren muss und somit die Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung ansteigen lässt (Incessant-Ovulation-Theorie nach Fathalla 1971).

In 5 % der Fälle finden sich genetische Faktoren die mit der Entstehung von Ovarialtumoren ursächlich in Zusammenhang stehen. Dazu gehören vor allem Mutationen im BRCA 1- und BRCA 2-Tumorsuppressorgen welche das Risiko für Mutationsträgerinnen bis zum 70 Lebensjahr an Ovarialkrebs zu erkranken auf bis zu 65 % für BRCA 1- und 25% für BRCA 2- steigern lassen (van der Kolk et al. 2010). Eine Besonderheit stellt das Lynchsyndrom (Synonym HNPCC) dar, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung die mit einem

erhöhten Auftreten an Kolonkarzinom in Kombination mit Blasen-, Magen-, Endometrium- und Ovarialtumoren einhergeht. Hierbei findet sich ein Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Ovarialtumors von 7-12% (Schmeler et al.2010, Grindedal et al.2010). Tabelle 1 fasst die wichtigsten Daten für das Ovarialkarzinom zusammen.

Tab.1: Epidemiologie des Ovarialkarzinoms in Deutschland
Schätzung für 2006 nach Angaben des Robert-Koch-Instituts von 2010

Neuerkrankungen pro Jahr	9670
Anteil an Krebsneuerkrankungen	4,9%
Sterbefälle pro Jahr	5636
Anteil an krebsbedingten Sterbefällen	5,7%
5- Jahres Überlebensrate	47%
Mittleres Erkrankungsalter	68 Jahre

Obwohl die Mortalitätsraten seit Ende der 80er Jahre deutlich rückläufig sind, ist die Prognose für das Ovarialkarzinom im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 47% immer noch schlecht.

Eine Erklärung hierfür ist, dass rund 65% der Ovarialkarzinome in den fortgeschrittenen Stadien FIGO III und FIGO IV (siehe auch Tab.2) diagnostiziert werden. Ursache dafür sind die sehr unspezifischen Erstsymptome wie Leistungsschwäche, Unterbauchschmerzen, Verstopfungen und postmenopausale Blutungen, welche die Patientinnen nicht zeitnah an ein Krebsleiden denken lassen. Bemerkenswert wird die Erkrankung meist erst bei Zunahme des Leibesumfangs, die durch eine Peritonealkarzinose mit konsekutivem Aszites bedingt ist, oder bei beginnender Tumorkachexie.

Die endgültige Diagnose kann nur mittels histologischer Aufarbeitung des resezierten Tumormaterials erfolgen (Onmeda 2008). Die Tumorausbreitung findet meist intraperitoneal statt. Es kommt zu Absiedlungen innerhalb des kleinen Beckens, in den Douglas-Raum, später auch in den Oberbauch mit Übergreifen auf die Leberoberfläche und das Zwerchfell. Charakteristisch ist die Peritonealkarzinose mit knotiger Durchsetzung des Omentum majus. Eine Lymphknotenmetastasierung in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten findet sich in den Frühstadien in 10-20% und in den fortgeschrittenen Tumorstadien in bis zu 60-70%. Eine hämatogene Metastasierung ist mit 5-10% relativ selten zu beobachten (Stauber und Weyerstahl 2007).

1.2 Klassische Therapieansätze des Ovarialkarzinoms

Die Grundlage zur Behandlung maligner Ovarialtumoren besteht aus Operation und platinhaltiger Chemotherapie. In der Primärtherapie des Ovarialkarzinoms ist die radikale, chirurgische Tumorreduktion der Goldstandard (Pfisterer et al.2003, Wimberger et al.2007). Ziel der Operation ist die komplette Entfernung des Primärtumors sowie aller sichtbaren intraperitonealen Metastasen. Die radikale Tumorreduktion ist die Voraussetzungen für das Langzeitüberleben (Wimberger et al.2010). Es hat sich gezeigt, dass die Prognose wesentlich durch das Ausmaß der operativen Tumorentfernung bei der ersten Operation bestimmt wird (du Bois et al.2010). Die beste Prognose haben Patientinnen, die postoperativ keinen Tumorrest aufweisen, aber auch Patientinnen mit Resttumor <1cm haben noch einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit Resttumor >1cm (AWMF Leitlinien, 2009). Im Anschluss an die Operation folgt eine platinhaltige Chemotherapie mit Carboplatin in Kombination mit Taxanen (Paclitaxel). Grundsätzlich zeichnet sich das primäre Ovarialkarzinom durch eine hohe Chemosensitivität aus. Unter der Primärtherapie kommt es jedoch häufig zur Ausbildung von Mehrfachresistenz (Hille et al.2006). So kommt es trotz gutem Ansprechen auf die Primärtherapie bei rund 2/3 der Patientinnen zu Rezidiv-Erkrankungen welche erneute Therapiemaßnahmen erforderlich machen (Fung- Kee-Fung et al.2007). Bei der Rezidivbehandlung des Ovarialkarzinoms steht die Chemotherapie im Vordergrund. Abhängig davon ob es sich um ein Früh- (<6Monate) oder Spätrezidiv (>6Monate) handelt wird entweder eine platinhaltige Reinduktionstherapie durchgeführt oder bei platinrefraktären-Tumoren ein platinfreies Regime eingesetzt. Leider ist die Ansprechrate bei platinrefraktären Tumoren bis heute deutlich reduziert.

Bei platinresistenten Ovarialkarzinomen stellt die endokrine Therapie (mit z.B. Gestagenen oder Tamoxifen) eine weitere, jedoch mit <20% Ansprechraten ebenfalls nur mäßige Therapieoption dar. Vorteil ist die geringe Toxizität (Leitlinien DGGG 2006).

Eine Übersicht über Stadieneinteilung und statistischer Verteilung des Ovarialkarzinoms liefert Tabelle 2.

Tab.2: Übersicht Ovarialkarzinom

Stadienabhängige Therapie, Tumorstadium bei Diagnosestellung und 5-Jahres-Überlebensraten. (Deutsche Krebsgesellschaft 2010, AGO Organkommission Ovar 2008, AWMF Leitlinien 2009)

Stadium nach FIGO	Therapie	Diagnosestellung	5- JÜR
I: Tumor befällt ein oder beide Eierstöcke	Operation evt. adjuvante Chemotherapie (nicht notwendig bei 1A)	21,1%	75%
II: Ausbreitung im kleinen Becken	Primäre Operation, im Anschluss platin- ± taxanhaltige Chemotherapie über 6 Zyklen	9,6%	55%
III: Tumor breitet sich in der Bauchhöhle aus und/oder befällt die Lymphknoten	Primäre Operation, im Anschluss Carboplatin+ Paclitaxel über 6 Zyklen	51,4%	22%
IV: Tumor hat die Peritonealhöhle verlassen	Primäre Operation, im Anschluss Carboplatin+ Paclitaxel über 6 Zyklen	18,0%	10%
Rezidiv	Operation nur beim Spätrezidiv indiziert, Chemotherapie in Abhängigkeit von Platin-Sensitivität		<10%

1.3 Resistenzentwicklung- Das MDR1- Gen

Das Ovarialkarzinom ist primär chemosensibel, es kommt jedoch rasch zur Ausbildung von Zytostatikaresistenzen. Diese häufige Zytostatikaresistenz hat zur Analyse der Funktion- und klinischen Bedeutung aktiver Transportproteine geführt. Als entscheidender Faktor für die Ausbildung von Multidrug- Resistenzen ist das p-Glykoprotein (p-Gp) verantwortlich. Der Stofftransporter ist ein Genprodukt des Multi-Drug-Resistenz- Gens (MDR1-Gen) und gehört zur Gruppe der ABC- Transporter (ATP-binding-cassette). P-Glykoprotein ist in zahlreichen Geweben wie Lunge, Leber und Niere zu finden und wird von vielen Substanzen induziert (Rifampicin, Carbamazepin) und inhibiert (Erythromycin, Verapamil, Ciclosporin) (Perez-Tomas 2006). Als ATP- abhängige Drug-Efflux-Pumpe transportiert es verschiedenste Stoffe aus der Zelle raus. Hierzu gehören unterschiedlichste Stoffgruppen wie Herzmedikamente, Antimykotika sowie Zytostatika aus der Gruppe der Taxane und Anthrazykline (Zhou 2008). Die ursprüngliche Funktion des MDR1-Gens wird in der Entgiftung des Organismus von körperfremden Substanzen angenommen (Leslie et al. 2005).

Eine Arbeitsgruppe um Goldstein et al. untersuchte verschiedene Malignome bezüglich ihres MDR1- Status. Man unterschied Tumorentitäten die von Beginn an eine hohe MDR1 Aktivität aufweisen wie Kolon-, Nieren-, oder Leber-Karzinom und Malignome die ohne vorherige Therapie gelegentlich erhöhte MDR1 Aktivität aufweisen wie Neuroblastom, Ovarialkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom und ALL. Desweiteren wurden Tumorentitäten identifiziert die vor allem unter Chemotherapie eine erhöhte MDR1 Aktivität aufzeigten z.B. ALL, Mammakarzinom, Phäochromozytom (Goldstein et al.1989).

Die Feststellung das für das Ovarialkarzinom trotz einer beschriebenen, niedrigen basalen MDR1- Aktivität auffällig häufig Chemotherapieresistenzen beobachtet wurden führte 1994 eine Arbeitsgruppe um Arao et al. erneut zu der Untersuchung der basalen MDR1- Expression in unbehandelten Ovarialtumoren (Arao et al.1994). Hierbei wurde vor allem für gut differenzierte seröse und muzinöse Tumore eine hohe basale Expression des MDR1-Gens gezeigt. Neue Studien zeigen, dass in primären, unbehandelten Ovarialtumoren eine signifikante Korrelation zwischen MDR1- Expression und Tumorprogression besteht (Lu et al. 2007). Desweiteren wurde für das Ovarialkarzinom eine inverse Korrelation zwischen einer niedrigen MDR1/p-Glykoprotein-Expression und einer höheren Überlebensrate beschrieben (Odening et al.2009, Materna et al.2004, Raspollini et al.2005).

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung konnte für das Ovarialkarzinom ein direkter Zusammenhang zwischen Tumor-Stadium, Grading, Rezidivhäufigkeit, Aszites und einer MDR1- Überexpression in unbehandelten Tumorzellen gezeigt werden (Chen et al.2009).

Desweiteren ist bestätigt worden, dass sowohl in primären Ovarialkarzinomzelllinien als auch in Rezidivtumoren bestimmte Chemotherapeutika, darunter Cisplatin, Doxorubicin und Paclitaxel zu einer Induktion des MDR1-Gens/p-Glykoproteins führen. (Schöndorf et al.2003, Hille et al.2006)

Zusammenfassend kann man sowohl von einer erhöhten intrinsischen Multidrug- Resistenz als auch von einer durch Chemotherapeutika induzierbaren Multidrug- Resistenz in Primär- und Rezidiv- Ovarialtumoren ausgehen.

1.4 Gentechnologische Therapieansätze in der Behandlung maligner Tumore

Ein neuer Radikalitätsanspruch in der Operationstherapie und der Einsatz moderner Zytostatika haben zwar die Prognose von Ovarialkarzinom Patientinnen bei Erstdiagnose verbessert. Die Behandlungsoptionen bei Patientinnen mit rezidiviertem oder

metastasiertem Tumor sind jedoch sehr beschränkt. Die unzureichenden Heilungsaussichten nach konventioneller Behandlung und die damit verbundene schlechte Prognose sowie verringerte Lebenserwartung der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen den Bedarf an neuen und alternativen Therapieansätzen in der Behandlung dieses Tumors.

Neue Erkenntnisse über molekulare Mechanismen bei der Entstehung von Malignomen ermöglichen die Entwicklung der Gentherapie als innovative Therapieoption. Hierbei wird ein so genanntes therapeutisches Gen, dessen Genprodukt sich positiv auf den Verlauf der jeweiligen Erkrankung auswirken soll, in die Zielzelle eingeschleust. Der große Vorteil gentherapeutischer Ansätze besteht in der gezielten Wirkung am Ursprungsort der Erkrankung.

Abbildung 1 zeigt, dass zwei Drittel aller aktuell laufenden klinischen Gentherapiestudien sich mit der Therapie von Krebserkrankungen befassen. Weitere Indikationen sind Herz-Kreislaufkrankungen, monogenetische Erkrankungen sowie Infektionskrankheiten.

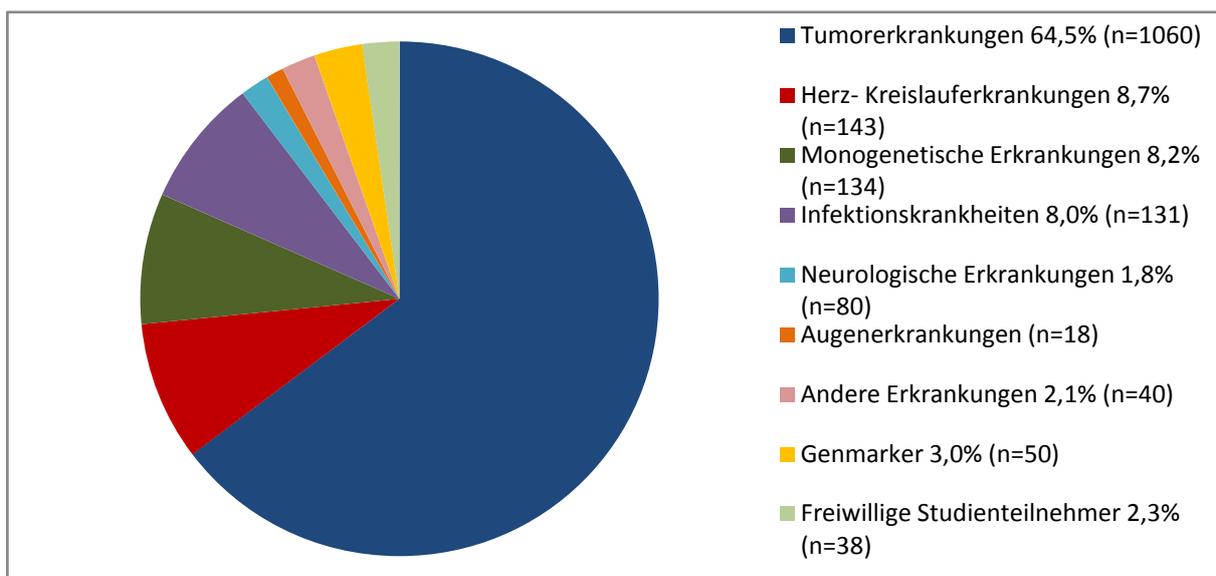


Abb.1: Indikationen klinischer Gentherapiestudien weltweit (Quelle: John Wiley, The Journal of Gene Medicine: Clinical Trial site, <http://www.abedia.com/wiley/index.html>, Stand 27.08.2010)

In der Gentherapie von Tumorerkrankungen macht man sich die molekularen Unterschiede zwischen benignen und malignen Zellen zunutze um gezielt in den Prozess der Karzinogenese eingreifen zu können.

Es können verschiedene gentherapeutische Konzepte unterschieden werden. Bei der *Mutationskompensation* versucht man über das Einbringen eines funktionalen Gens (z.B. das Tumorsuppressorgen p53) die der Karzinogenese zugrunde liegende genetische Veränderung zu korrigieren (Sakai et al.2010; Roth 2006). Bei der *Suizidgentherapie* wird ein Gen in die Tumorzellen eingeschleust. Das Produkt des Suizidgens, meist ein Enzym, bewirkt die intrazelluläre Umwandlung einer separat verabreichten zunächst nicht- toxischen Substanz zu einem Toxin, welches die Tumorzelle abtötet (Chang et al.2010). Das bekannteste Enzymgen ist die Herpes-Simplex-Thymidinkinase. Bei der *Immunpotenzierung* wird die immunologisch vermittelte Tumorzellzerstörung unterstützt. Hierzu wird zum Beispiel der zielgerichtete Transport von Zytokinen oder tumorassoziierten Antigenen zu Antigen- präsentierenden Zellen unterstützt (Ballestrero et al.2008).

Ein komplett anderer Ansatz ist der Gebrauch so genannter onkolytischen Adenoviren oder konditional replizierender Adenoviren (CRAAd's). Hierbei ist die Tumorzellzerstörung unmittelbare Folge der viralen Replikation (Raki et al.2006).

Als größte Herausforderung der Gentherapie gilt es die Entwicklung sicherer, nicht- toxischer Vektorsysteme bei gleichzeitiger Gewährleistung einer ausreichend hohen Gentransfereffizienz zu schaffen. In Anbetracht dieses Ziels haben sich Viren als Genvehikel in den letzten Jahren etabliert. Ihre Hauptvorteile liegen in der hohen Infektionseffizienz und Gentransferkapazität. Nicht- virale Vektoren wie Plasmide oder liposomale Vektoren zeichnen sich durch ihre geringe Immunogenität, leichtere Produktion und hohe DNA- Kapazität aus (Röder et al.2003) werden jedoch aufgrund ihrer geringen Zellspezifität und der im Vergleich zu viralen Vektoren niedrigeren Gentransferkapazität seltener verwendet. Virale Vektorsysteme sind heute in etwa 70% aller klinischen Gentherapiestudien vertreten. Die Wahl des verwendeten Virus wird von unterschiedlichen Faktoren geleitet. Zum einen muss die Zielzelle bzw. das Zielgewebe berücksichtigt werden, zum anderen die Frage, ob eine transiente (Adenovirus, Vakzinevirus) oder eine langfristige (Retrovirus, Adeno- assoziiertes Virus) Transgenexpression angestrebt wird (Danthinne 2000). Wie aus Abbildung 2 zu entnehmen ist sind Adenoviren momentan mit 24 % die am häufigsten genutzten Vektoren, gefolgt von Retroviren mit rund 21 %.

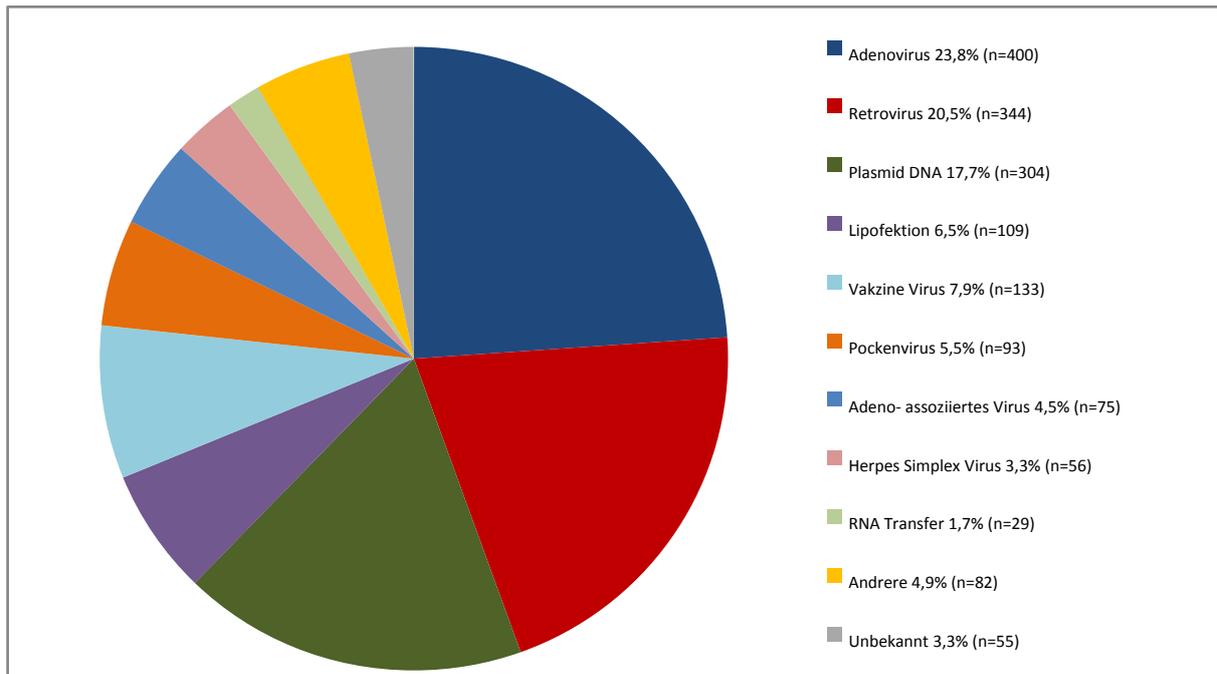


Abb.2: Vektoren in klinischen Gentherapiestudien weltweit (Quelle: John Wiley, The Journal of Gene Medicine: Clinical Trial site, <http://www.abedia.com/wiley/index.html>, Stand 27.08.2010)

1.5 Adenovirale Gentherapie

Adenoviren stellen zurzeit die bedeutendste Gruppe viraler Vektorsysteme dar. Ihr breites Wirtszellspektrum, die Fähigkeit sich in teilungsaktiven sowie –inaktiven Zellen zu vermehren, ihre hohe DNA- Kapazität und die Möglichkeit sie in großen Mengen herstellen zu können macht sie für die Gentherapie besonders attraktiv (Imperiale 2004, Vorburger et al.2002). Ein weiterer Vorteil ist, dass Adenoviren nicht in das Wirtsgenom integrieren und nach erfolgter Infektion meist extrachromosomal verbleiben (Dormond et al.2009, Harui et al.1999). Nachteil der Adenoviren ist der natürliche Tropismus, der zu einer Akkumulation vor allem in der Leber, mit darauffolgender Hepatotoxizität führen kann (Arnberg 2009, Tanaka et al.2007). Einen Lösungsansatz hierzu bietet das transduktionale Targeting, mittels dessen eine selektive Infektion von Tumorzellen angestrebt wird (siehe 1.5.3.1). Mehr als 50 Serotypen (unterteilt in Gruppe A-F) sind bekannt, die beim Menschen Erkrankungen des Respirationstraktes, Bindehautentzündungen und Magen-Darm-Entzündungen auslösen können. Insgesamt gilt die Pathogenität der Adenoviren für den Menschen jedoch als gering. Die gängigsten adenoviralen Vektorsysteme gehen auf den Serotyp 5 (Ad5) zurück, der zu Gruppe C gehört.

1.5.1 Morphologie des Adenovirus

Adenoviren sind nicht-behüllte, doppelsträngige DNA-Viren der Familie Adenoviridae mit einem Durchmesser von 70-90nm. Das Kapsid bildet eine ikosaedrische Form und besitzt einen besonderen, die Virusfamilie charakterisierenden Aufbau aus so genannten Penton- und Hexon-Kapsomeren. An den Pentonen sind typische, antennenartige Fiberproteine verankert, die den Virionen ihr „satellitenartiges“ Erscheinungsbild geben. Das lineare Genom ist je nach Serotyp zwischen 30-45 kb lang (Ad5 35kb) und kodiert für die Gene E1A (*immediate early gene*), E1B-E4 (*early genes*) sowie L1-L5 (*intermediate und late genes*). An beiden Enden des Genoms finden sich repetitive Sequenzen, die so genannten ITR's (Inverted terminal repeats), die als Primer bei der DNA-Replikation dienen. Zusätzlich findet sich an beiden 5'-Enden ein terminales Protein (TP) welches das Genom in einer pseudo-zirkulären Form hält (Academic dictionaries and encyclopedias). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des Adenovirus- Aufbaus.

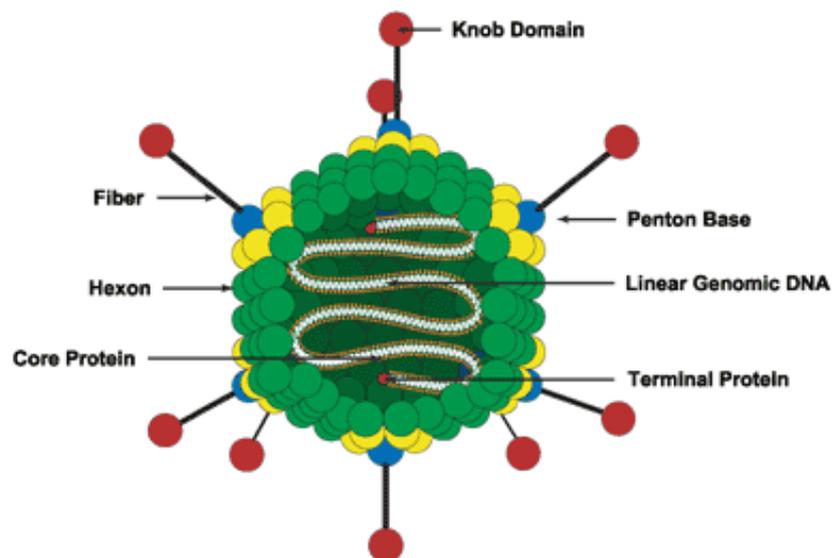


Abb.3: Schematische Darstellung eines Adenovirus

(Quelle:<http://www.stanford.edu/group/virus/adenovirus/2004takahashi/webpage/images/adenomorphology.gif>, Stand 28.08.2010)

1.5.2 Zelleintritt und adenoviraler Replikationszyklus

Die adenovirale Infektion erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet das Adenovirus über die knob- Domäne des Fiberproteins an den entsprechenden Primärrezeptor. Dies ist beim Ad5 und den meisten anderen Serotypen der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Im zweiten

Schritt kommt es zu einer Interaktion zwischen Pentonbasen-Protein und α_v Integrinen auf der Zelloberfläche (Wickham et al.1993). Anschließend wird das Virus durch Endozytose internalisiert, wobei es seine Fiberstruktur verliert (McDonald, 1999). Durch eine Erniedrigung des pH- Wertes im Endosom kommt es zu einer Konformationsänderung der Kapsid- Proteine, die daraufhin mit der Endosomenmembran interagieren und zu einer Zerstörung des Vesikels führen. Die in das Zytoplasma freigesetzten Viruspartikel werden über einen Mikrotubuli- vermittelten Transport in den Zellkern geschleust. Im Nukleus liegt die adenovirale DNA extrachromosomal vor und die viralen Gene werden transkribiert. Abbildung 4 stellt den adenoviralen Replikationszyklus schematisch dar.

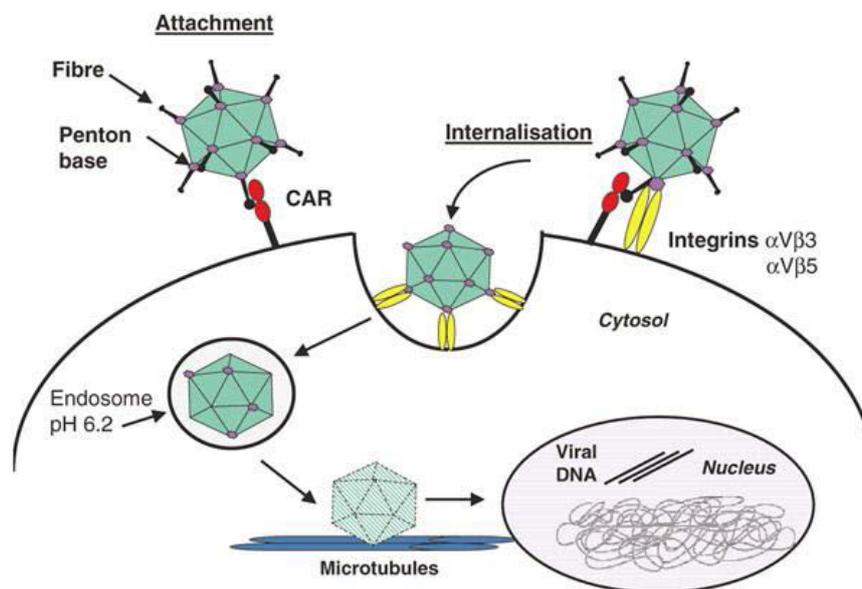


Abb.4: Schematische Darstellung der adenoviralen Infektion der Zielzelle

(Quelle: <http://arthritis-research.com/content/4/S3/S215/figure/F1?highres=y>, Stand 28.08.2010)

Das erste virale Gen, das nach der Infektion der Zielzelle transkribiert wird ist E1A, dessen Genprodukt nachfolgend die Transkription weiterer früherer Gene (E1B-E4) induziert (Howarth et al.2010). Die frühen Gene manipulieren den Zellzyklus, schützen die infizierte Zelle vor dem Immunsystem (vor allem E3) und schaffen somit optimale Bedingungen für die Virusreplikation. Nach der Initiation der DNA- Replikation durch die viralen E2- und E4- Genprodukte erfolgt die Expression der späten Gene L1 bis L5, die für strukturelle Virusproteine kodieren. Nach Zusammensetzung neuer Virionen aus Virusgenom und viralen Hüllproteinen wird abschließend die Zelllyse induziert und die neu synthetisierten Virionen

werden in die Umgebung entlassen. Bei der Infektion nicht-permissiver Zellen (z.B. Nagerzellen) durchlaufen Adenoviren einen abortiven Zyklus, bei dem die Bildung infektiöser Viruspartikel ausbleibt. Die Virus-DNA gelangt nach der Infektion zwar in den Kern und es folgt die Expression der frühen viralen Gene, anschließend unterbleibt jedoch die Virus-DNA-Replikation und/oder Expression der späten Gene (Esche und Siegmann, 1982).

1.5.3 Adenoviraler Gentransfer

Adenoviren können leicht zu Vektoren für gentherapeutische Anwendungen modifiziert werden. Erstgenerationsvektoren zeichnen sich durch Deletionen der Genbereiche E1 und E3 aus und können bis zu 7,5 kb Fremd-DNA aufnehmen. Aufgrund ihrer Deletion im E1 Regulatorbereich sind diese viralen Vektoren replikationsdefizient und können sich nur in bestimmten Wirtszellen vermehren, in denen die Deletion komplementiert wird (s.u.). Adenovirale Vektoren der zweiten Generation tragen zur Erhöhung der Insertkapazität weitere Gendeletionen und erzielen verbesserte anti-tumorale Effekte. Bei dritt-Generationsvektoren ist nahezu das gesamte Adenovirusgenom entfernt („Gutless“ Vektoren), sodass bis zu 36 kb Fremd-DNA integriert werden können (Alba et al.2005, Danthinne et al.2002). Trotz guter präklinischer Erfolge erzielten nichtreplikative Adenoviren aufgrund geringer Gentransferraten sowie mangelnder Zellspezifität in klinischen Studien nur mäßige Erfolge (Vorburger et al.2002).

In letzter Zeit wuchs die Überzeugung, dass die Ausbreitung der therapeutischen Viren im Zielgewebe, insbesondere die sekundär erfolgende Infektion benachbarter Zielzellen, der entscheidende Faktor für die klinische Effizienz der Gentherapie ist. Daher sind zunehmend replikationskompetente, onkolytische Viren in den Vordergrund gerückt, bei deren Einsatz ein komplett anderer Mechanismus, nämlich die Tumorzellzerstörung als unmittelbare Folge der viralen Replikation, angewandt wird (Zhang et al.2010, Relph et al.2005).

1.5.4 Steuerung der adenoviralen Replikation- CRAd's

Adenoviren infizieren grundsätzlich viele verschiedene Arten epithelialen Gewebes. Um eine erfolgreiche Gentherapie sicherstellen zu können ist es unabdingbar die virale Replikation und anschließende Zelllyse auf das Zielgewebe zu beschränken und in Normalzellen zu minimieren. Erste Ansätze zur Steuerung konditional replizierender Adenoviren (CRAd's)

basieren auf dem Prinzip spezifische molekulare Veränderungen von Tumorzellen auszunutzen.

Typ-I CRAd's zeichnen sich durch unterschiedliche Deletionen in für die Virusvermehrung notwendigen Replikationsgenen aus, welche tumorspezifisch kompensiert werden können. Dabei macht man sich Unterschiede in der Zellzyklusregulation zwischen gesunden- und Tumorzellen zunutze.

Ein Beispiel ist die $\Delta 24$ -Deletion in der Rb-Binderegion CR2 des E1A- Gens. Das Entfernen der Bindestelle des Retinoblastom-Proteins (Rb) bindet die virale Replikation an Zellen mit defektem Rb-Pathway, wie es in Tumorzellen der Fall ist (Nettelbeck 2008). (siehe 1.5.5.1)

Ein ähnlicher Mechanismus ist durch die $\Delta 2$ -Deletion des E1A-Gens zu erreichen (Nettelbeck et al.2002, Howe et al.2000). Hier wird die Bindestelle für das zelluläre p300-Protein entfernt und somit die Zellzyklusprogression von G1- in S-Phase verhindert. Die Replikation wird auf Zellen beschränkt die unabhängig vom p300-Pathway proliferieren, wie z.B. Tumorzellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Kombination mehrerer Deletionen zwar die Tumorselektivität erhöht, jedoch zu einer Abnahme der viralen Replikation führt (Bauerschmitz et al. 2002).

Um die Tumorselektivität zu optimieren haben sich weitere Steuerungsmöglichkeiten der CRAd's etabliert.

Zum einen kann durch Änderung der viralen Oberflächen-Rezeptoren die adenovirale Infektion auf Tumorzellen fokussiert werden (transduktionales Targeting, siehe 1.5.4.1).

Bei den sogenannten Typ-II CRAd's erfolgt die Steuerung der viralen Replikation über das Einbauen von tumorspezifischen Promotoren vor frühe virale Gene, sodass deren Transkription idealerweise nur in der Zielzelle eingeleitet wird (transkriptionales Targeting, siehe 1.5.4.2) (Dorer and Nettelbeck 2009, Li et al.2010).

Bei Typ-III CRAds werden die Ansätze der tumorspezifischen Deletion sowie des transkriptionalen Targetings kombiniert. Auf diese Weise kann die Tumorselektivität noch weiter gesteigert werden (Haviv et al.2003).

Weitere Ansätze zur Steuerung der adenoviralen Replikation befassen sich mit einer tumorspezifischen Kontrolle der mRNA-Translation des E1A Gens (Translationales Targeting) (Stoff-Khalili et al.2008).

1.5.4.1 Transduktionales Targeting

Um eine möglichst starke onkolytische Potenz zu erzielen ist zunächst eine ausreichend hohe Transduktionsrate des Virus in die Zielzelle notwendig. Es ist bekannt, dass der natürliche Rezeptor des Ad5, der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor von Tumorzellen nur unzureichend exprimiert wird (Kawashima et al.2003, Sakurai et al.2007). Studien haben gezeigt, dass CAR als Tumorsuppressorgen fungiert und in verschiedenen Tumorentitäten herunter reguliert ist (Short et al.2004). Viele Tumorentitäten, darunter auch das Ovarialkarzinom, weisen eine verminderte CAR- Dichte auf, sodass die Infektion durch Ad5 eingeschränkt ist (Kanerva et al.2002, Rein et al.2006, Ingram et al.2010). Im Gegensatz zu Tumorzellen wird CAR jedoch auf der Zelloberfläche der meisten normalen Gewebe wie z.B. Leber, Milz, Lunge und Niere ubiquitär exprimiert (Glasgow et al.2006). Für die praktische Anwendung ist besonders die hohe CAR-Dichte in der Leber, aufgrund potentieller Nebenwirkungen, problematisch (Barnett et al.2002, Sharma et al.2009). Um eine CAR-unabhängige Infektion zu ermöglichen ist eine Änderung des natürlichen Tropismus notwendig. Durch transduktionales Targeting wird das Viruskapsid so modifiziert, dass es bessere Gentransferraten in der gewünschten Tumorentität erzeugt.

Eine Möglichkeit besteht in der Inkorporation des RGD-4C (Arginin- Glycin- Asparaginsäure) Tripeptids in den HI- Loop oder C- terminalen Bereich der viralen Fiber-Knob Domäne. Das RGD-4C- Motiv bindet an $\alpha_v\beta$ - Integrine, die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen überexprimiert werden (Metthews et al.2009, Hemminki et al.2001). Eine weitere Möglichkeit ist die Insertion des Pk7-Peptids (Poly- Lysin) in den C- Terminus des Fiber. Das Pk7- Peptid bindet an Heparanhaltige Rezeptoren die auf Tumorzellen, z.B. beim Zervixkarzinom, überexprimiert werden. Die Kombination aus RGD-4C und Poly-Lysin führte zu einer weiteren Erhöhung der Gentransfereffizienz von Ad- Vektoren (Rein et al. 2004).

Desweiteren können auch Bindemotive anderer Ad-Serotypen als die der Subgruppe B verwendet werden um somit bestimmte Gewebetypen zu adressieren (Fiber-Pseudotypisierung/ Fiberchimerisierung). Beispielsweise konnten Ad35-Fiber gute Infektionsraten in hämatopoetischen Zellen erzielen, die Ad5 resistent sind (Nicklin et al.2005). Vor dem Hintergrund, dass Ad3-Rezeptoren in hoher Anzahl auf Ovarialkarzinomzellen exprimiert werden, bietet sich die Möglichkeit an einem Ad5-basierten Vektor eine Knob- Substitution durch den Ad3 Knob durchzuführen (Kanerva et al.2002, Tsuruta et al.2007). Trotz des bisher nicht vollständig geklärten

Bindungsmechanismus des Adenovirus Serotyp 3 haben Ad5/3 modifizierte Vektoren bereits signifikant höhere Transduktionsraten als Ad5 in unterschiedlichsten Zellarten gezeigt (Hall et al.2009). Abbildung 5 stellt schematisch eine Fiber- Modifikation des Adenovirus dar. Veränderungen der Fiber-Shaft-Domäne hinsichtlich ihrer Länge können ebenfalls dem zellspezifischen Targeting dienen. Eine Arbeitsgruppe um Breidenbach et al. zeigte, dass eine Verkürzung der Shaft-Domäne den Lebertropismus der Adenoviren reduziert (Breidenbach et al. 2004).

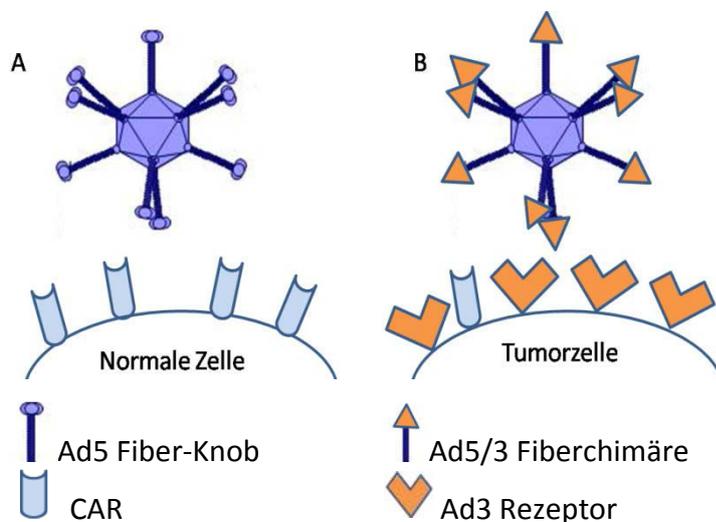


Abb.5: Prinzip der Fiber-Modifikation

A: Ad5 bindet an CAR in normalem Gewebe.

B: Die Knob- Domäne des Ad5 Virus ist genetisch modifiziert worden um eine CAR- unabhängige Bindung an Tumorzellen zu ermöglichen.

1.5.4.2 Transkriptionales Targeting

Ein anderer Ansatz die Tumorspezifität zu erhöhen besteht darin Promotoren einzusetzen, die die virale Replikation auf Tumorzellen begrenzen. Hierbei macht man sich zunutze, dass in Tumorzellen eine Anzahl verschiedener Promotoren hochreguliert ist, die im Normalgewebe nicht oder nur gering aktiv sind. Diese Promotoren können als tumorspezifische Promotoren (TSP) für die Steuerung der CRAd's eingesetzt werden (Cody and Douglas 2009). Der tumorspezifische Promotor wird vor Gene geschaltet, die für die virale Replikation essentiell sind (z.B. E1A, E1B). Da die virale Replikation von der Aktivität des Promotors in der Wirtszelle bestimmt wird eignen sich besonders tumorspezifische Promotoren, die in Normalgewebe eine niedrige und in Tumorzellen eine hohe Aktivität aufweisen (Wong et al.2010). In Abbildung 6 ist das Prinzip des transkriptionalen Targeting schematisch dargestellt.

Für die Therapie des Ovarialkarzinoms konnten Untersuchungen der letzten Jahre den SLPI- (Rein et al.2005), den MSLN- (Breidenbach et al.2005, Tsuruta et al.2008), den Cox2- (Bauerschmitz et al.2006) sowie den CXCR4- Promotor (Rocconi et al.2007) als vielversprechende Promotoren identifizieren.

Der MDR1-Promotor gehört zu den so genannten induzierbaren Promotoren. Bei relativ niedriger basaler Aktivität führt er nach einer Zytostatika Therapie zu einer starken Genexpression (Abolhoda et al. 1999, Kuo 2009). So konnte gezeigt werden, dass es nach einer Behandlung mit Anthrazyklinen oder Taxanen zu einer erhöhten MDR1-Expression/ p-Glykoprotein-Synthese kommt, wodurch die Chemotherapeutika aktiv aus der Zelle befördert werden (Schöndorf et al. 2003, Miller and Ojima 2001, Martirosyan et al.2010).

Da es beim Ovarialkarzinom häufig zur Entwicklung poly-chemoresistenter Tumorzellen kommt, scheint der MDR1- Promotor ein vielversprechender Kandidat für die Therapie fortgeschrittener Ovarialkarzinome zu sein. Die MDR1- gesteuerte Virustherapie könnte bei der Eliminierung chemo-resistenter Tumore helfen, die durch heutige Therapieoptionen nicht möglich ist.

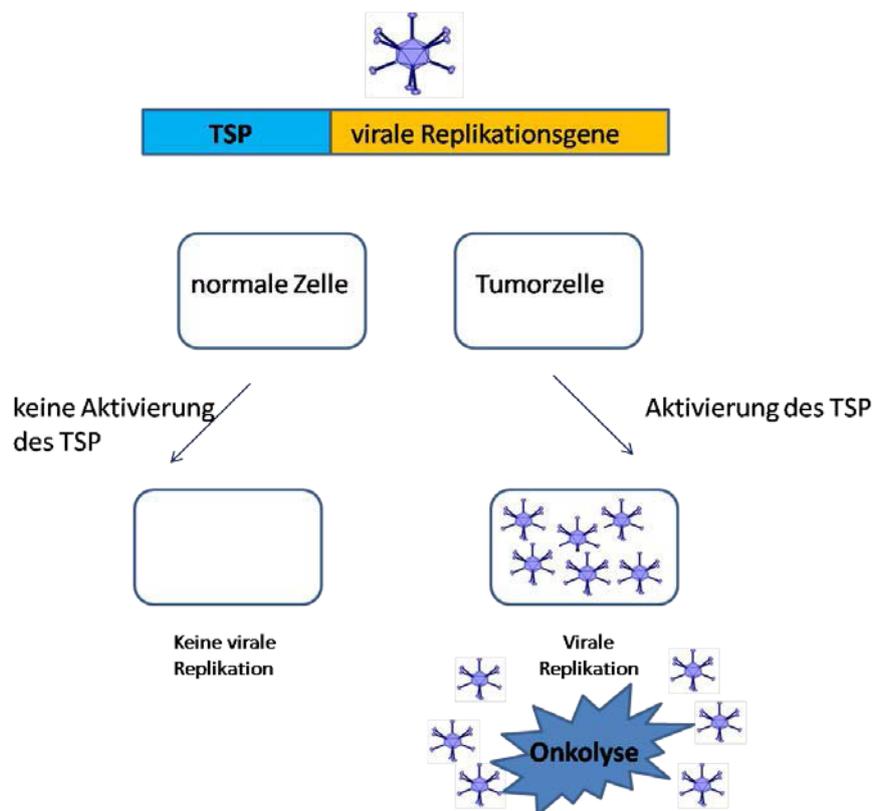


Abb.6: Prinzip des transkriptionalen Targeting.

Die Transkription der frühen viralen Gene erfolgt nur selektiv in Geweben in denen der tumorspezifische Promotor (TSP) aktiv ist. Somit bleiben die virale Replikation, die Onkolyse und die anschließende Freisetzung der Virionen auf das Zielgewebe beschränkt.

1.5.5 Verwendung MDR1-Promotor gesteuerter, tropismusmodifizierter CRAd's für die Therapie des Ovarialkarzinoms

In dieser Arbeit wurden CRAd's getestet die verschiedene Targeting- Strategien vereinen. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren.

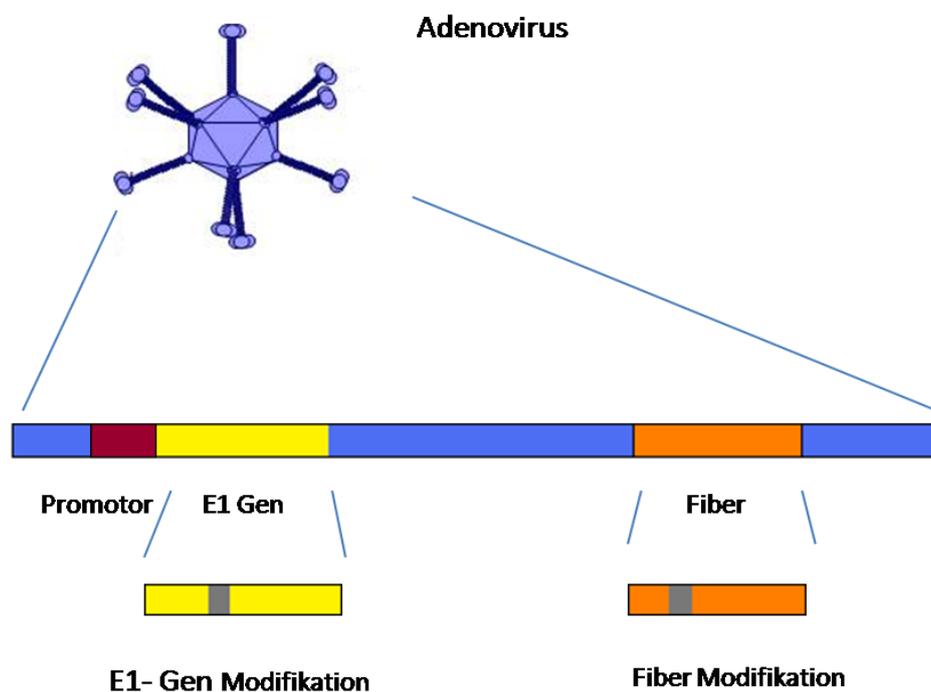


Abb.7: Schematische Darstellung eines modifizierten Adenovirus

1.5.5.1 Die 5/3 Fiberchimerisierung

Die onkolytische Potenz replikationskompetenter Adenoviren wird maßgeblich durch eine effiziente Infektion der Tumorzellen beeinflusst (van Geer et al.2010). Um eine CAR-unabhängige Transduktion mit Ad5- basierten CRAd's zu erreichen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Fiberchimäre, mit der Knob-Domäne des Ad3 verwendet. In bisherigen Untersuchungen konnten Ad5/3-fibermodifizierte Adenoviren einen überlegenen Vorteil gegenüber anderen Fibermodifikationen zeigen und den Gentransfer in Ovarialkarzinomzellen um den Faktor 300 steigern (Kanerva et al.2002b). Dabei zeigten die

chimären Ad5/3 Vektoren ein Biodistributions- und Toxizitätsprofil das dem Ad5-basierter Vektoren vergleichbar ist, welche wiederum in klinischen Studien als sicher eingestuft werden konnten (Rein et al.2005, Zhu et al.2008, Dias et al.2010).

1.5.5.2 Der induzierbare MDR1- Promotor

Insbesondere bei der Therapie von Ovarialkarzinomrezidiven findet sich sehr häufig eine MDR1-assoziierte Chemoresistenz (Hille et al.2006). Zudem ist bei dem Vergleich zwischen normalem Ovarialgewebe/ benignem Ovarialtumor und primär unbehandeltem Ovarialkarzinom eine erhöhte basale MDR1-Expression in Ovarialkarzinomen gezeigt worden (Auner et al.2010, Cheng et al.2000; Wang et al.1998).

Dies lässt MDR1 als einen vielversprechenden Promotor erscheinen für die Therapie des Ovarialkarzinoms mit konditional replizierenden Viren.

In vitro Versuche zeigten bereits gute Ergebnisse mit MDR1-gesteuerten Adenoviren. In Zytotoxizitätsassays konnte durch Infektion mit Adenoviren mit MDR1-Promotor eine effizientere Onkolyse in Ovarialkarzinomzellen erreicht werden als durch Vergleichsviren.

In der vorliegenden Arbeit werden in einem *in vivo* Modell CRAd's untersucht, bei denen der MDR1- Promotor vor das frühe virale Gen E1A geschaltet ist. Somit wird die Virusreplikation an Zellen mit hoher MDR1 Expression gebunden.

Da niedrige Basalaktivitäten auch in anderen Geweben wie Leber und Niere beschrieben sind (Liu et al.2010, Israeli et al.2005, Yoshikawa et al.2004), ist es besonders wichtig die virale Genexpression durch zusätzliche Steuerungsmechanismen auf das Zielgewebe zu beschränken.

1.5.5.3 Die Δ 24- E1A Deletion

Die genetische Modifikation der essentiellen Virusgene selbst stellt einen weiteren Sicherheitsmechanismus dar um die virale Replikation auf Tumorzellen zu beschränken und somit eine selektive Onkolyse zu erreichen. In normalen Zellen bindet das E1A-Protein des Wildtypvirus an das Retinoblastom- Protein (Rb1), wodurch es zur Induktion der S-Phase, Zellproliferation und folglich auch zur Virusreplikation kommt. Durch die 24-Basenpaare umfassende Deletion des E1A-Gens wird die Bindungsstelle des Rb-Proteins entfernt und somit der Übergang der Wirtszelle in die S-Phase verhindert. Da die Zellzyklusprogression

jedoch essentiell für die Virusvermehrung ist, wird somit die Virusreplikation in benignen Wirtszellen verhindert. Tumorzellen, wie auch das Ovarialkarzinom, zeichnen sich durch einen defekten Rb-Pathway aus, sodass die Zellen unabhängig von der Rb-vermittelten Zellzykluskontrolle den G₁-S-Checkpoint passieren und proliferieren können (Wong et al.2010, D' Andrilli et al.2004). Infolgedessen können auch Δ 24-deletierte CRAd's in diesen Zellen replizieren (Fueyo et al.2000, Oberg et al.2010). Somit ist die Virusvermehrung und anschließende Onkolyse der Δ 24-deletierten Adenoviren im Idealfall auf das Tumorgewebe beschränkt. Da CRAd's mit Δ 24-Deletion überzeugende Ergebnisse bezüglich Sicherheit und Effizienz lieferten wird dieser Ansatz als zusätzlicher Sicherheitsmechanismus genutzt (Rocconi et al. 2007, Dias et al. 2010).

1.5.5.4 Applikation der Vektoren

Virus- Administration

In den meisten Studien wurden Adenoviren intratumoral injiziert, um die Wirksamkeit für lokal begrenztes Tumorgewebe zu untersuchen. Im Falle des Ovarialkarzinoms ist auf Grund der Tumorausbreitung in der Bauchhöhle eine intraperitoneale Administration des Vektors naheliegend (Wolf et al.2004, Kanerva et al.2002b, Takakura et al.2010). Diese wird jedoch durch neutralisierende Antikörper im Aszites erschwert (Stallwood et al.2000). Durch den Gebrauch von Ad5/3- Fiberchimären kann der hemmende Effekt von präexistenten neutralisierenden Ad5-Antikörpern allerdings reduziert werden (Särkioja et al.2008). Die Applikation der Vektoren in einem anatomisch klar abgegrenzten Kompartiment bringt viele Vorteile hinsichtlich Sicherheit und Effizienz der adenoviralen Therapie.

Intraperitoneale Chemotherapie

In Europa ist die intravenöse Chemotherapie des Ovarialkarzinoms Standard. In gängigen US-amerikanischen Studien wurde die intraperitoneale Applikation eines Chemotherapeutikums untersucht. Ein Vorteil besteht darin, dass der Effekt des Medikamentes durch die Nähe zum Wirkungsort maximiert werden kann, zum anderen unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden können (Buller et al.2002, Benedetti et al.2010). Meta-Analysen zeigen eine Überlegenheit der intraperitonealen gegenüber der intravenösen Chemotherapie bei

fortgeschrittenem Ovarialkarzinom und führten zu einer Empfehlung des National Cancer Instituts diese als Standardtherapie in den Vordergrund zu stellen (Fujiwara et al. 2007).

Kombinationstherapie

Ein weiterführender Ansatz die Effizienz von Virotherapie zu steigern ist die Kombination einer onkolytischen Virotherapie mit konventionellen antitumoralen Therapien und somit die Etablierung einer multimodale Krebstherapie. Zahlreiche präklinische Studien untersuchten Effekte einer Kombinationstherapie und konnten synergistische antitumorale Aktivitäten zeigen bei der Kombination einer onkolytischen Therapie mit einer Chemotherapie (Fujiwara et al. 2006, Gomez-Manzano et al. 2006, Nelson et al. 2009)

Tiermodelle

Um die klinische Effizienz neuer Therapieansätze zu evaluieren bieten sich Tiermodelle an. Xenotransplantationen von Tumorzellen in SCID- Mäuse werden regelmäßig zur Untersuchung von neuen antitumoralen Therapieansätzen eingesetzt. Der SCID- Mausstamm (severe combined immuno deficiency) ist aufgrund einer autosomal- rezessiven Mutation nicht in der Lage immunkompetente B- und T- Lymphozyten zu bilden. Durch das Fehlen der humoralen und zellulären Immunabwehr treten in der Regel keine Entzündungs- sowie Abstoßungsreaktionen nach Transplantation humaner Tumorzellen auf.

Da zur Simulation einer Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms ein intraperitoneales Tumormodell mit intraperitonealer Applikation des viralen Vektors und des Chemotherapeutikums am geeignetsten erscheint wird dies in der vorliegenden Arbeit angewandt (Bauerschmitz et al.2002, Kanerva et al.2002b, Rein et al.2005, Raki et al. 2008).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ovarialkarzinom weist die höchste Mortalitätsrate unter den gynäkologischen Malignomen auf. Trotz aller Fortschritte in der primären Therapie, erleidet die Mehrzahl der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom ein Rezidiv, was zu niedrigen 5 Jahresüberlebensraten führt. Ein Behandlungsproblem besteht darin, dass es bei Applikation einer Chemotherapie, trotz initial hoher Ansprechrate, rasch zur Ausbildung resistenter Tumorzellklone kommt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung alternativer Behandlungsansätze dringend erforderlich.

Ein Ansatz einer zielgerichteten „targeted“ Therapie ist die Krebsgentherapie. Voraussetzung für einen effizienten Genterapieansatz ist die gezielte Infektion des Zielgewebes unter Schonung von Nicht-Zielzellen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass konditional replikative Adenoviren Tumorzellen effektiv infizieren und durch eine gezielte virale Replikation in den Zielzellen zur spezifischen Onkolyse der Zielzellen führen.

Voraussetzung für eine effektive Krebsgentherapie ist eine möglichst hohe Spezifität der viralen Infektion. Eine Möglichkeit, virale Infektion und Replikation zu steuern, ist der Einsatz tumorspezifischer Regulatorelemente, sogenannter Promotoren. Durch die Vorschaltung eines tumorspezifischen Promotors vor die für die Steuerung der Virusreplikation verantwortliche E1A-Region wird erreicht, dass sich das Virus präferentiell in Zielzellen repliziert, die das für den Promoter korrespondierende Gen stark exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Adenoviren untersucht, die über den Promoter des Multiple Drug Resistance Gen 1 (MDR 1) gesteuert werden. In Voruntersuchungen war gezeigt worden, dass das MDR 1-Gen in chemotherapieresistenten Ovarialkarzinomzellen stark exprimiert wird.

Ein Problem bei der Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms besteht darin, dass viele Tumorzellen den Rezeptor des Adenovirus vom Serotyp 5, den sogenannten CAR-Rezeptor, nur schwach oder sehr heterogen exprimieren. Um das Hindernis der schwachen CAR-Expression zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit fiber-modifizierte Adenoviren eingesetzt. Diese besitzen die Adenovirus-Bindungsregion des Adenovirus vom Serotyp 3, von dem bekannt ist, dass der korrespondierende Rezeptor auf der Oberfläche von Ovarialkarzinomzellen stark exprimiert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung zweifach modifizierter, MDR1 spezifischer Adenoviren zur Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- **Untersuchung der Effizienz einer intraperitoneal applizierten MDR1 gesteuerten Krebsgentherapie an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell.**

Der wesentliche Beobachtungsparameter war das Überleben der Mäuse.

- **Untersuchung der Spezifität der viralen Infektion und Replikation**

Hierzu erfolgten vergleichende Untersuchungen der viralen Kopienzahl in Tumoren sowie makroskopisch unauffälligem Peritoneum der Maus mittels immunhistochemischer und molekularer Untersuchungsmethoden.

- **Untersuchung der Toxizität des systemischen Gentherapieansatzes**

Hierzu erfolgten molekulargenetische, histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen der Lebern der Mäuse.

Die Berechnung der Tumor/Leber-Ratio der viralen Expression diente als Parameter zur Quantifizierung der Toxizität im Vergleich zu verschiedenen Kontrollviren.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die komplette Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO² und 95 % Luftfeuchtigkeit im Begasungsbrutschrank.

Die verwendeten humanen Tumorzellen der Zelllinie SKOV3.ip wurden von Prof. Curiel, University of Alabama (USA) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte humane Ovarialkarzinomzelllinie, die bei in vitro Versuchen ein invasiveres Verhalten als die parenterale Linie SKOV3 zeigte (Bai et al.2006).

2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zum subkonfluenten Wachstum in sterilen 250 bzw. 550 ml Gewebekulturflaschen mit 10 bzw. 20 ml Medium. Dabei wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt. Hierzu wurde das alte Medium mittels steriler Einmalpipetten entfernt und neues, 1h bei 37°C im Wasserbad vorgeheiztes Medium zugesetzt. Dem Medium wurden stets 50 ml FCS sowie 500 µl Gentamycin zugesetzt. Im Begasungsbrutschrank wurde der Deckel leicht aufgedreht.

2.1.2 Subkultivierung

Bei Erreichen einer subtotalen Zell-zu-Zell- Adhärenz wurde die Subkultivierung vorgenommen. Nach Spülung mit 5 ml PBS wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin (1:10 mit PBS verdünnt) für 5 min im Begasungsbrutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde zur Beendigung des Ablösevorgangs die gleiche Menge an Kulturmedium zugeführt. Das darin enthaltene FCS inhibiert Trypsin. Die vom Untergrund abgelösten Zellen wurden in 10 ml Falcon Tubes überführt und durch Zentrifugation (5 min bei 1000Upm) sedimentiert. Pelletierte Zellen wurden in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in Kryoröhrchen transferiert und zum Zählen mittels wiederholten Aufziehens durch eine Kanüle (0,8x40mm) vereinzelt.

2.1.3 Bestimmung des Zelltiters

Die Zellzählung wurde mittels Doppelbestimmungen in der Neubauer- Zählkammer durchgeführt. Hierzu wurde die mit Trypanblau verdünnte Zellsuspension in die Zählkammer aufgetragen und 4 Gruppenquadrate ausgezählt.

Der Zelltiter berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen/} \mu\text{l}$$

Ihrem Wachstum entsprechend wurden die Zellen neu ausgesät.

2.1.4 Kryokonservierung

Die sedimentierten Zellen wurden in Gefriermedium (Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in sterile 2 ml Kryoröhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2 Tierexperiment

Die Untersuchung der antitumoralen Effizienz einer Therapie mit den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten konditional replizierenden Adenoviren erfolgte in einem in vivo Mausmodell. Hierbei wurde eine lokal angewandte Therapie (intraperitoneal) zur Behandlung von malignen Ovarialtumoren durchgeführt mit dem Ziel durch gesteuerte virale Replikation selektiv nur Tumorzellen abzutöten und somit ein längeres Überleben zu gewährleisten. Gemessen werden sollte primär die Überlebenszeit sowie mögliche Korrelationen zu Viruslast im Tumor und anderen Organen.

2.2.1 Versuchstiere

Die tierexperimentelle Untersuchung erfolgte nach behördlicher Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Umweltschutz NRW.

Es wurden 120 weibliche SCID Mäuse verwendet. Die Tiere stammen aus der Zucht des kommerziellen Versuchstierzüchters Taconic, Dänemark. Diese Rasse von Mäusen wird ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken gezüchtet und oft in Tumorinduktionsversuchen verwendet. Die SCID- Mutation (Severe Combined Immune Defeciency) führt zu einem kombinierten B- und T-Zelldefekt, der sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität herabsetzt. Das Alter der Mäuse betrug zu Beginn des Experiments 6 Wochen, und ihr Gewicht lag zwischen 20-25 Gramm.

Die Anlieferung der Mäuse in die Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf erfolgte in Filterkartons. Nach Prüfung des Keimstatus (frei von Ekto- und Endoparasiten sowie Mycoplasmen, Pasteurellen) folgte eine Akklimatisationszeit von einer Woche im zentralen Tierlabor des Instituts.

2.2.2 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Die Haltung während des Experiments erfolgte unter standardisierten Bedingungen (22+/- 2°C Raumtemperatur ; 55+/-5 % relative Luftfeuchtigkeit; Kunstlichtbeleuchtung ca 320 Lux in 1 Meter Höhe mit 12/12 h Rhythmus) in offenen Makrolonkäfigen auf unbehandeltem Weichholzgranulat als Einstreu. Die Nahrung bestand aus 8mm Würfel Diät R1000 der Firma Futter GmbH, unbehandelt, ad libidum. Die Mäuse erhielten kommunales Leitungswasser, unbehandelt, aus einer automatischen Tränke. Die wöchentliche Säuberung der Käfige beinhaltete eine Reinigung mit Haushaltsreiniger und einen Austausch des Streu. Abbildung 8 zeigt zwei Bilder aus der Tierversuchsanstalt.

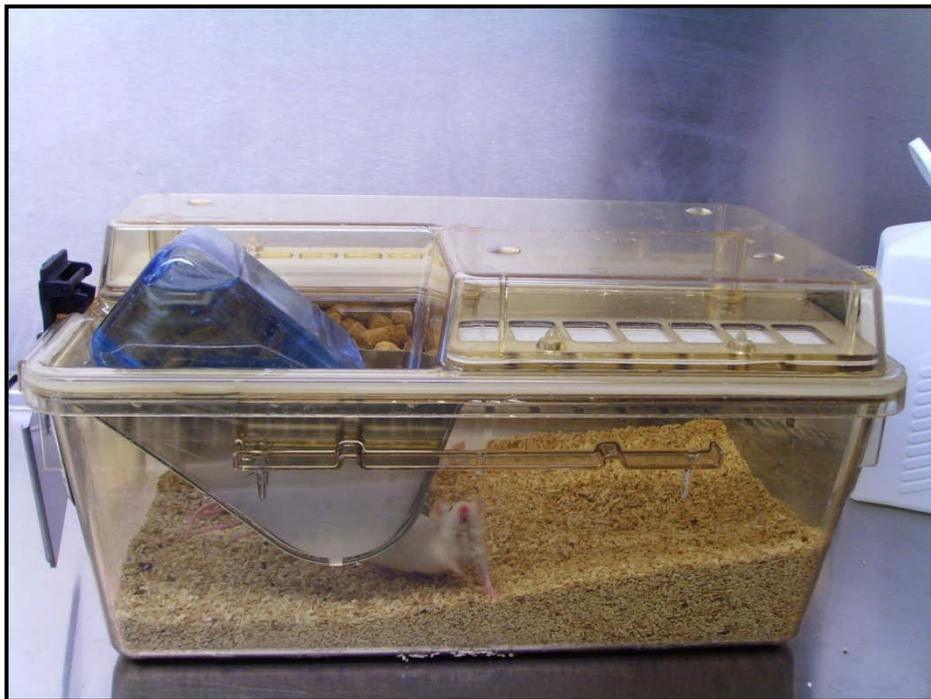


Abb.8: Tierversuchsanstalt. Allgemeine Tierhaltungsbedingungen in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.3 Verwendete Zellen

Die Tumorzellen der Zelllinie SKOV3.ip wurden freundlicherweise von Prof. Curiel, University of Alabama (USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden im Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik kultiviert und subkultiviert bis die gewünschte Zellzahl erreicht war. Die Zellen wurden so ausgesät, dass zu Beginn des in vivo Experimentes 60 550ml

Gewebekulturflaschen bereit standen. Pro Flasche wurden 2×10^7 Zellen geerntet, die in 1 ml Medium resuspendiert wurden. Es wurden 118 sterile 1 ml Spritzen mit 1×10^7 Zellen/ 500 μ l Medium aufgezogen und auf Eis gelagert. Bis zur Tumorzellinjektion vergingen maximal 60 Minuten.

2.2.4 Verwendete Adenoviren

Das Adenovirus Serotyp 5 (Ad5wt) wurde freundlicherweise von Prof. Curiel University of Alabama (USA) bereitgestellt. Der CRAd- Vektor Ad5/3 Δ 24 wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. A.Kanerva, University of Helsinki, Finnland bezogen. Die fiberchimerisierten Adenoviren Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24 sowie das replikationsdefiziente Virus Ad5mdrluc wurden in der Universitätsklinik Düsseldorf hergestellt und freundlicherweise von Frau Dr. I.Herrmann zur Verfügung gestellt. Eine Beschreibung der Adenoviren ist Tabelle 3 zu entnehmen. Unmittelbar vor der Injektion wurden die Viren bei Raumtemperatur aufgetaut und entsprechend der vorhandenen Konzentration mit Medium ohne Zusätze verdünnt, sodass jeweils 10^9 VP/ ml Medium vorlagen. Es wurden sterile 1 ml Spritzen mit jeweils 5×10^8 VP/ 500 μ l Medium des entsprechenden Virus aufgezogen und auf Eis gelagert.

Tab.3: Untersuchte Adenoviren: Ad5wt wurde freundlicherweise von Prof. Curiel, University of Alabama (USA) bereitgestellt. A5/3 Δ 24 wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. A.Kanerva, University of Helsinki, Finnland, bezogen. Die MDR1- Promotor gesteuerten Viren wurden freundlicherweise von Frau I. Hermann, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Adenovirus	Beschreibung
Ad 5 wt	Humanes Wildtyp Adenovirus Serotyp 5
Ad 5/3 Δ 24	CRAd, 24 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad 5/3 MDR1E1	CRAd, E1A-Gen unter Kontrolle des MDR1- Promotors, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad 5/3 MDR1E1 Δ 24	CRAd, E1A-Gen unter Kontrolle des MDR1-Promotors, 24 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad 5/3 MDR1luc	Replikationsdefizient durch E1 Deletion Luziferase- Gen unter Kontrolle des MDR1- Promotors Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3

2.2.5 Chemotherapie

Als Chemotherapeutikum wurde das Anthrazyklin Doxorubicin verwendet. Doxorubicin wird aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die DNA- und RNA-Synthese standardmäßig für die Zytostatikatherapie solider Tumore, einschließlich Ovarialtumore, eingesetzt.

Das Medikament wurde am Morgen vor der Injektion in der Zentralapotheke der Universitätsklinik Düsseldorf abgeholt. Es lag als Injektionslösung 2mg/ml vor. Bei einer Standarddosierung von 6 mg/ kg Körpergewicht wurde die benötigte Dosierung pro Maus (ca. 20 g) auf 0,12 mg berechnet. Das Chemotherapeutikum wurde nach Herstellerangaben unter ärztlicher Aufsicht mit NaCl verdünnt. Es wurden sterile Spritzen mit 0,12 mg Doxorubicin/ 500 ml NaCl aufgezogen und auf Eis gelagert.

2.2.6 Experimentelles Design

Zu Beginn des Versuchs wurden die Mäuse randomisiert auf Gruppen verteilt, indem sie einem Käfig zugeordnet wurden. Zur späteren Identifikation wurden die Käfige nach Gruppenzugehörigkeit beschriftet. 2 Tiere wurden als Kontrollmäuse über das gesamte Experiment beobachtet. Die 120 Tiere wurden in 22 Gruppen zu jeweils 5 Tieren, 2 Gruppen zu jeweils 4 Tieren und eine Gruppe mit den 2 Kontrollmäuse aufgeteilt und unter den oben genannten Bedingungen gehalten.

118 Mäusen wurden zu Beginn des Versuchs (Tag 0) 1×10^7 SKOV3.ip-Tumorzellen intraperitoneal implantiert. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mittels einer Insulinspritze in den Unterbauch. An Tag 11 wurden 100 Mäuse mit jeweils 5×10^8 VP in 500µl Medium entsprechend ihrer jeweiligen Gruppe beimpft. Bei 5 zu untersuchenden Virusgruppen wurde folglich jeweils 20 Mäusen dasselbe Virus appliziert (siehe Versuchsschema). Ad5wt (n=20), Ad5/3Δ24 (n=20), Ad5/3MDR1E1 (n=20), Ad5/3MDR1E1Δ24 (n=20), Ad5MDR1luc (n=20). Die Injektion erfolgte ebenfalls intraperitoneal.

16 Tiere der Kontrollgruppe wurden ohne Virus belassen (n=16). An Tag 13 und 15 erfolgte bei der Hälfte der Mäuse (50 Virus-Mäuse + 8 Mäuse ohne Virus) die intraperitoneale Applikation des Chemotherapeutikums Doxorubicin in einer Dosierung von 6mg/kg Körpergewicht.

Im Folgenden wurden die Mäuse täglich inspiziert und über einen Zeitraum von 120 Tagen beobachtet. Zielkriterium war das Überleben der Mäuse. Bei übermäßiger Belastung oder Leiden wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Abschließend wurden die gewonnenen Daten in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und die Überlebenszeit zwischen den Gruppen paarweise mittels Log-Rank Analyse und χ^2 Test unter Verwendung der Software SPSS 17.0 verglichen.

Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und der Ausgangspopulation bieten Abbildung 9 und 10.

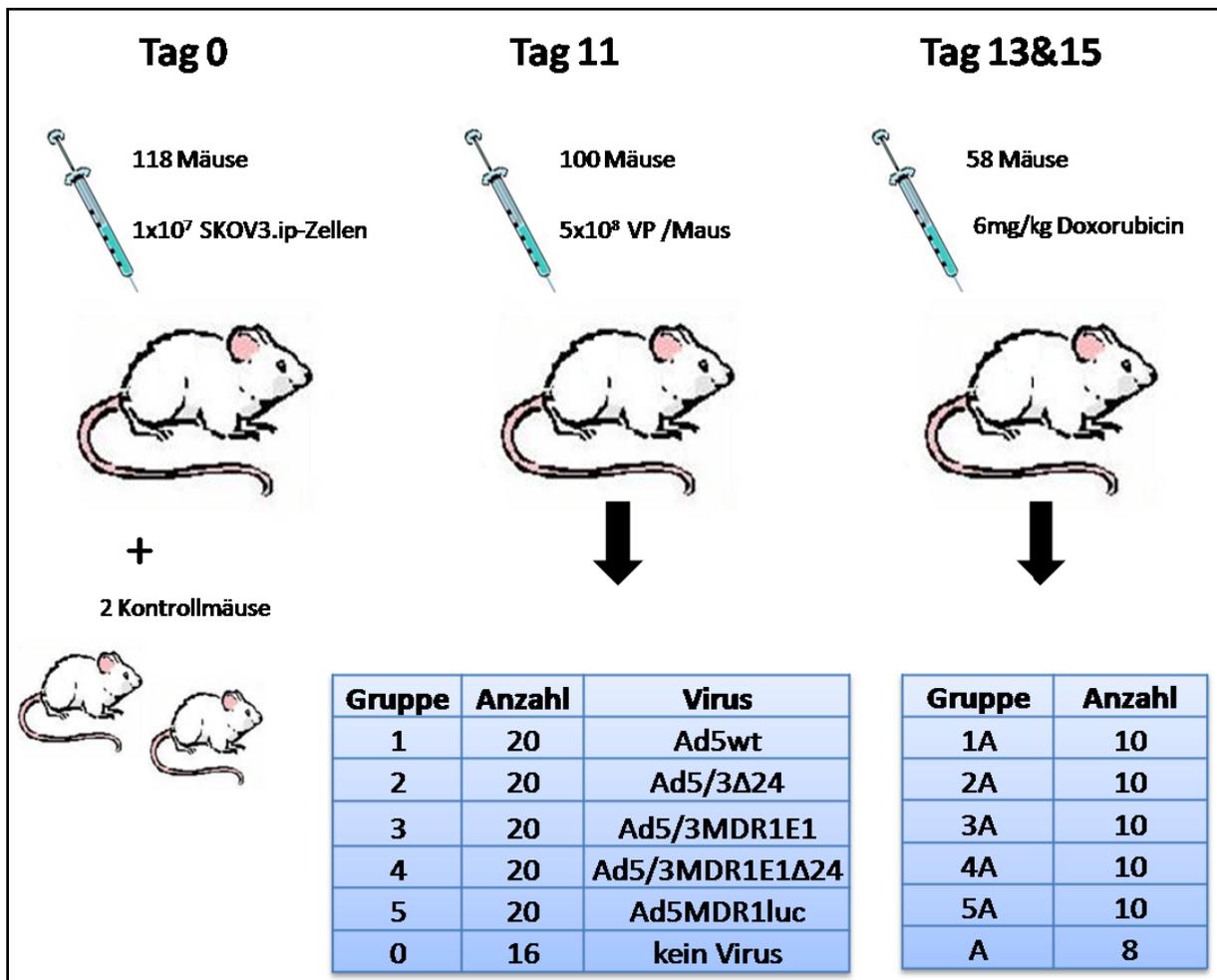


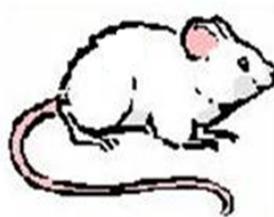
Abb.9: Versuchsschema. Implantation von SKOV3.ip an Tag 0, Applikation der viralen Therapie entsprechend der jeweiligen Gruppe an Tag 11, Applikation der Chemotherapie an Tag 13 und 15 bei der Hälfte der Mäuse.

Ausgangspopulation

Beide Gruppen erhielten SKOV3.ip-Zellen



Chemotherapie-Gruppe



Gruppe ohne Chemotherapie



Gruppe	Anzahl (n)	Virus
1A	10	Ad5wt
2A	10	Ad5/3Δ24
3A	10	Ad5/3MDR1E1
4A	10	Ad5/3MDR1E1Δ24
5A	10	Ad5 MDR1luc
A	8	kein Virus

Gruppe	Anzahl (n)	Virus
1B	10	Ad5wt
2B	10	Ad5/3Δ24
3B	10	Ad5/3MDR1E1
4B	10	Ad5/3MDR1E1Δ24
5B	10	Ad5MDR1luc
B	8	kein Virus

+



2 Kontrollmäuse

Abb.10: Ausgangspopulation. Nach Implantation von SKOV3.ip und Applikation der viralen Therapie erhielten 58 Mäuse eine Chemotherapie (Gruppe A) und 58 Mäuse keine Chemotherapie (Gruppe B). 2 Kontrollmäuse ohne jegliche Injektion.

2.2.7 Probenentnahme der Mäuse

Verstorbene Versuchstiere wurden unter der Reinraumwerkbank der TVA sezirt.

Bei der Sektion der Mäuse wurden diese in Rückenlage auf einer Unterlage fixiert. Nach Eröffnung der Bauchhaut wurden zunächst zwei Peritonealgewebeproben entnommen. Anschließend wurde der Bauchraum auf pathologische Veränderungen hin inspiziert. Bei Vorliegen eines Tumors wurden hiervon ebenfalls zwei Proben entnommen. Zuletzt wurden zwei Gewebeproben aus der Leber entnommen. Am letzten Tag des Versuches wurden alle überlebenden Tiere entsprechend der Protokolle mittels zervikaler Dislokation getötet und Gewebeproben entnommen.

Die Proben wurden in beschriftete, sterile Eppendorf-Tubes konserviert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt gelagert. Die Hälfte der Proben wurde für die DNA-Analytik bei -80°C gelagert. Die andere Hälfte wurde jeweils in 10%igem Formalinaldehyd konserviert und im weiteren Verlauf für die HE-Schnitte und die Immunhistochemie verwendet.

Tabelle 4 beinhaltet alle verwendeten Chemikalien, Lösungen und Materialien für die Zellkultur und den Tierversuch

Tab.4 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien für Zellkultur und Tierversuch

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Standardkulturmedium DMEM	Invitrogen, Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA [®]
L-Glutamin 20 mM	Invitrogen, Gibco
Gentamycin 50 µg/ml	Invitrogen, Gibco
Foetal Calf/Bovin Serum (FCS),500ml	Mycoplex, A 15-773 (PAA)
Trypsinlösung	Sigma
PBS Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Austria
Formaldehyd (37%, v/v)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
SKOV3 i.p.	Prof Curiel Univ. of Alabama, USA
Doxorubicin Injektionslösung (2mg/ml)	Medac, Hamburg

Materialien und Geräte	Hersteller
Gewebekulturflaschen 250ml, 550ml	Cellstar®, Greiner bio-one
Kryoröhrchen	Cellstar®, Greiner bio-one
Sterile Einmalpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcon- Tubes 15ml, 50ml	Cellstar®, Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorfröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Lauda, Wobser GmbH
Mikroskop	Wilovert®, Wetzlar
Sterilbank	Clean Air, Hilden
Zentrifuge	Megafuge1.0, Heraeus
Digitalkamera	DXM 1000, Nikon

2.3 DNA- Analytik

Um Korrelationen zwischen der Überlebenszeit der Versuchstiere und der Effizienz der modifizierten Adenoviren untersuchen zu können sollte im folgenden DNA aus den asservierten Gewebeproben gewonnen und diese auf ihren Gehalt an Viruspartikeln hin untersucht werden.

2.3.1 DNA- Isolation aus Gewebe

2.3.1.1 Probengewinnung mit Hilfe des Dismembrators

Das zuvor bei -80°C gelagerte Material wurde während des Aufbereitungsprozesses kühl in einer Styropor-Box aufbewahrt. Die einzelnen Gewebeproben (Leber-, Peritoneum- bzw. Tumorgewebe) wurden auf einer sterilen Arbeitsfläche auf Trockeneis gelegt und mit einem scharfen Skalpell zu gleichgroßen Untersuchungsproben präpariert. Das gewonnene Gewebe wurde in einer Teflonkapsel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Hilfe einer Wolframkugel mechanisch im Mikrodismembrator pulverisiert (1 Minute bei 2000rpm). Das pulverisierte Gewebe wurde in 2 ml DNA- Verdaupuffer aufgenommen, mit Proteinase K versetzt und in 15 ml Falcon- Tubes überführt. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln.

2.3.1.2 Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol (PCI)- Extraktion

Für die DNA- Extraktion wurden die Proben mit einem Volumen Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und nach Durchmischung für 10 min bei 400 rpm und 20°C zentrifugiert. Die DNA- haltige, wässrige Oberphase wurde in ein neues Falcon Tube überführt und zur vollständigen Entfernung des Phenols mit dem gleichen Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol gemischt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde der wässrige Überstand mit 0.5 Volumen Ammoniumacetat sowie 2 Volumen Ethanol absolut (-20°C) über Nacht bei -20°C gelagert. Durch Zentrifugieren für 10 min (2000rpm bei 4°C) erreichte man die Präzipitation der DNA. Das sedimentierte Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Aqua dest gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

2.3.1.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration in Lösung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260nm/280nm wurde zur Kontrolle des Reinheitsgrades herangezogen, wobei man bei DNA von einem Optimalwert von >1,7 ausgeht. Die Nukleinsäure-Konzentration errechnet sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt: $c = E \times 1/e \times 1/d$

c: Konzentration in mg/ml; E: Extinktion bei 260 nm; d: Schichtdicke der Küvette = 1 cm

Der molare Extinktionskoeffizient e beträgt bei 260 nm für RNA und einzelsträngige DNA 25cm²/mg, für doppelsträngige DNA 20 cm²/mg und für Oligonukleotide 30 cm²/mg.

Anschließend wurden alle Proben durch Verdünnung mit Aqua dest. auf eine Ausgangsmenge von 100 ng/ µl verdünnt.

2.3.2 Real-Time PCR zur Bestimmung der Viruslast in Leber, Peritoneum und Tumor

Die Polymerase- Ketten- Reaktion ist eine Methode um definierte DNA- Sequenzen zu vervielfältigen und basiert auf der Abfolge von 3 sich zyklisch wiederholenden Reaktionsschritten: Im ersten Schritt erfolgt die Trennung der DNA- Doppelstränge (1.Schritt: Denaturierung), anschließend folgt die Bindung der Primer an die DNA- Einzelstränge (2.Schritt: Annealing) und im letzten Schritt die Synthese des neuen komplementären Stranges (3.Schritt: Extension). Da jeder Zyklus eine Verdopplung der im Reaktionsansatz

befindlichen DNA- Sequenz zur Folge hat, kommt es durch Wiederholung dieser Reaktionsschritte zu einer exponentiellen Vermehrung der Ausgangssubstanz.

2.3.2.1 Grundlagen der Real Time PCR

Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf der Detektion und Quantifizierung eines fluoreszierenden Reporters während der PCR- Amplifikation. Die emittierte Fluoreszenz verhält sich während der Reaktion proportional zum PCR- Produkt und ermöglicht somit die Bestimmung der Ausgangskonzentration der Zielsequenz. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in der sehr guten Reproduzierbarkeit und in der Erfassung großer Konzentrationsbereiche in der Ausgangsprobe.

Grundsätzlich stehen zwei unterschiedliche Reportermöglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann das Fluoreszenzsignal von einer sequenzspezifischen Sonde gesendet und empfangen werden (Reporter und Quencher). Die einfachere und kostengünstigere Variante macht sich einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff wie SYBR Green oder Ethidiumbromid zunutze um die Amplifikation zu monitoren. Nach Anlagerung der Chemikalie in doppelsträngige DNA (ds-DNA) und Anregung durch ultraviolettes Licht kommt es zu einer Fluoreszenzemission. Da hierbei alle doppelsträngigen DNA- Strukturen gebunden und somit auch unspezifische PCR- Produkte detektiert werden können, ist eine sorgfältige Optimierung der PCR- Bedingungen sowie eine eindeutige Differenzierung zwischen spezifischen und nicht spezifischen PCR- Produkten mittels Schmelzkurvenanalyse notwendig (s.u). Zur Quantifizierung der PCR-Produkte muss ein Fluoreszenzschwellenwert („*Threshold Cycle*“ oder Ct-Wert) festgelegt werden. Der Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes die Basisfluoreszenz, welche zu Beginn des Experimentes durch den Fluoreszenzfarbstoff hervorgerufen wird, signifikant übersteigt. Der Schwellenwert wird vom Anwender bestimmt und sollte zu Beginn der exponentiellen Phase gewählt werden. Für jede PCR-Probe wird der jeweilige Ct-Wert über die Software ermittelt.

Quantitative Real-Time PCR lässt sich in 2 Kategorien einteilen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Target- Konzentration stets in Relation zu einem so genannten Housekeeping- Gen angegeben, welches als konstant angenommen wird. Bei der absoluten Quantifizierung setzt man einen externen Standard ein, der dieselbe Nukleinsäuresequenz wie das Target besitzt. Bei jedem Probenlauf wird eine Verdünnungsreihe dieses externen

Standards mitgeführt und amplifiziert. Die Ct- Werte und die bekannten Konzentrationen des eingesetzten Standards ergeben eine Eichgrade, die es erlaubt mit Hilfe des Ct- Wertes des untersuchten Targets auf dessen Ausgangskonzentration zu schließen. Die für die Eichkurve ausgewählten Konzentrationen des externen Standards sollten dem erwarteten Konzentrationsbereich des Targets entsprechen.

2.3.2.2 Real Time PCR zum Nachweis des adenoviralen E4- Gens

Zur Bestimmung der Viruslast wurde die aufgereinigte DNA aus Tumor-, Peritoneum- und Lebergewebe-Proben mittels Real-Time PCR quantifiziert. Um die Viruslast, ausgedrückt durch die E4-Kopienzahl, später auf die Menge zellulärer DNA beziehen zu können wurde in jeder Probe eine Sequenz des adenoviralen E4-Gens und des zellulären β -Aktin Referenzgens quantifiziert. Die absolute Quantifizierung beider Gen- Sequenzen erfolgte dabei über die Verwendung je eines externen DNA-Standards, der in der gleichen PCR mit aufgetragen wurde. Für die absolute Quantifizierung des viralen E4-Gens wurde eine serielle Verdünnungsreihe des hochreinen Plasmids pTG3602 verwendet welches eine Kopie des adenoviralen E4-Gens trägt. Für die absolute Quantifizierung der β -Aktin- Sequenz wurde eine serielle Verdünnungsreihe genomischer DNA eingesetzt. In den Leber- und Peritoneum-Proben diente das Maus β - Actin-Gen, in den Tumorproben das humane β - Actin- Gen als Referenzgen. Die sich hieraus ableitenden Standardkurven ermöglichten eine absolute Quantifizierung der Startmenge des Targets.

Tabelle 5 zeigt die verwendeten Primer- Sequenzen für die Quantifizierung des adenoviralen E4- Gens.

Tab.5: Sequenzen der Primer für die Quantifizierung der adenoviralen Partikel mittels Real- Time PCR

Adenovirale E4- Sequenz	
Forward- Primer	5'- GGAGTGCGCCGAGACAAC-3'
Reverse- Primer	5'- ACTACGTCCGGCGTTCCAT-3'
Human β- Aktin- Sequenz	
Forward- Primer	5'- TAAGTAGGCGCACAGTAGGTCTGA-3'
Reverse- Primer	5'- AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAGT-3'

Maus β-Actin- Sequenz	
Forward- Primer	5'-CGAGCGGTTCCGATGC-3'
Reverse- Primer	5'- TGGATGCCACAGGATTCCAT-3'

Etablierung

Zur absoluten Quantifizierung wurde für die Zielgene (E4-Gen, Maus- β -Actin, Human- β -Actin) jeweils eine Standardkurve erstellt. Für die jeweiligen Standardkurven wurden entsprechende serielle Verdünnungen einer Plasmid- DNA (pTG3602), humaner SKOV- Zellen sowie genomischer Maus-DNA hergestellt und eingesetzt. Die Ausgangskonzentration wurde photometrisch ermittelt. Bei der Plasmid- DNA konnte mit Hilfe des Molekulargewichtes auf die E4-Kopienzahl/ Viruspartikel geschlossen werden. Um ein möglichst genaues Endergebnis zu erzielen wurde bei der Erstellung der Verdünnungsreihen auf hohe Pipettiergenauigkeit geachtet sowie Doppelbestimmungen der Standardkurven durchgeführt. Hierbei zeigten sich nur geringe Standardabweichungen (0,1-6%SD für Maus β -Actin, 0,6-1,4%SD für human β -Actin, 0,4-2% für E4). Die Standardkurve ergibt sich aus der logarithmischen Auftragung der eingesetzten DNA-Menge bzw. Gen-Kopienzahl gegen den Ct- Wert und hat die Form

$$Ct = m \times x + b$$

wobei m die Steigung der Geraden, x die eingesetzte DNA- Menge und b den y-Achsenabschnitt darstellt. Durch Umstellen der Geradengleichung ($x = (Ct - b) / m$) kann anhand der Standardkurve für jede unbekannte Probe die DNA-Menge bzw. die E4-Kopienzahl bestimmt werden.

Die lineare Korrelation innerhalb einer Standardkurve wird durch das Bestimmtheitsmaß R^2 angezeigt. Die R^2 – Werte lagen bei 0,99 was einen starken linearen Zusammenhang darstellt und somit eine hohe Genauigkeit der Standardkurven belegt.

Die Steigung der Standardkurve lässt auf die Effizienz der Real- Time PCR zurückschließen. Eine Steigung m von $-3,32$ würde eine Effizienz von 100 % bedeuten, d. h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus. Häufig findet man Effizienzen über 100 % was theoretisch nicht möglich ist.

Um eine hohe Genauigkeit der Standardkurven zu gewährleisten wurden zu Beginn die 3 Verdünnungsreihen in ausreichender Menge angesetzt und in Aliquots aufgeteilt. Diese wurden bei -80°C eingefroren und jeweils unmittelbar vor Durchführung der Real-Time PCR aufgetaut.

Bei jedem Probendurchlauf wurden ein β -Actin und ein E4-Standard mitgeführt. Für die zelluläre DNA (gemessen am β - Actin- Gen) wurde ein Konzentrationsbereich von 0,002- 2 ng und für das virale E4-Gen ein Konzentrationsbereich von $10^3 - 10^8$ Kopien pro 25 μ l Reaktionsvolumen festgelegt. Jeder PCR- Durchlauf umfasste 3 non- Template Kontrollen die für beide Gene negativ waren, sodass eine Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte.

Als Qualitätskontrolle, um eine Aussage über die Reinheit der gebildeten PCR- Produkte treffen zu können wurde abschließend nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hiermit ist es möglich die eventuelle Amplifikation unerwünschter Produkte bzw. die Ausbildung von Primer- Dimeren zu detektieren.

Durchführung

Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei die Reaktionsansätze auf die Hälfte des Volumens (25 μ l) reduziert wurden. Für den E4- und den β -Aktin Nachweis wurde jeweils ein Mastermix vorbereitet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das lichtempfindliche SYBR Green bis kurz vor dem Gebrauch lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Anschließend wurden jeweils 23 μ l Mastermix pro Tube vorgelegt. Nach Zugabe von 2 μ l Template (der jeweiligen Probe) wurden die Platten mit Kaps verschlossen. Um Tropfenadhäsionen zu vermeiden wurde die Platte für 1 min zentrifugiert. Die Real- Time PCR wurde an einem Thermocycler von ABI durchgeführt und mittels der Software verarbeitet. Die genauen PCR-Bedingungen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab.6: Reaktionsansatz (nach Applied Biosystems) und Real- Time PCR-Bedingungen:

Substanz	Volumen (μ l)	PCR- Bedingungen
Template	2	HotGoldStar Aktivierung 95°C→15 min
SYBR Green PCR Master Mix	12,5	94°C→15sec
Primer forward	1	60°C→30sec
Primer reverse	1	72°C→30sec
RNA-freies Wasser	8,5	40 Zyklen

2.3.2.3 Schmelzkurvenanalyse

Da SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA- Moleküle bindet ist eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle der Reaktion erforderlich. Mittels dieser wird überprüft ob es ausschließlich zur Amplifikation *eines* PCR- Produktes gekommen ist. Hierbei macht man sich zunutze, dass die Länge unterschiedlicher Amplifikate die Temperatur bestimmt, bei der die Doppelstränge der PCR- Produkte voneinander dissoziieren. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert.

Unmittelbar nach dem letzten Zyklus der Real- Time- PCR wurde durch langsames Erhöhen der Temperatur 50 °C → 95 °C mit 0,1-0,2°C/ s die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.3.2.4 Optimierung der PCR- Bedingungen

Zur Optimierung der PCR Bedingungen wurden sowohl der Maus β -Actin, der human β - Actin und der E4 Primer im Vorfeld auf ihr Temperaturoptimum untersucht. Hierzu wurden PCR Durchläufe mit variierenden Annealingtemperaturen von 56°C, 58°C, 60°C und 62°C durchgeführt. Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegel aufgetrennt. Sowohl für den E4- als auch für den Maus- und human β -Actin- Primer ergab sich ein Optimum von 60°C.

2.3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 2 %-igen Agarosegelen (w/v in 1x TBE-Puffer). Je 5 μ l der Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SB-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Längenstandard wurde die SmartLadder (Eurogentec) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 80 bis 110 Volt für ca. 60 Minuten. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (EtBr, 10 μ g/ml) für mindestens 30min gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=312$ nm) wurde die Fluoreszenz des interkalierten EtBr angeregt und die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

Eine Auflistung aller verwendeten Materialien bei der DNA-Analytik zeigt Tabelle 7.

Tab.7 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien bei der DNA Analytik

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
DNA Verdaupuffer	Eigenherstellung s.u.
Proteinase K: 0,1 mg/ml Verdaupuffer	Sigma
PCI (Phenyl-Chloroform-Isoamylalkohol)	Sigma
Ammoniumacetat	MERCK
Aqua dest.	MERCK
Ethanol absolut	MERCK
Ethanol 75%	Selbsterstellung aus Ethanol abs
Trockeneis	
SYBR Green, PCR Master Mix 1,7ml,	QuantiTec , Qiagen
RNase free Water	MERCK
Template	DNA aus isolierten Gewebeproben
Plasmid pTG3602	Transgene, Strasbourg, Frankreich
humane genomische DANN	Prof Curiel, USA
genomische Wildtyp-DNA Maus	Mausstamm C57BL6N

DNA Verdaupuffer: 100mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 8, 25mM EDTA pH8, 0.5% SDS

Materialien und Geräte	Hersteller
Einmalskalpell	FEATHER
Teflonkapsel	Sartorius
Wolframkugel, 10 mm	Braun, Biotech Int., Melsungen
Dismembrator	Sartorius
Zentrifuge	Eppendorf- Neatheler- Hinz GmbH
Calculator for determing the copy-number of a template	Uri Genomics& Sequencing Center
Opical Tubes	Micro Amp, Applied Biosystems
Optical 8-Cap Strip	Micro Amp, Applied Biosystems
Thermocycler	ABI Prism 7900 Sequence Detection System

2.4 Immunhistochemie

Zur Darstellung des viralen E1A Proteins im Tumorgewebe wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Bei dieser Methode nutzt man spezifische Bindungen von Antikörpern an bestimmte Antigenstrukturen der Zielzellen.

2.4.1 Immunhistochemische Färbung nach der ABC- Methode

Die immunhistochemische Färbung wurde nach der Avidin- Biotin- Komplex- Methode (ABC- Methode) unter Verwendung des Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kits durchgeführt. Diese Methode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin. Nach Inkubation der Gewebeproben mit einem Primärantikörper erfolgt die Zugabe des gegen den Primärantikörper gerichteten, biotinylierten Sekundärantikörpers. Als drittes Reagenz wird der Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex aufgetragen, der aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Zuletzt wird durch Zugabe einer chromogenen Substratlösung, diese durch die Peroxidase-Aktivität oxidiert und als braunes Präzipitat sichtbar. Eine schematische Darstellung der Immunhistochemischen Färbung zeigt Abbildung 11.

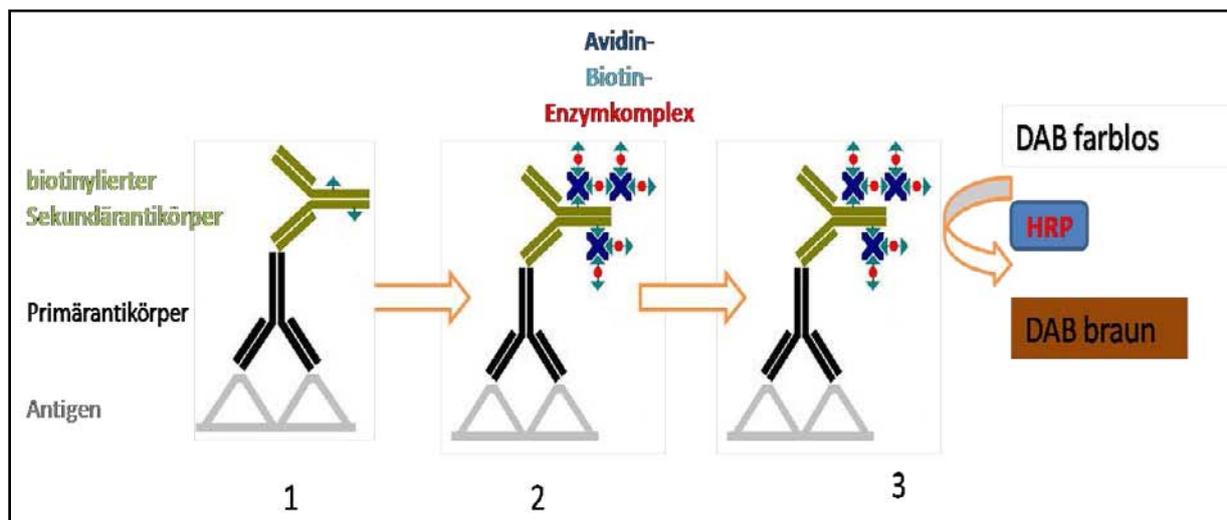


Abb.11: Schematische Darstellung der ABC- Methode 1. Inkubation der Gewebeproben mit Primärantikörper und Zugabe des gegen den Primärantikörper gerichteten, biotinylierten Sekundärantikörpers. **2.** Zugabe des Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex, der an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. **3.** Zugabe des Peroxidase Substrats DAB welches oxidiert und als braunes Präzipitat sichtbar wird. HRP= Horseradish-Peroxidase

2.4.2 Vorbehandlung und Färbung des Untersuchungsgewebes

Die in Formalin fixierten Gewebestücke wurden zunächst entwässert und anschließend mittels Paraffin- Ausgießstation in Paraffin eingebettet. Von den entstandenen Paraffinblöcken wurden mittels Rotationsmikrotom 4-5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Diese wurden für 10 Min in einem 42°C warmen Streckbad gelagert.

Für die Färbung wurden die Schnitte für 25 min in Xylol entparaffinisiert und durch eine absteigende Alkoholreihe (99,5%, 96%, 80%- je 3 min) entwässert. Anschließend wurden die Schnitte mittels PBS rehydriert. Da es durch die Formalinfixation unter Umständen zu Veränderungen der Epitopstrukturen (inter- und intramolekulare Cross-links) kommen kann wurden die Objektträger 15 min lang in Citratpuffer gekocht (Demaskierung). Zur Vermeidung einer unspezifischen Umsetzung der chromogenen Substratlösung wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid (15 min) inaktiviert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen wurde durch Inkubation mit Normalserum durchgeführt (30 min). Anschließend erfolgte die Färbung nach Herstellerempfehlung. Nach Abklopfen des Normalserums wurden die Proben mit dem Ad-E1A- spezifischen, polyklonalen IgG- Primärantikörper aus dem Kaninchen für 45 min inkubiert. Danach wurde der biotinylierte Sekundärantikörper im Überschuss für 30 min aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Während dessen wurde die DAB-Chromogen-Lösung nach Herstellerangaben zubereitet. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils das Spülen mit PBS. Nach Zugabe des DAB- Substrates und Inkubation für 5 min wurden die Proben mit Leitungswasser gespült und anschließend eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 2-3 sec durchgeführt. Überschüssiges Hämalaun wurde mit Leitungswasser abgespült. Die gefärbten Zellkerne erhielten im stark sauren Milieu eine blaue Farbe. Zur möglichst vollständigen Entwässerung wurden die Präparate einer aufsteigenden Alkoholreihe mit finaler Xylol-Inkubation unterzogen. Die Objektträger wurden schließlich mit Eukitt®, einem wasserfreien Einschlussmittel für die mikroskopische Technik, eingebettet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte lichtmikroskopisch. Abschließend wurden die Zellpräparate mit einer Digitalkamera, die an das Phasenkontrast-Mikroskop angeschlossen war, fotografiert.

Tab.8 Verwendete Chemikalien und Lösungen bei der IHC

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kits	Vector Laboratories
Primärantikörper Ad-2/5 E1A (13S-5):sc-430	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG biotinylierter Sekundär-AK	Vectastain ABC- Peroxidase Kit
DAB (3,3' Diaminobentidin- Tetrahydrochlorid)	SkyTec
Hämalaun	nach Meyer, MERCK
Einschlussmittel Eukitt®	Kindler GmbH & Co
Xylol	MERCK
absteigende Alkoholreihe (99,5%, 96%, 80%) aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 99,5%)	
3% Wasserstoffperoxid	Selbsterstellung aus Stammlösung
Normalserum (Horse Normal Serum)	Vectastain ABC- Peroxidase Kit
Citrat Puffer	Selbsterstellung aus Stammlösung
PBS Puffer	Selbsterstellung aus Stammlösung

Materialien und Geräte	Hersteller
Mikroskop	
Kamera	DXM 1000, Nikon
Objektträger	
Rotationsmikrotom	

Citrat Puffer: Stammlösung (MERCK):

21g Citronensäure Monohydrat auf 1000ml Aqua dest

pH 6.0 mit 2N NaOH eingestellt

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest verdünnt

PBS Puffer: Stammlösung (MERCK):

80 g NaCl, 2 g KCl, 5,71 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄

Substanzen in 1000ml Aqua dest. lösen und pH 7,4 einstellen

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

3% H₂O₂: Stammlösung (MERCK) mit Aqua dest 1:10 verdünnt

2.5 HE- Färbung

Die in Formalin fixierten Gewebestücke wurden zunächst entwässert und anschließend mittels Paraffin- Ausgießstation in Paraffin eingebettet. Von den entstandenen Paraffinblöcken wurden mittels Rotationsmikrotom 4-5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Diese wurden für 10 Min in einem 42°C warmen Streckbad gelagert. Anschließend wurden die Schnitte für 2x10 Minuten in Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte mittels Mayer`s Hämalaun für 10 Minuten, anschließendem kurzen Spülen in Aqua dest. und Bläuen in warmem Leitungswasser für weitere 10 Minuten. Das Zytoplasma wurde zunächst mit einer 1%igen Eosin g- Lösung für 3 min angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die gefärbten Präparate wurden mit Eukitt eingedickt und anschließend am Phasenkontrast- Mikroskop ausgewertet.

Die Beurteilung der Ergebnisse wurde zusätzlich durch Herrn Prof. Baldus aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf überprüft.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung werden die Daten aus unabhängigen Experimenten verwendet. Die Quantifizierung der viralen Partikel mittels Real-Time PCR wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt. Es werden stets Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Im Falle einer Berechnung der Signifikanz wird der Mann-Whitney-U Test verwendet. P-Werte unter $<0,05$ werden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem *in vivo Versuch* überprüft ob durch die Kombination von transduktionalen und transkriptionellen Targetingstrategien bereits *in vitro* erfolgreich getesteter CRAd's, Vorteile hinsichtlich des Überlebens sowie der Tumorselektivität und onkolytischen Potenz beim Ovarialkarzinom bestätigen können. Die Verifizierung dieser Ergebnisse *in vivo* stellt einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung eines tumorselektiven, sicheren klinischen Gentherapieansatzes dar.

Durch eine Promotor- Steuerung der adenoviralen Replikationsgene wird versucht die Replikation der Adenoviren derart zu kontrollieren, dass der adenovirale Vermehrungszyklus selektiv in Tumorzellen erfolgt (transkriptionelles Targeting). Hierzu wird der natürliche E1 Promotor durch transkriptionsregulatorische Sequenzen des MDR1- Gens ersetzt. Der in dieser Arbeit untersuchte Promotor MDR1 ist ein induzierbarer Promotor der in *in vitro* Studien eine erhöhte Aktivität in Chemo- vorbehandelten Zellen aber auch in primär unbehandelten Tumorzellen im Vergleich zu Normalgewebszellen gezeigt hat.

Da die erfolgreiche Internalisierung den ersten Schritt einer effizienten Replikation in den Zielzellen darstellt, wurden Kapsid- modifizierte Viren untersucht, die in Vorversuchen *in vivo* und *in vitro* einen optimierten viralen Tropismus gezeigt haben. Durch den Einsatz der 5/3 Fiberchimäre mit einem Ad5 basierten Shaft und einem Ad3-Knob sollte eine hohe Infektionsrate der malignen Zielzellen gewährleistet werden. Sie zeigten in vorherigen Untersuchungen einen Vorteil bei der Transduktionsrate, der dem Ad5-Fiber und der RGD-Fiberchimäre deutlich überlegen ist (Kanerva et al. 2002).

Die 24bp-Deletion im E1A Gen stellt für die klinische Anwendung einen zusätzlichen Sicherheitsmechanismus dar, da somit die virale Replikation in Normalgewebszellen im Idealfall verhindert wird.

Um die bisher durch *in vitro* Untersuchungen gesammelten Ergebnisse mit den MDR1-CRAd's an einem *in vivo* Versuch verifizieren zu können wurde ein Tiermodell gewählt, welches die klinische Situation eines lokal fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms bestmöglich simuliert. Hierzu erschien das Modell einer Peritonealkarzinose in immundefizienten SCID Mäusen geeignet. Primärer Untersuchungsparameter ist die Überlebenszeit der Mäuse.

3.1 Charakterisierung der verwendeten CRAd's

Die effiziente Replikation und die Spezifität onkolytischer Adenoviren stellt die Hauptproblematik der Krebsgentherapie mit Adenoviren dar. In der vorliegenden Arbeit wurden konditional replizierende Adenoviren verwendet welche transkriptionelle und transduktionale Targetingstrategien vereinen. Der Einsatz fiberchimerisierter CRAd's soll die Infektionsrate erhöhen und somit den ersten Grundstein einer effizienten Replikation legen. Um die replikative Potenz zu erhöhen und die onkolytischen Effekte auf das Tumorgewebe zu beschränken wurde der MDR1-Promotor gewählt.

Das Wildtypvirus Ad5wt dient als Kontrollvirus. Es hat keine Fibermodifikation und die virale Replikation wird über den Wildtyp E1 Promotor gesteuert. Ad5/3 Δ 24 ist eine Fiberchimäre mit Ad5 shaft und der Knob-Domäne des Ad3. Desweiteren enthält das E1A Gen eine 24bp-Deletion in der constant region 2 (CR2), wodurch eine Replikation in ruhenden Zellen verhindert werden soll. Es dient als isogenetisches Vergleichs-CRAd. Bei den Viren Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24 wurde der natürliche E1-Promotor deletiert und durch den MDR1- Promotor ersetzt. Beide Vektoren besitzen die Fibermodifikation. Ad5/3MDR1E1 Δ 24 enthält zusätzlich eine 24bp-Deletion des E1A- Gens. Als Negativkontrolle dient das replikationsdefiziente Virus Ad5MDR1luc. Hier ist das komplette E1-Gen deletiert und durch das Luziferase- Reporter gen ersetzt. Dieses steht unter der Kontrolle des MDR1-Promoters. In Abbildung 12 sind die in dieser Arbeit verwendeten Viren schematisch dargestellt.

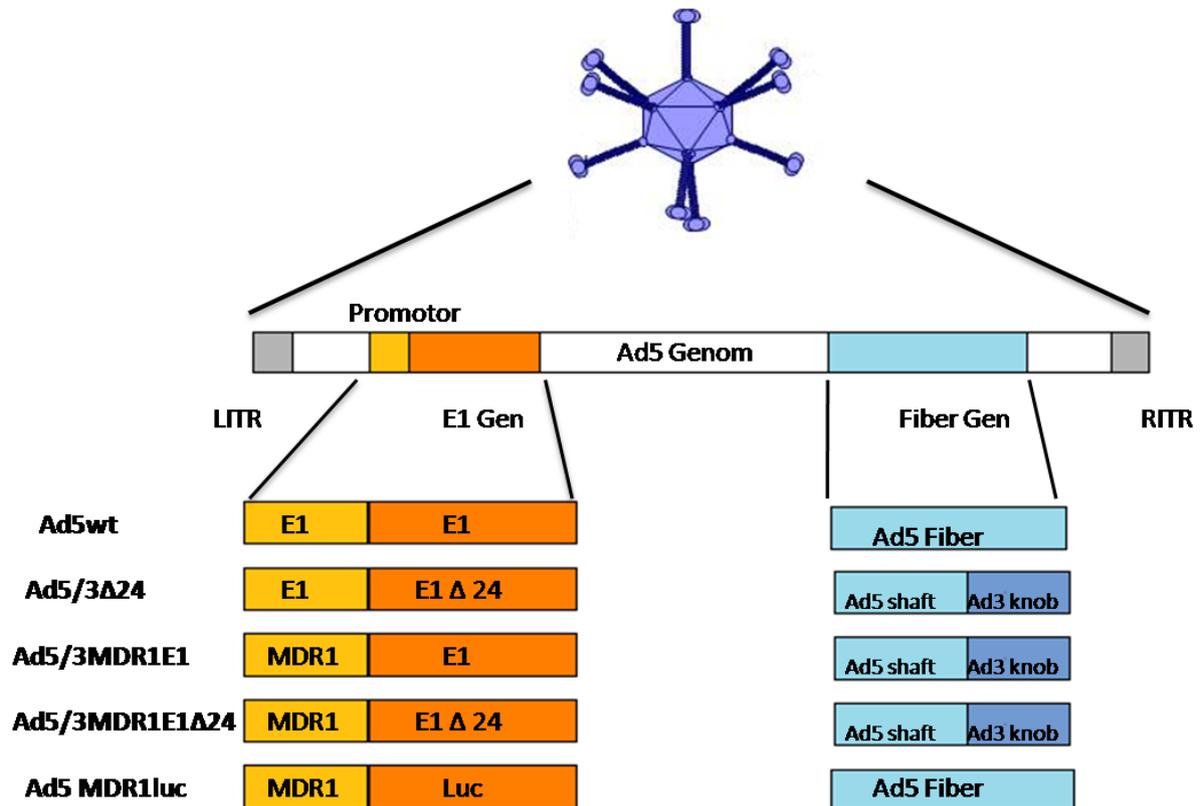


Abb.12: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Viren.
 Modifikationen des E1-Gens, des Promotors und des Fiber-Knob-Gens.

3.2 Untersuchung der Effektivität in einem Tierexperiment

Als orthotopes Modell für ein weit fortgeschrittenes Ovarialkarzinom wurden Tumormetastasen intraperitoneal durch Applikation von 10^7 SKOV3.ip Zellen pro Maus etabliert. An Tag 11 erfolgte die intraperitoneale Applikation von Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24 beziehungsweise Ad5MDR1luc. Eine Kontrollgruppe erhielt kein Virus. Zur Annäherung an die klinische Situation erfolgte bei der Hälfte der Mäuse an Tag 13 und 15 die intraperitoneale Applikation von Doxorubicin. Im Anschluss wurden die Mäuse 120 Tage lang beobachtet und die Überlebenszeit verglichen.

3.2.1 Ergebnisse der Gruppe mit Chemotherapie

In der Gruppe mit Applikation von Zytostatika, betrug nach Gabe von Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24, Ad5MDR1luc oder keinem Virus das mediane Überleben 18,18,18,18,24 bzw. 21 Tage. In dieser Teilpopulation lässt sich kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit zwischen den replizierenden Virusgruppen erkennen. Es fällt

auf, dass 67% der Mäuse die mit einem replizierenden Virus (Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24) behandelt wurden bis zu Tag 18 verstorben sind. Das entspricht dem 3. Tag nach Applikation der zweiten Doxorubicin Dosis. Bis zu Tag 20 (5.Tag nach Chemo-Applikation) waren 87,5 % aus diesen Gruppen verstorben. In einem paarweisen Vergleich zeigt die Subpopulation, der mit Ad5MDR1luc therapierten Mäuse eine signifikant höhere Überlebensrate ($p \leq 0,01$) als alle anderen Mäusegruppen die eine Virotherapie erhielten (Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24). Die Kontrollgruppe ohne Virus zeigt ebenfalls ein signifikant höheres Überleben als Ad5wt, Ad5/3Δ24 und Ad5/3MDR1E1 ($p \leq 0,01$). Zwischen der Gruppe ohne Virotherapie und der mit AdMDR1luc therapierte Gruppe ist kein signifikanter Unterschied erkennbar ($P=0,92$). Abbildung 13 zeigt die Überlebenszeitkurven. Das frühe Versterben der Mäuse könnte mit der Dosierung des Zytostatikums erklärt werden.

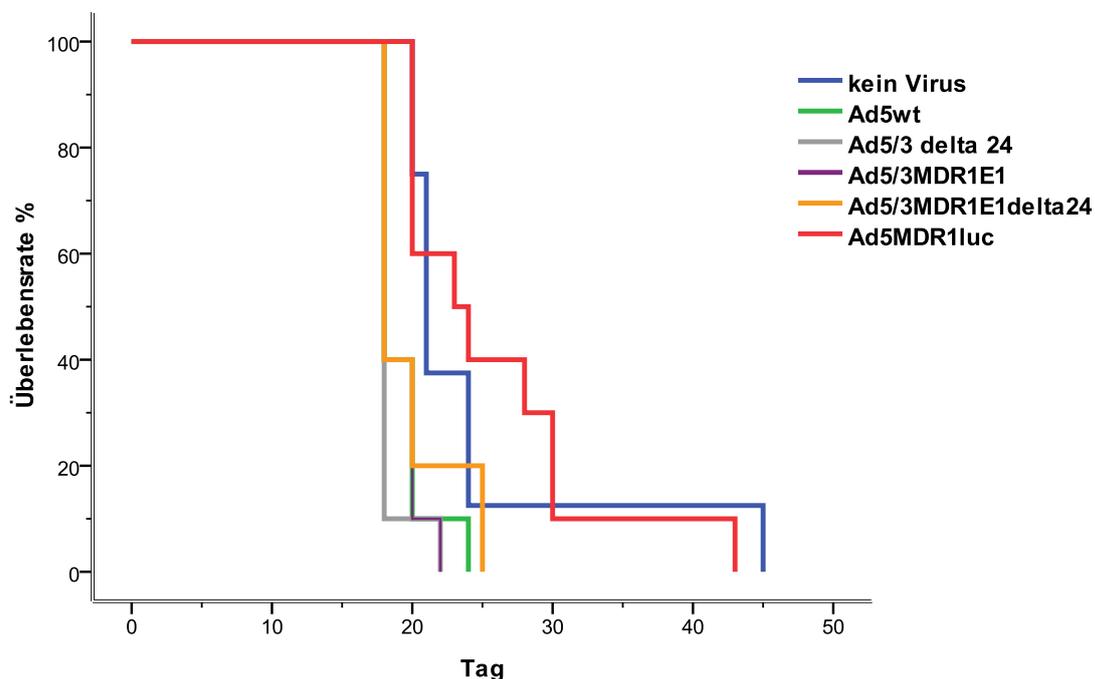


Abb.13: Untersuchung der Effektivität der MDR- CRAd's in einem SCID- Mausmodell mit intraperitonealem Ovarialkarzinom und Verabreichung einer Chemotherapie. Die Mäuse erhielten Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24, Ad5 MDR1luc oder kein Virus in einer Dosis von 5×10^8 VP an Tag 11 sowie Chemotherapie an Tag 13 und 15.

3.2.2 Ergebnisse der Gruppe ohne Chemotherapie

Die zweite Gruppe der Mäuse erhielt nach intraperitonealer Implantation der Tumorzellen keine Zytostatika sondern eine einmalige Applikation von 5×10^8 VP in 500 μ l Medium an Tag 11. Das mediane Überleben nach Gabe von Ad5wt, Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1 Δ 24, Ad5MDR1luc oder keinem Virus ist in Abbildung 14 dargestellt und betrug 18, 120, 120, 120, 43 und 36 Tage.

In der mit dem Wildtypvirus therapierten Gruppe waren an Tag 39 alle Mäuse verstorben. In der Gruppe die keine Virotherapie erhielt waren bis zu Tag 43 alle Mäuse verstorben. Somit weisen beide Gruppen ein signifikant kürzeres Überleben auf als die restlichen Gruppen (mit $p \leq 0,002$ für Ad5wt und $p \leq 0,02$ für die Gruppe ohne Virotherapie).

In einer paarweisen Untersuchung wurde eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit nach Gabe von Ad5/3MDR1E1 Δ 24 sowohl im Vergleich zu dem replikationsdefizienten Ad5MDR1luc, der Kontrollgruppe ohne Virusapplikation als auch zu der mit Wildtypvirus therapierten Gruppe beobachtet ($p < 0,0001$). Ebenso für Ad5/3 Δ 24 ($p \leq 0,002$) und Ad5/3MDR1E1 ($p \leq 0,004$), wurde eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber Ad5MDR1luc, Ad5wt, sowie der Kontrollgruppe ohne Virus erzielt.

Nach 120 Tagen überlebten 80% der Ad5/3MDR1E1 Δ 24 behandelten sowie 70% der Ad5/3 Δ 24 oder Ad5/3MDR1E1 behandelten Mäuse.

Die mit den MDR-gesteuerten CRAD behandelten Mäuse zeigten Überlebensraten in der Größenordnung wie Mäuse welche mit dem klinisch etablierten CRAD Ad5/3 Δ 24 behandelt wurden. ($P=0,98$) Gleichzeitig weisen Mäuse nach Gabe von Ad5/3MDR1E1 Δ 24 eine längere Überlebenszeit auf als solche nach Gabe von Ad5/3MDR1. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

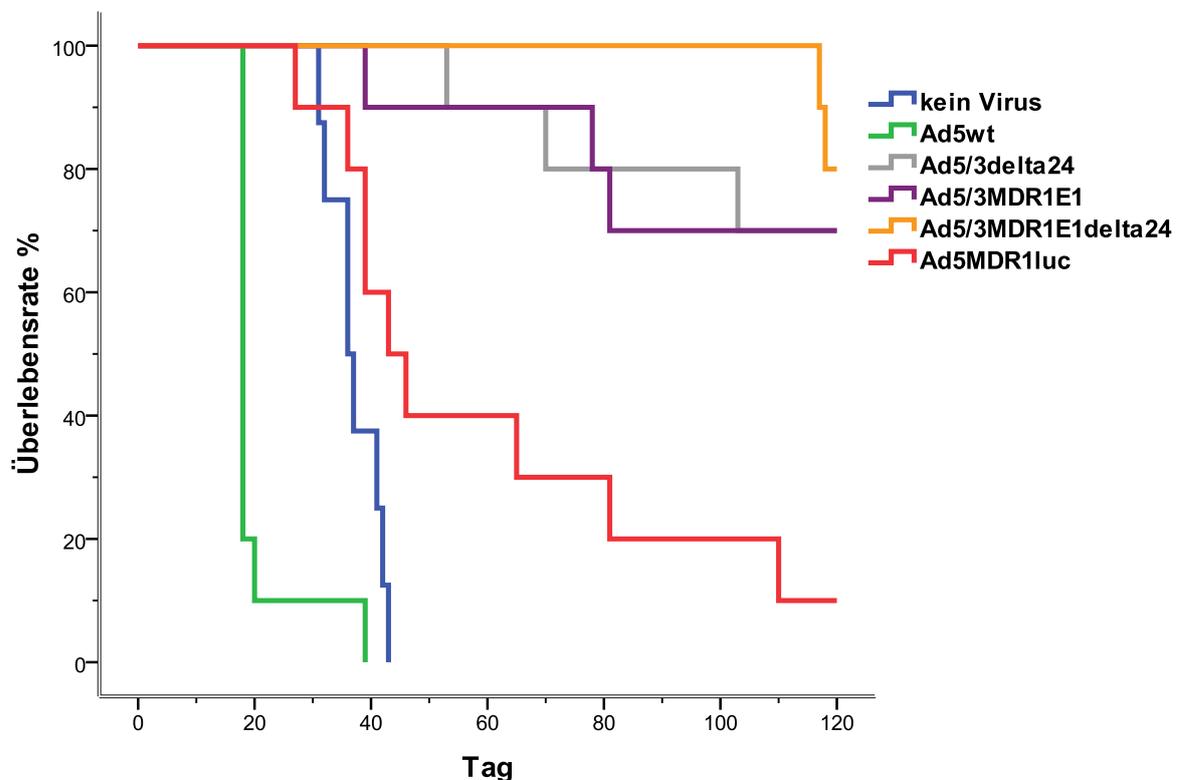


Abb.14: Untersuchung der Effektivität der MDR- CRAd's in einem SCID- Mausmodell mit intraperitonealen Ovarialkarzinomen. Die Mäuse erhielten Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24, Ad5 MDR1luc oder kein Virus in einer Dosis von 5×10^8 VP an Tag 11.

3.2.3 Untersuchung der Tumoren

Mäuse welche Doxorubicin i.p. erhielten zeigten nach der zweiten Applikation periorbital Haarausfall. Bei der Sektion der Tiere wurden Peritoneum-, Leber- und wenn möglich Tumormassen asserviert. Bei allen sehr früh verstorbenen Mäusen (<20d) waren keine makroskopisch erkennbaren Tumormassen zu erkennen. In einer Vielzahl der Fälle war eine teigige Leberkonsistenz feststellbar. Mäuse, die zu einem späteren Versuchszeitpunkt (>20d) verstorben sind bzw. bis zum Ende des Experimentes überlebten zeigten ein deutlich erkennbares Tumorkonglomerat im Unterbauch, zum Teil auch disseminierte Tumormassen. Beispielhaft sind 2 Mäuse (die an Tag 65 und Tag 80 verstorben sind) in Abbildung 15 dargestellt. Täglich wurden die Mäuse inspiziert und bei Anzeichen auf übermäßiges Leid getötet.

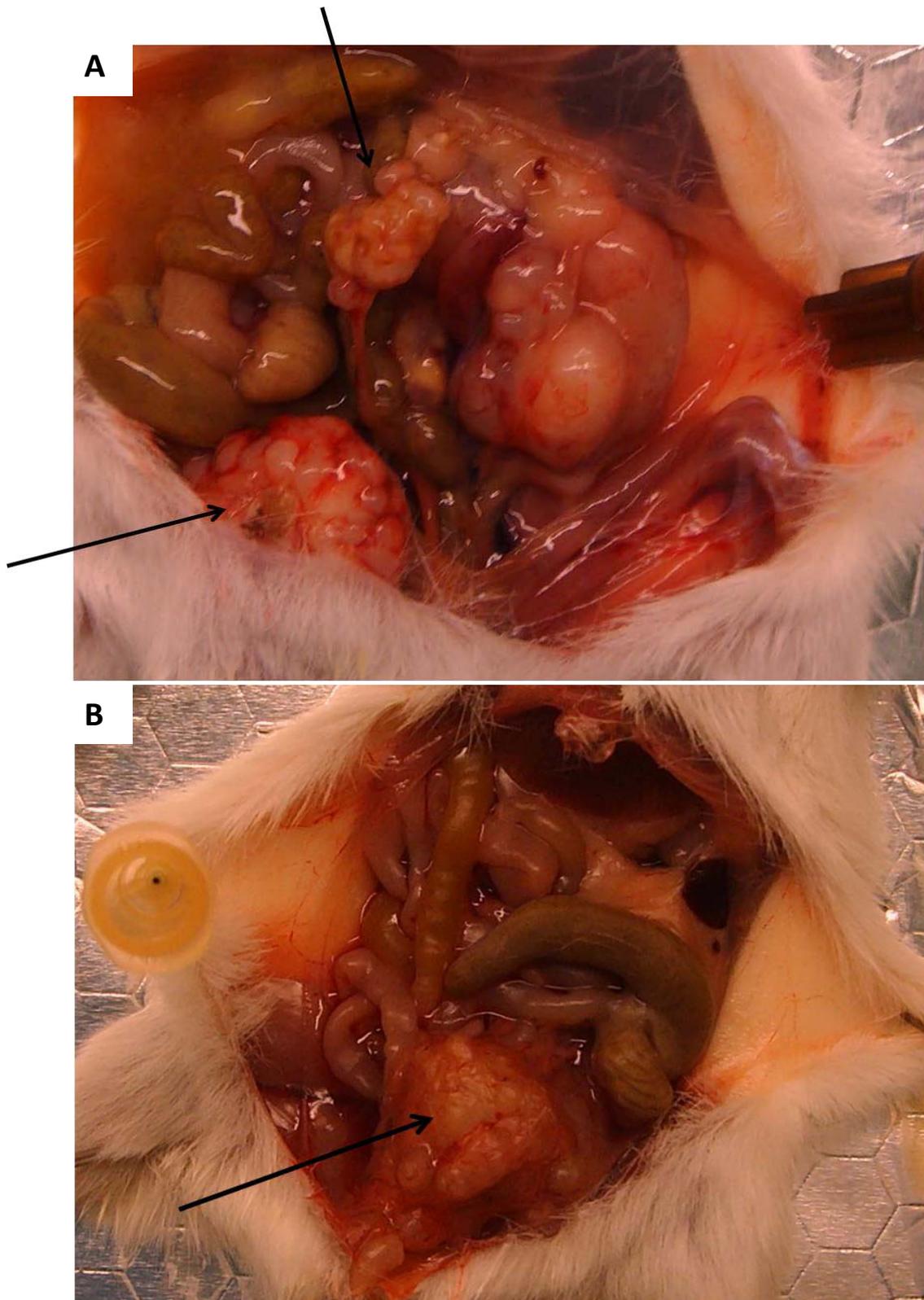


Abb.15 SCID Mäuse mit intraperitonealer Tumormasse.

A: Maus der Gruppe Ad5wt die nach 65 Tagen verstorben ist mit deutlicher Tumormasse in der Bauchhöhle.

B: Maus der Gruppe Ad5/3MDR1E1 die nach 80 Tagen verstorben ist mit einem Tumor in der Bauchhöhle.

3.3 Quantitative Real- Time PCR

Mittels Real- Time PCR wurden Tumor-, Peritoneum- und Leberproben auf ihren Gehalt an E4-Kopien hin überprüft. Die Anzahl der E4-Kopien wurde auf die zelluläre DNA normalisiert und als E4 Kopienzahl pro ng DNA angegeben. Hierzu wurden in jeder Probe das virale E4-Gen und das zelluläre β -Actin-Gen detektiert und anhand absoluter Standardkurven quantifiziert.

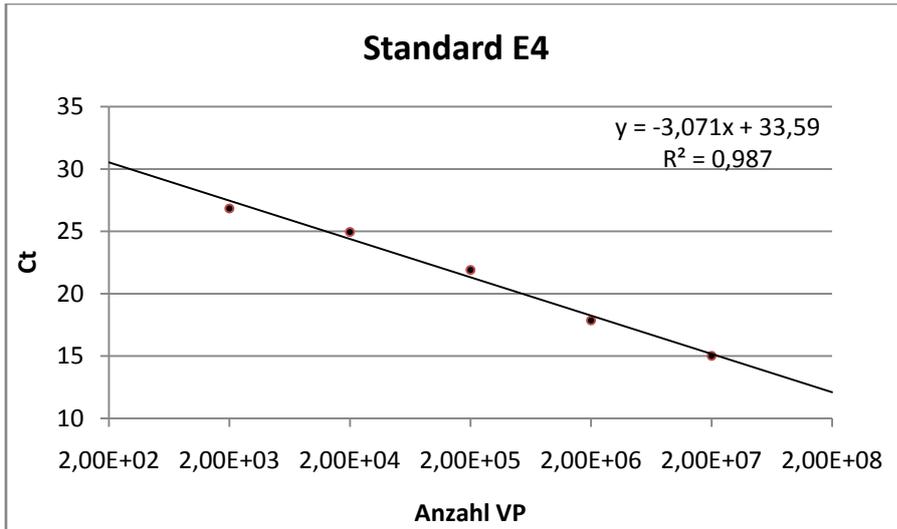
Für die jeweiligen Standardkurven wurden entsprechende serielle Verdünnungen einer Plasmid- DNA (pTG3602), humaner SKOV- Zellen sowie genomischer Maus-DNA hergestellt und eingesetzt.

Als Qualitätskontrolle, um eine Aussage über die Reinheit der gebildeten PCR- Produkte treffen zu können wurde abschließend nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Standardkurven der 3 Zielgene sowie exemplarisch eine Schmelzkurve sind in den Abbildungen 16-19 dargestellt.

Die Ergebnisse werden im Anschluss gewebespezifisch präsentiert.

A



B

Anzahl VP	Ct-Wert 1. Messung	Ct- Wert 2. Messung	Mittelwert Ct	SD	SDin%
2,00E+03	26,52	27,13	26,83	0,43	1,6
2,00E+04	25,14	24,75	24,95	0,28	1,1
2,00E+05	21,83	21,96	21,9	0,09	0,4
2,00E+06	17,61	18,11	17,86	0,35	2
2,00E+07	14,97	15,07	15,02	0,07	0,5
2,00E+08	nd	nd	nd	nd	nd

C

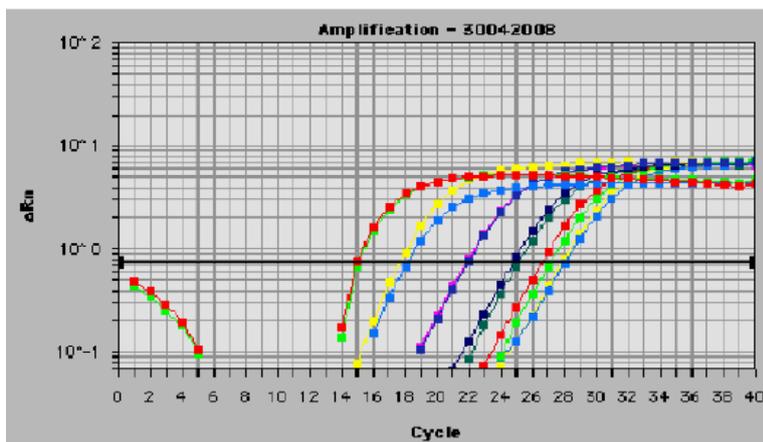


Abb.16: Standardkurve zur absoluten Quantifizierung adenoviraler DNA (E4-Gen).

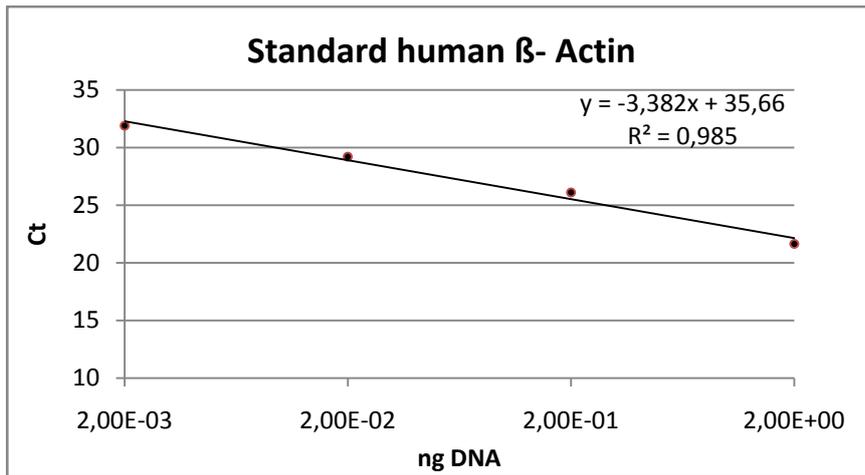
Hochreines Plasmid pTG3602 bekannter Konzentration, das eine Kopie des adenoviralen E4-Gens trägt, wurde 5fach seriell verdünnt. 2×10^3 bis 2×10^8 Kopien pro Reaktionsvolumen wurden in zweifacher Ausführung in die Real-Time PCR eingesetzt und eine Sequenz des viralen E4-Gens detektiert.

A: Standardkurve (Ct-Mittelwerte gegen Kopienzahl +/- Standardabweichung). Der Korrelationskoeffizient war 0,987. Die Steigung hatte einen Wert von $-3,07$, was einer theoretischen Amplifizierungseffizienz von 112 % entspricht.

B: Einzelwerte beider Messungen mit Standardabweichungen in Prozent.

C: Amplifizierungsplot beider Messungen (Signalstärke ΔR_n gegen Zyklenzahl).

A



B

Input ng DNA	Ct- Wert 1.Messung	Ct- Wert 2. Messung	Ct Mittelwert	SD	SD in %
2,00E-03	31,57	32,2	31,89	0,45	1,4
2,00E-02	29,37	29,02	29,2	0,25	0,9
2,00E-01	26,2	25,99	26,1	0,15	0,6
2,00E+00	21,48	21,81	21,65	0,23	1,1

C

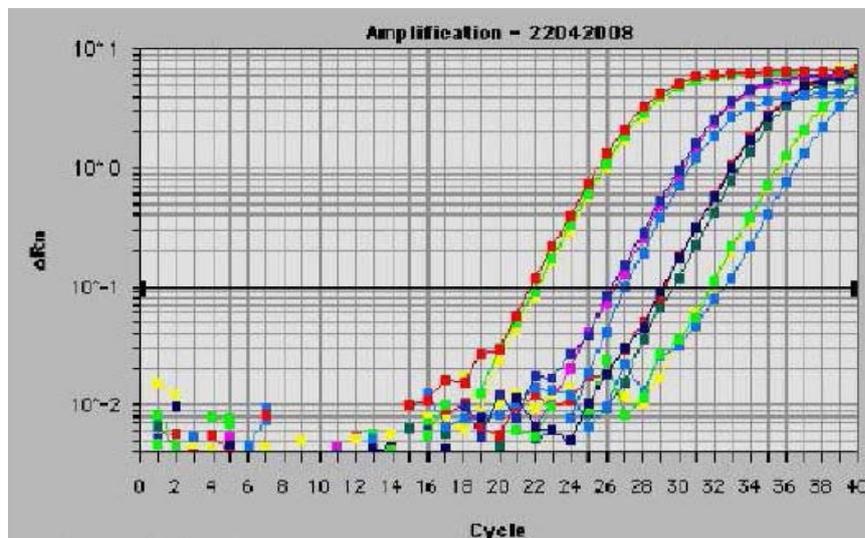
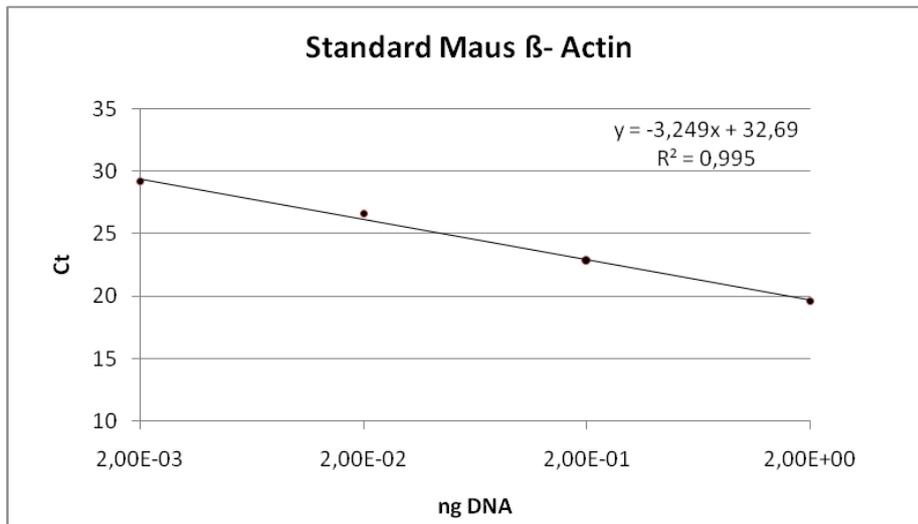


Abb.17: Standardkurve zur absoluten Quantifizierung zellulärer DNA (β -Aktin-Gen) in humanem Gewebe. Mittels 3fach Verdünnung humaner DNA bekannter Konzentration wurde eine Sequenz des humanen β - Actin- Gens detektiert. Dabei wurden 0,002-2 ng DNA pro Reaktionsvolumen in zweifacher Ausführung in die Real-Time PCR eingesetzt.

A: Standardkurve (Ct-Mittelwerte gegen eingesetzter DNA +/- Standardabweichung). Der Korrelationskoeffizient war 0,985. Die Steigung hatte einen Wert von $-3,38$, was einer theoretischen Amplifizierungseffizienz von 98% entspricht.

B: Einzelwerte beider Messungen mit Standardabweichungen in Prozent

C: Amplifizierungsplot beider Messungen (Signalstärke ΔRn gegen Zyklenzahl).

A**B**

Input ng DNA	Ct- Wert 1.Messung	Ct- Wert 2. Messung	Ct Mittelwert	SD	SD in %
2,00E-03	29,23	29,19	29,21	0,03	0,1
2,00E-02	27,76	25,48	26,62	1,61	6
2,00E-01	22,85	22,77	22,81	0,06	0,3
2,00E+00	19,33	19,96	19,645	0,45	2,3

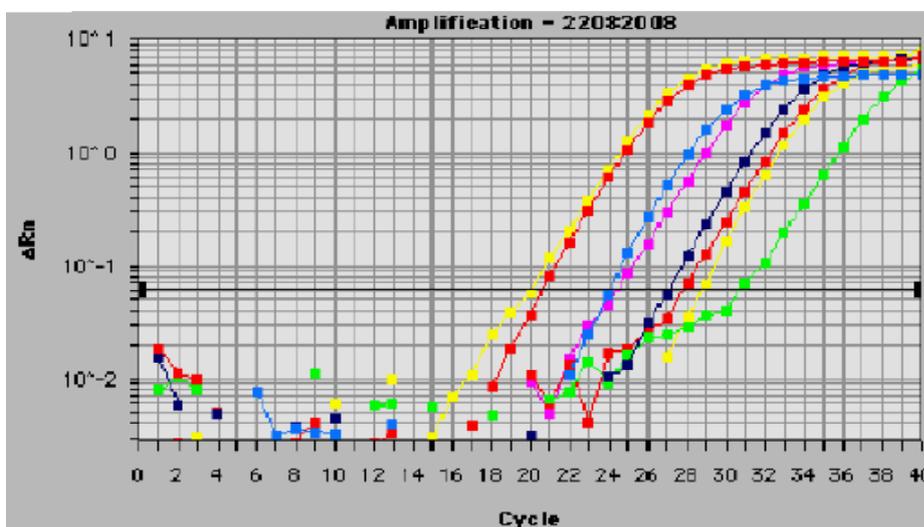
C

Abb.18: Standardkurve zur absoluten Quantifizierung zellulärer DNA (β -Aktin-Gen) in Mausgewebe.

Mittels 4fach Verdünnung muriner DNA bekannter Konzentration wurde eine Sequenz des Maus β - Aktin- Gens detektiert. Dabei wurden 0,002-2 ng Maus DNA pro Reaktionsvolumen in zweifacher Ausführung in die Real-Time PCR eingesetzt.

A: Standardkurve (Ct-Mittelwerte gegen eingesetzter DNA +/- Standardabweichung). Der Korrelationskoeffizient war 0,995. Die Steigung hatte einen Wert von $-3,25$, was einer theoretischen Amplifizierungseffizienz von 103% entspricht.

B: Einzelwerte beider Messungen mit Standardabweichungen in Prozent

C: Amplifizierungsplot beider Messungen (Signalstärke ΔRn gegen Zyklenzahl).

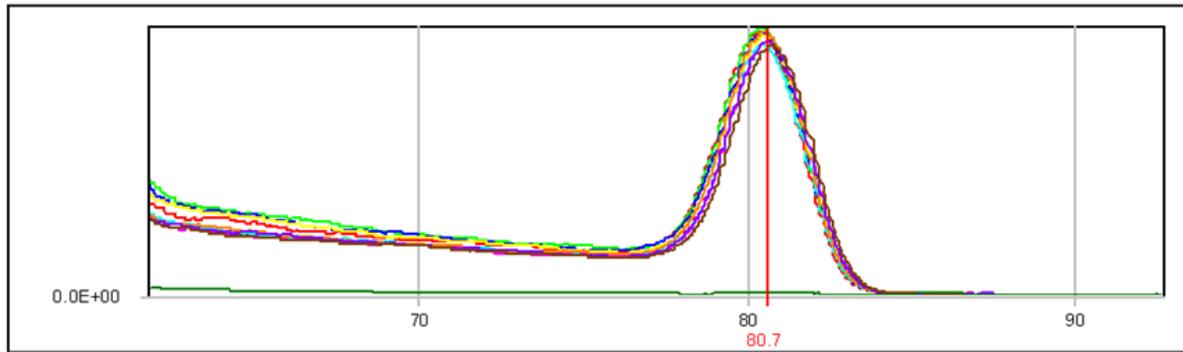


Abb.:19 Schmelzkurve. Exemplarische Schmelzkurvendarstellung. Erkennbar ist ein einziges Temperaturmaximum bei ca 80,7°C. Die Non-Template Kontrollen bilden keine Kurve.

3.4 Untersuchung der Anti- Tumor Effektivität der CRAd's

Um mögliche Korrelationen zwischen dem Überlebensvorteil und einer vermehrten Replikation der untersuchten CRAd's im Zielgewebe zu überprüfen erfolgte die Quantifizierung des adenoviralen E4- Gens in Tumorgewebe und der immunhistochemische Nachweis des viralen E1A Proteins im Tumor. Die unabdingbare Voraussetzung für eine effiziente onkolytische Virotherapie, nämlich eine ausreichend hohe Aktivität des steuernden tumorspezifischen Promotors (TSP) wurde in Vorversuchen untersucht. Mittels Reporterassays wurde die Aktivität des MDR1- Promotors quantifiziert, wobei sich eine starke Aktivität in chemoresistenten Tumorzellen und eine leicht erhöhte Aktivität in unbehandelten Tumorzellen im Vergleich zu Normalgewebiszellen zeigte.

3.4.1 Quantitative Bestimmung des E4 Gens im Tumor der Maus

Nach Aufbereitung der Tumorproben wurde die Virusreplikation durch Quantifizierung des adenoviralen E4 Gens direkt erfasst. Eine indirekte Normierung auf die Zellzahl erfolgte mittels paralleler Quantifizierung des humanen β -Actin-Gens. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 20 dargestellt. Die stärkste Viruskonzentration zeigte Ad5/3 Δ 24 mit 17.800.000 VP/ng DNA. Unter den beiden MDR1- Promotor gesteuerten CRAds wies Ad5/3MDR1E1 mit 7.540.000 VP/ng DNA eine ca. 3fach stärkere Viruskonzentration auf als das E1A- deletierte Ad5/3MDR1E1 Δ 24 mit 2.360.000 VP/ng DNA. Die Replikationseffizienzen von Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24 in Tumorgewebe liegen somit in einer vergleichbaren Größenordnung jedoch unter der von Ad5/3 Δ 24. Aus der mit Ad5wt therapierten Gruppe konnte kein Tumor isoliert werden und somit keine

Replikation gemessen werden. (Vermutlich ist dies auf die kurze Lebensdauer der Mäuse zurückzuführen, die bedingte, das bis zum Sektionszeitpunkt keine makroskopisch sichtbare Tumormasse anwachsen konnte.)

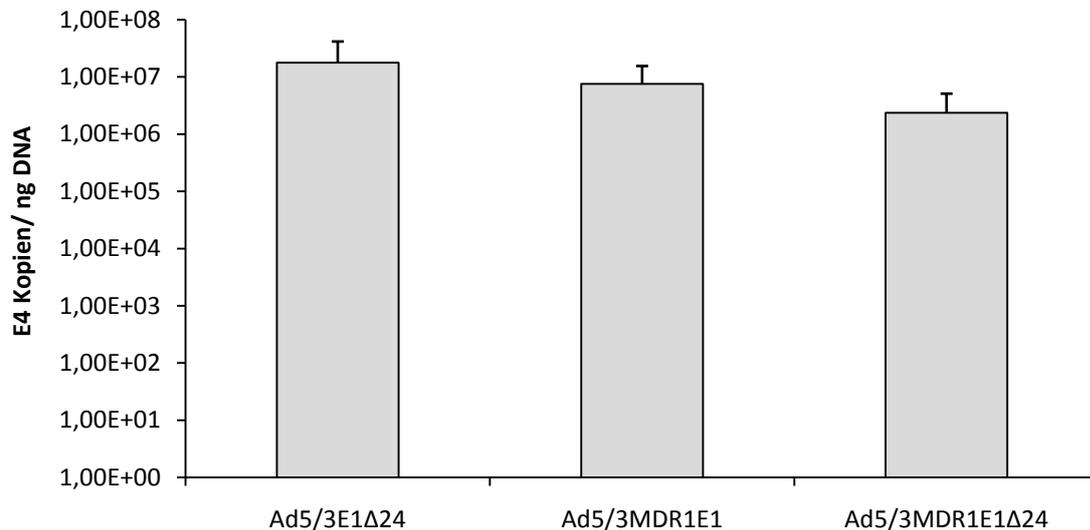
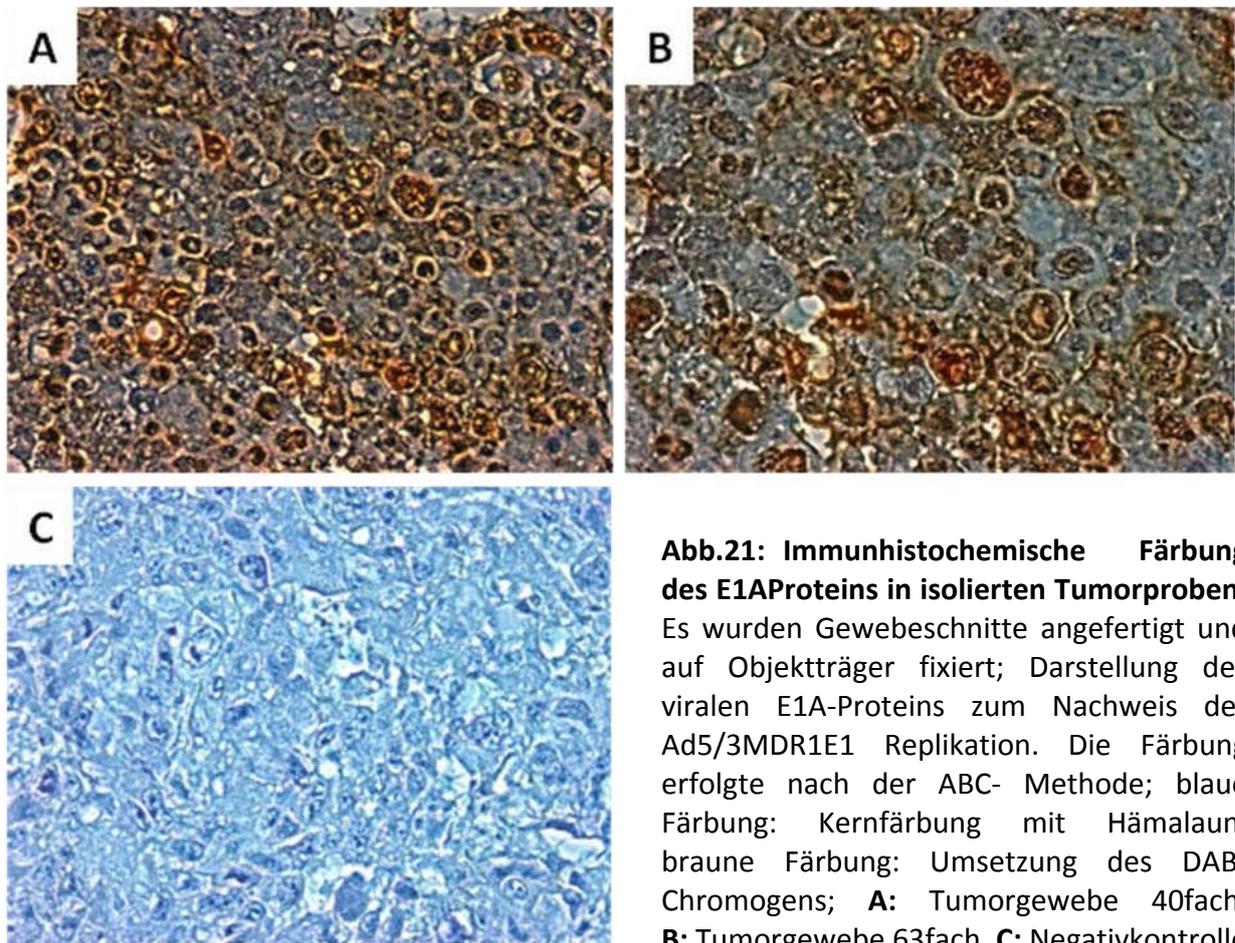


Abb.20: Quantitative Bestimmung des viralen E4 Gens in Tumor der Maus mittels PCR. Nach i.p. Applikation von SKOV3.ip- Tumorzellen sowie Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, oder Ad5/3MDR1E1Δ24. Das Ergebnis ist angegeben als E4 Kopienzahl bezogen auf die Menge zellulärer genomischer DNA. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der untersuchten Virusgruppen + Standardabweichung.

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis des E1A Proteins im Tumor

Um eine tumorspezifische Replikation der rekombinanten CRAd's nachzuweisen, wurden Gewebeschnitte aus den isolierten Tumorproben angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Es erfolgte die immunhistochemische Darstellung des viralen E1A-Proteins. Die viralen Proteine sind überwiegend nukleär lokalisiert, sodass eine braune Anfärbung des Kerns als positiv gewertet wurde, eine blaue Kernfärbung wurde als negativ gewertet. Je mehr Zellkerne dunkel gefärbt waren, desto mehr Viruspartikel waren in den Zellen vorhanden und folglich kann auf eine stärker stattgefundenen virale Replikation zurückgeschlossen werden. Sowohl Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1 als auch Ad5/3MDR1E1Δ24 zeigten deutliche Kernfärbungen im Tumorgewebe. Mäuse die keine Virusapplikation erhalten hatten, zeigten keine Kernfärbung. Aufgrund der geringen Probenanzahl fand keine statistische Auswertung für die einzelnen Virusgruppen statt.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Immunhistochemie zum Nachweis des viralen E1A-Proteins für Ad5/3MDR1E1 exemplarisch dargestellt. Die effiziente Replikation im Tumor ist durch die intensive E1A-Färbung im Zellkern erkennbar. Es zeigt sich eine deutliche Kernfärbung der Tumorzellen im Vergleich zur Negativkontrolle.



3.5 Untersuchung der CRAd- Spezifität und Toxizität

Die klinische Anwendung rekombinanter adenoviraler Vektoren wird vor allem durch den natürlichen Lebertropismus der Adenoviren erschwert. Die Charakterisierung der Lebertoxizität ist problematisch, da humane CRAd's in der Maus nur unzureichend replizieren. Dennoch wurde versucht mittels quantitativer Bestimmung der viralen E4-Kopienzahl und histopathologischer Untersuchungen der Mauslebern die Replikationsspezifität der untersuchten CRAd's im durchgeführten Mausmodell zu charakterisieren. Zusätzlich wurde die virale E4- Kopienzahl in Peritonealgewebeproben mittels PCR untersucht.

3.5.1 Untersuchung der Lebertoxizität

In der Maus stellt die Leber das wichtigste Abbauorgan für Adenoviren dar, und ist aus diesem Grund von großer Bedeutung im Hinblick auf potentielle klinische Nebenwirkungen einer systemischen Virusapplikation.

3.5.1.1 Quantitative Bestimmung des E4 Gens in der Leber der Maus

Nach Aufbereitung der Leberproben erfolgte die absolute Quantifizierung des adenoviralen E4- Gens in der isolierten DNA. Eine indirekte Normierung auf die Zellzahl wurde mittels paralleler Quantifizierung des zellulären β -Actin- Gens der Maus vorgenommen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 22 dargestellt. Nach Applikation von Ad5wt betrug die E4-Kopienzahl in der Leber mit 528.000 VP/ng DNA und lag signifikant höher als die von Ad5/3 Δ 24 ($P=0.05$), Ad5/3MDR1E1 ($P=0.025$) sowie Ad5/3MDR1E1 Δ 24 ($P=0.02$). Mit einer Kopienzahl von 45.000, 1840 beziehungsweise 2370 nach Applikation von Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDRE1 bzw. Ad5/3MDR1E1 Δ 24 zeigten die beiden MDR1-gesteuerten CRAd's einen 24- beziehungsweise 19-fach und damit signifikant ($P=0.025$ und $P=0.02$) geringeren Virusgehalt in der Leber der Maus als das isogenetische Kontrollvirus. Die Applikation von Ad5MDR1luc führte zu einer E4 Kopienzahl von 15.800.

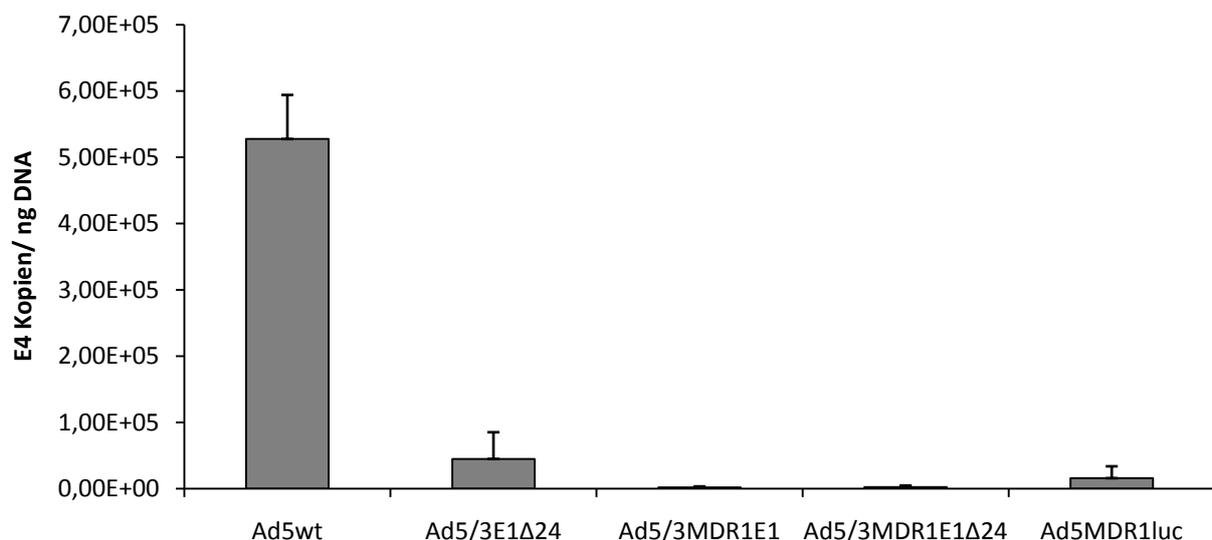


Abb.22: Quantitative Bestimmung des viralen E4 Gens in der Leber der Maus mittels PCR.

Nach i.p. Applikation von SKOV3.ip- Tumorzellen sowie Ad5wt, Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1 Δ 24 oder Ad5 MDR1luc. Das Ergebnis ist angegeben als E4 Kopienzahl bezogen auf die Menge zellulärer genomischer DNA. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der untersuchten Virusgruppen + Standardabweichung.

3.5.1.2 Histopathologische Untersuchung der Lebertoxizität im Mausmodell

Gewebeschnitte der isolierten Mauslebern wurden mittels Hämosin und Emalaun gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung zeigte sich nach intraperitonealer Applikation von Ad5/3MDR1 sowie Ad5/3MDR1Δ24 ein unauffälliges Bild ohne Hinweise auf toxische Effekte. In der Gruppe der mit Ad5/3Δ24 therapierten Mäuse wurden portal sowie lobulär lymphozytäre Infiltrate beobachtet die auf eine chronische Entzündungsreaktion des Leberparenchyms hindeuten. Zudem fanden sich Zeichen der Cholestase. Hingegen wurde bei den Mäusen, die mit Ad5wt behandelt wurden eine ausgeprägte Lebertoxizität mit massiven hepatischen Nekrosen, einer akuten Entzündungsreaktion und Zeichen einer Hämorrhagie beobachtet. Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Kontrollgruppe ohne Virustherapie zeigte erwartungsgemäß keine morphologischen Veränderungen der Leber.

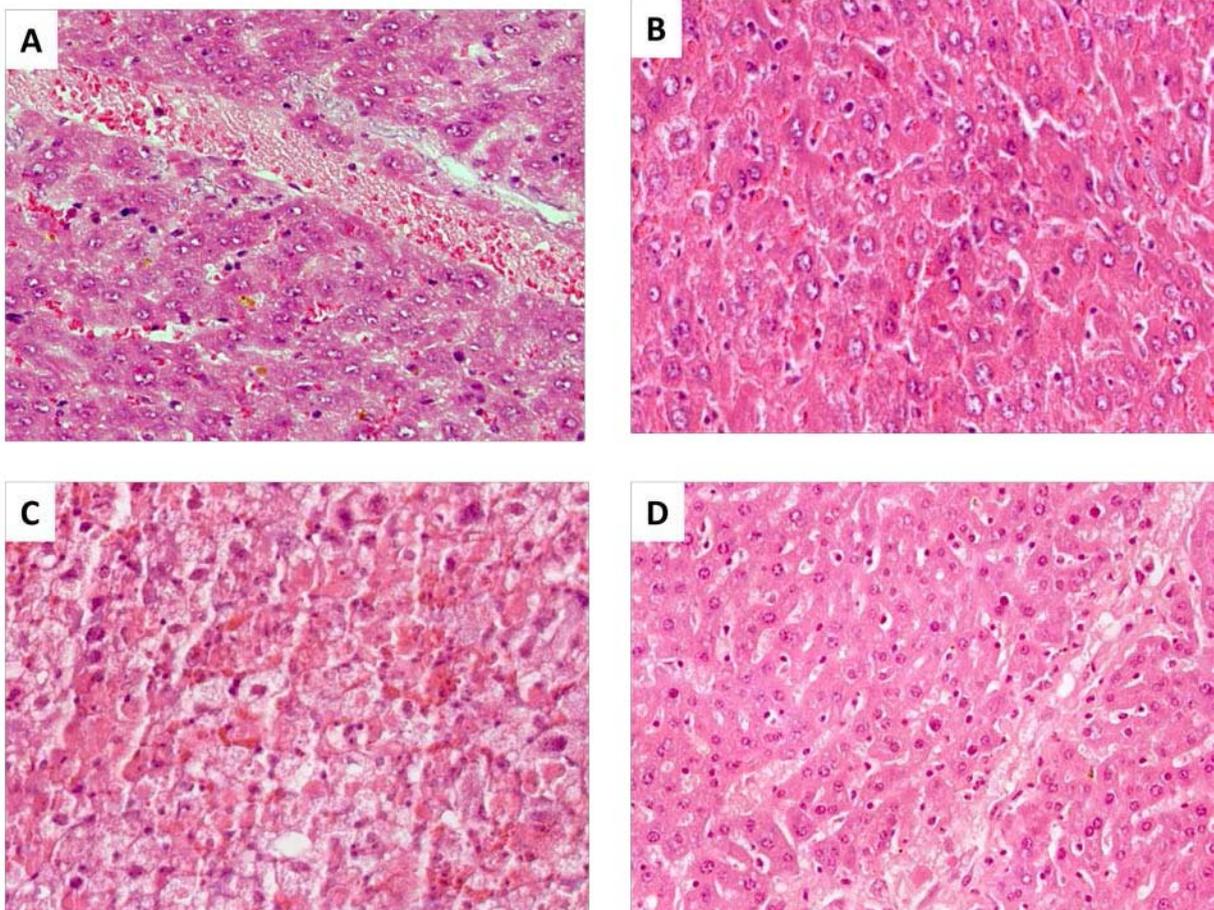


Abb.23: Morphologische Untersuchung der Lebertoxizität in der Maus

Untersuchung der isolierten Mauslebern nach i.p. Applikation von 5×10^8 VP Ad5/3MDR1, Ad5/3Δ24, Ad5wt sowie kein Virus. Die histopathologische Untersuchung erfolgte an Gewebeschnitten der Lebern nach H&E Färbung.

A: Ad5/3Δ24; B: Ad5/3MDR1; C: Ad5wt; D: Kontrollgruppe ohne Virus

3.5.1.3 Bestimmung der Tumor/Leber Ratio

Um potentielle Nebenwirkungen einer intraperitonealen Therapie besser abschätzen und die Spezifität der Therapie besser beurteilen zu können wurde im nächsten Schritt die Tumor/Leber Ratio für die verschiedenen Adenoviren errechnet. Dabei wird der Virusgehalt im Tumor in Verhältnis zu dem Virusgehalt in der Leber gesetzt. Hierzu wird die Kopienzahl des E4 Gens im Tumor, normiert auf die Zellzahl, durch die Kopienzahl des E4 Gens in der Leber, ebenfalls normiert auf die Zellzahl, dividiert. Die Tumor/Leber Ratios sind in Abbildung 24 dargestellt. Für Ad5/3MDR1E1 resultiert eine Ratio von 3689. Das zweite CRAd Ad5/3MDR1E1 Δ 24 zeigt eine 1400fach höhere E4- Kopienzahl im Tumor im Vergleich zur Leber. Auch Ad5/3 Δ 24 erzielte eine 122fach höhere E4- Kopienzahl im Tumor im Vergleich zur Leber. Beide MDR1 gesteuerten CRAd`s zeigten signifikant höhere Ratios als das isogenetische Kontrollvirus Ad5/3 Δ 24 ($p=0,024$ für Ad5/3MDR1E1 und $p=0,02$ für Ad5/3MDR1E1 Δ 24). Ad5/3MDR1E1 wies nach Infektion die höchste Tumor/Leber Ratio der untersuchten Vektoren auf (30fach zu Ad5/3 Δ 24). (Diese ist auch signifikant höher als die Ratio von Ad5/3MDR1E1 Δ 24).

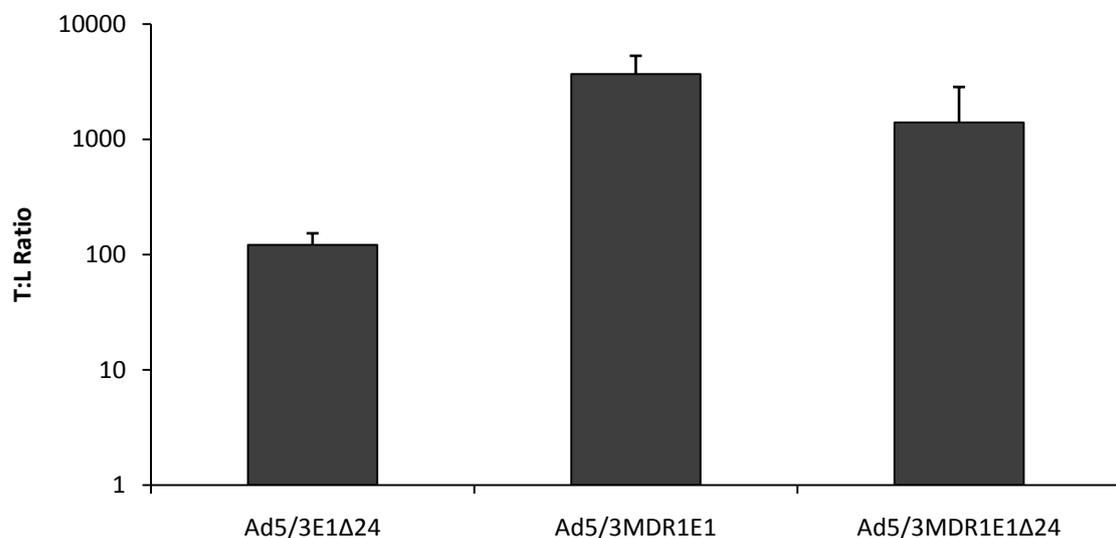


Abb.24: Tumor/Leber- Ratio. Nach i.p. Applikation von SKOV3.ip- Tumorzellen sowie Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDR1E1 oder Ad5/3MDR1E1 Δ 24. Die E4 Kopienzahl im Tumor wurde zu der E4 Kopienzahl in der Leber in Verhältnis gesetzt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der gebildeten Ratios + Standardabweichung dar.

Es lässt sich festhalten, dass alle konditional replizierenden Viren einen tumorselektiven Tropismus aufweisen, wobei nach Applikation der MDR1- Promotor gesteuerten CRAd's eine noch höhere Spezifität erzielt werden konnte.

3.5.2 Untersuchung des Peritoneums

Zur genaueren Charakterisierung der Spezifität der verschiedenen CRADs wurde der Virusgehalt im Peritoneum untersucht.

3.5.2.1 Quantitative Bestimmung des E4 Gens im Peritoneum der Maus

Nach Aufbereitung der Peritoneal- Biopsate erfolgte die absolute Quantifizierung des adenoviralen E4-Gens in der isolierten DNA. Eine indirekte Normierung auf die Zellzahl wurde mittels paralleler Quantifizierung des zellulären Haushaltsgens Maus β -Actin vorgenommen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Applikation von Ad5wt führte zu der höchsten E4- Kopienzahl im Peritoneum mit 92.600 VP/ng DNA. Die drei CRAd's zeigen mit Werten von 4280 VP/ng, 9580 VP/ng und 1850 VP/ng (für Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24) einen deutlich niedrigeren Virusgehalt im Peritoneum. Signifikant erniedrigt ist der Wert von Ad5/3MDRE1 zu Ad5wt ($p=0.05$).

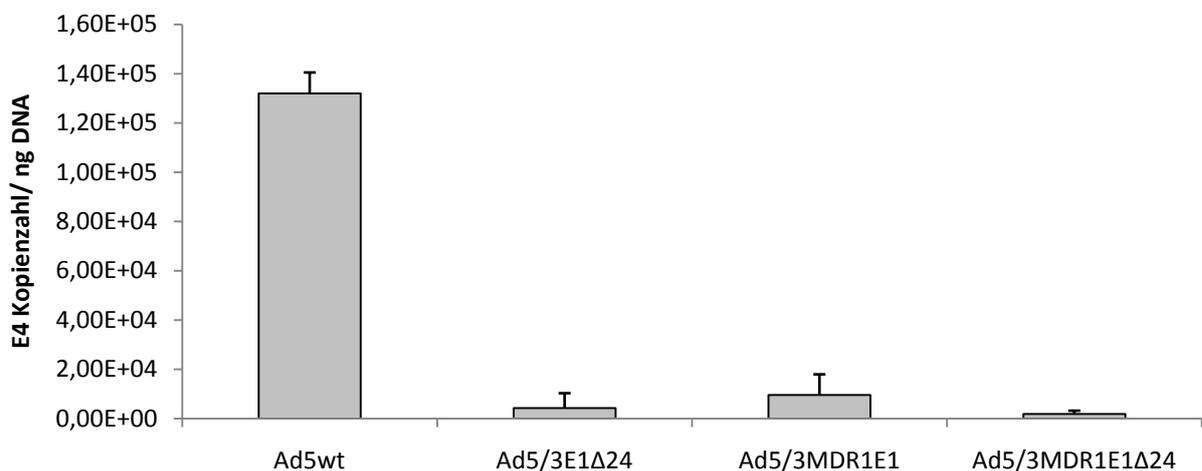


Abb.25: Quantitative Bestimmung des viralen E4 Gens im Peritoneum der Maus mittels PCR. Nach i.p. Applikation von SKOV3.ip- Tumorzellen sowie Ad5wt, Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDR1E1 oder Ad5/3MDR1E1 Δ 24. Das Ergebnis ist angegeben als E4 Kopienzahl bezogen auf die Menge zellulärer genomischer DNA. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der untersuchten Virusgruppen + Standardabweichung.

4. Diskussion

4.1 Ovarialkarzinom - Problem der Resistenzbildung unter Zytostatikatherapie

Das fortgeschrittene und rezidierte Ovarialkarzinom geht trotz moderner Therapiekonzepte immer noch mit einer schlechten Prognose einher. Bei der Behandlung maligner Ovarialkarzinome folgt in der Primärtherapie nach der radikalen chirurgischen Tumorreduktion eine platinhaltige Kombinationschemotherapie mit Taxanen. Trotz der initial hohen Chemosensitivität des Ovarialkarzinoms entwickeln sich häufig Mehrfachresistenzen, sodass bei rund 2/3 der Patientinnen ein Rezidiv auftritt. Verschiedenste Untersuchungen konnten zeigen, dass die Entwicklung dieser Multidrugresistenzen auf die Expression des MDR1-kodierten P-Glykoproteins zurückgeht, das als Membrantransporter Zytostatika effizient aus der Zelle befördert. Bereits 1994 wurde für das Ovarialkarzinom eine basale MDR1- Expression beschrieben (Arao et al.1994). In neuster Zeit wurde zudem die Induzierbarkeit des MDR1- Gens durch bestimmte Chemotherapeutika, darunter Cisplatin, Doxorubicin und Paclitaxel in Ovarialkarzinomzellen gezeigt (Hille et al.2006, Dong et al. 2009, Martirosyan et al. 2010).

Eine MDR- regulierte Virotherapie stellt somit einem vielversprechenden, neuen Therapieansatz für die zielgerichtete Behandlung maligner Ovarialtumore dar, in dem die nachteilige Eigenschaft der MDR-vermittelten Chemoresistenz als Therapietarget für die Virotherapie genutzt werden soll.

4.2 Gentherapieansätze

Die Krebsgentherapie stellt eine Form einer zielgerichteten „targeted therapy“ dar. Zielgerichtete Therapieansätze haben als neue Therapieoption bei Tumorleiden zunehmend an Bedeutung gewonnen. Gentherapeutische Therapieansätze machen sich die molekularen Unterschiede zwischen normalen und malignen Zellen zunutze. Neben dem Konzept der „Mutationskompensation“ liefern die „Suizidgentherapie“ sowie das Prinzip der „Immunpotenzierung“ verschiedene Ansatzpunkte zur molekularen Intervention verschiedener Tumorerkrankungen.

Einen neuartigen, gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung des Ovarialkarzinoms stellen konditional replizierende Adenoviren (CRAd's) dar. Sie repräsentieren hochpotente anti-

tumorale Agenzien die sich in Abhängigkeit tumorspezifischer Charakteristika selektiv replizieren und somit zur Onkolyse führen. CRAd's konnten in den letzten Jahren in klinischen Studien bereits gute Erfolge hinsichtlich Therapieeffizienz und klinischer Sicherheit erzielen (Ries et al. 2004, Garber et al. 2006, Cody et al. 2009).

Das erste und wohl bekannteste CRAd war ONYX-015 welches in vielen Tumorentitäten getestet wurde (Bischoff et al. 1996, Ries et al. 2004). Ursprünglich wurde postuliert, dass die E1B-55kD-Defizienz eine selektive Replikation des Virus in Tumorzellen mit p53- Defekt zur Folge hat. Spätere Ergebnisse widerlegten diesen Wirkmechanismus (O'Shea et al. 2004). Beeindruckende Erfolge in Phase II Studien bei Patienten mit Kopf- Hals- Tumoren führten zu einer Vielzahl weiterer klinischer Studien mit ONYX-015 darunter auch bei rezidivierendem Ovarialkarzinom (Vasey et al. 2002). Nach zahlreichen klinischen Studien in denen eine sehr gute Sicherheit des Virus bestätigt wurde (Kirn et al. 2001,), scheint jedoch die antitumorale Effizienz von ONYX-015 limitiert zu sein, sodass man immer noch auf der Suche nach potenteren CRAd's ist.

4.2.1 Genetische Retargetingstrategien beim Ovarialkarzinom

Da eine hohe Infektionsrate der Zielzellen die bedeutendste Determinante für die onkolytische Potenz der Adenoviren darstellt, wird mittels Retargetingstrategien versucht die Transduktionsraten zu optimieren.

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu dem Rezeptor des Adenovirus vom Serotyp 5 „CAR“, der Rezeptor vom Adenovirus Serotyp3 auf Ovarialzellen überexprimiert wird (Zhu et al. 2008). Dies macht man sich bei der Anwendung einer Fiberchimäre zunutze, in der eine Substitution der adenoviralen Bindungsregion „fiber knob“ des Ad5-Serotypen mit dem Knob des Ad3-Serotypen erfolgt. Ad5/3 Fiberchimäre erlauben dem Virus einen CAR-unabhängigen Zelleintritt über den Ad3 Rezeptor (Raki et al. 2008, Kanerva et al. 2002a). Diese Modifizierung vermag auch die reduzierte Infektiosität von Ad5-Serotypen in malignem Aszites, durch vorbestehende Anti-Ad5-neutralisierende Antikörper zu umgehen (Sakurai et al.2007, Raki et al. 2008, Wang et al. 2010). In zahlreichen Untersuchungen konnten Ad5/3 Fiberchimäre gesteigerte Infektionsraten in Ovarialkarzinomzellen zeigen, ohne die Lebertoxizität zu erhöhen (Kanerva et al. 2002a, Kanerva et al. 2003, Breidenbach et al. 2004, Lam et al. 2004). In einer kürzlich erschienen Publikation konnte bei einem Vergleich zwischen den verschiedenen Fibermodifikationen, RGD, F5/3, pk7 und RGDpk7, in

vier Ovarialkarzinomzelllinien eine deutliche Überlegenheit der Transduktionseffizienz von F5/3 demonstriert werden (Zhu et al. 2008).

Ein weiterer Ansatzpunkt um die virale Replikation auf das Zielgewebe zu beschränken ist die Modifizierung des viralen E1A. Die Insertion der 24bp Deletion ($\Delta 24$) in das adenovirale E1A-Gen soll in einer potentiellen klinischen Anwendung die Replikation von Ad5/3 $\Delta 24$ und Ad5/3MDR1 $\Delta 24$ in ruhenden Normalgewebiszellen vermeiden, und auf Zellen in denen der pRb- Pathway defekt ist beschränken (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000).

Die transkriptionelle Regulation der adenoviralen Replikation mittels Promotoren stellt einen weiteren Mechanismus zur Steuerung der Virusvermehrung dar. Nachdem für das Ovarialkarzinom bereits einige Promotoren darunter Cox2, VEGF, SLPI und CXCR4 (Zhu et al. 2008) erfolgreich getestet werden konnten, wurde in dieser Arbeit der Chemo-induzierbare MDR1- Promoter *in vivo* untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Adenoviren weisen alle der beschriebenen gentechnische Modifikationen auf: 1. Die 5/3-Fiberchimerisierung 2. Der induzierbare MDR1- Promotor 3. Die $\Delta 24$ -E1A Deletion

4.2.2 Synergismus Chemotherapie- Genterapie

Die Kombination einer onkolytischen Virotherapie mit einer Chemotherapie, im Sinne einer multimodalen Krebstherapie, wurde bereits in zahlreiche präklinische Studien erfolgreich durchgeführt. (Yoon et al. 2006, Oberg et al. 2010, Dias et al. 2010). Zudem wurde die Sicherheit einer solchen Kombinationstherapie demonstriert (Xia et al. 2004, Yu et al. 2007).

Ein Vorteil scheint zu sein, dass keine Kreuz- Resistenzen zwischen Viro- und Chemotherapie bestehen. Ein weiterer vielversprechender Aspekt ist eine mögliche Dosisreduktion des Chemotherapeutikums bei gleichbleibender Effektivität. Der genaue Mechanismus der synergistischen Aktivität ist nicht geklärt, es gibt jedoch verschiedene Ansätze, von denen 4 im Folgenden genannt werden sollen. Eine Hypothese ist die Zunahme der zellulären Sensibilität gegenüber Zytostatikabehandlung durch das adenovirale E1A- Protein (Ueno et al. 2000, Lee et al. 2003) (siehe auch 4.5). Eine weitere Möglichkeit ist eine gesteigerte Virustransduktion durch den Einfluss des Zytostatikums auf den Zellzyklus (Yu et al. 2001). Beispielsweise inhibiert Paclitaxel die Progression mitotischer Zellen von der M-Phase in die G1-Phase, wodurch eine Verbesserung der adenoviralen Zellbindung und Gentransfereffizienz erzielt wurde (Jordan et al. 1996). Eine andere Erklärung wäre die

Veränderung des Rezeptorstatus der Zellen durch das Chemotherapeutikum (Raki et al. 2005). Zudem ist es vorstellbar, dass beide Therapeutika unabhängig voneinander an unterschiedlichen Zielzellen wirken und somit einen synergistischen Effekt erzielen (Raki et al. 2008).

Auch beim Ovarialkarzinom wurden bereits Kombinationstherapien aus Chemo- plus Gentherapie untersucht. So konnte in einer aktuellen Arbeit von Raki et al. nach einer Kombinationstherapie von Epirubicin und Ad5/3Δ24 oder Gemcitabin und Ad5/3Δ24 eine signifikante Steigerung des Überlebens im Vergleich zu den Einzeltherapien erzielt werden (Raki et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine MDR1-gesteuerte CRAD- Gentherapie untersucht. Bei diesem Konzept werden, anders als bei bislang beschriebenen Ansätzen, nicht nur synergistische Effekte zwischen Chemo- und Gentherapie ausgenutzt. Vielmehr gelingt es durch die Wahl des MDR Promotors zur Steuerung der CRAD`s selektiv zytostatikaresistente Tumorzellen, die dem onkolytischen Effekt der Zytostatikatherapie entgehen, abzutöten.

4.3 Tiermodelle - Möglichkeiten und Grenzen

Nach vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit und Spezifität zweier MDR1- CRAd`s Varianten *in vivo* untersucht. Um die klinische Effizienz von MDR1- CRAd`s zu evaluieren wurde ein orthotopes Ovarialkarzinom-Mausmodell mit Peritonealkarzinose etabliert.

Xenotransplantate von Tumorzellen in immundefizienten SCID- Mäuse werden regelmäßig zur Untersuchung antitumoraler Therapieansätze eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Simulation einer Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms ein intraperitoneales Tumormodell mit intraperitonealer Applikation des viralen Vektors angewandt, was sich schon in früheren Arbeiten als geeignet erwies (Rein et al. 2005, Raki et al. 2008).

Obwohl das Xenotransplant- Mausmodell ein etabliertes Tiermodell zur Testung neuer Therapieansätze darstellt, ist die Übertragbarkeit der aus Tierversuchen gewonnenen Daten auf den Menschen bislang problematisch. Ein Grund hierfür ist die unterschiedliche Oberflächenexpression von Rezeptoren, die an der adenoviralen Bindung beteiligt sind, in Mensch und Maus (Bao et al. 2005). Beispielsweise erfolgt die Expression des Ad Gruppe B Rezeptors CD46 im Menschen ubiquitär auf nukleären Zellen, in der Maus jedoch nur in den

Testis (Ni et al.2005, Arnberg et al.2009). 2004 postulierte eine Arbeitsgruppe um Sirena et al., dass CD46 als Primärrezeptor für Adenovirus Serogruppe3 (Gruppe B zugehörig) dient (Sirena et al.2004). Somit wurde angenommen, dass man anhand der Ergebnisse aus Mausmodellen nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die toxischen Effekte von Ad3 pseudotypisierten CRAd's ziehen könne. Neuste Untersuchungen hingegen belegen dass CD46 zwar für eine Vielzahl von Gruppe B Adenoviren als Rezeptor fungiert, jedoch nicht für Adenovirus Serotyp 3 (Tuve et al.2008, Marttila et al.2005, Arnberg et al.2009). Neben der Beteiligung von CD46 verweisen Studien auf eine zentrale Rolle von CD80 und CD86 an der zellulären Ad3 Bindung (Short et al. 2006), was jedoch auch schon angezweifelt wurde (Hall et al.2009). CD80/CD86 sind kostimulatorische Moleküle, die auf reifen dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert werden und an der Stimulation der T-Lymphozyten-Aktivierung beteiligt sind (Lanier et al. 1995). Zudem gibt es Berichte in denen die Expression von CD80/86 auf einigen Tumorentitäten beschrieben wird (Howarth et al.2010). Bis heute wurde der Mechanismus der Primärrezeptorbindung des Ad3 nicht gänzlich geklärt.

4.4. Ergebnisse der MDR1-gesteuerten Gentherapie ohne Chemotherapie

4.4.1 Effektivität der Therapie im Mausmodell

Überlebensmodell

Ein orthotopes Ovarialkarzinom- Mausmodell stellt den letzten Schritt einer präklinischen Evaluation adenoviraler Vektoren dar.

Im durchgeführten Versuch wurden 120 Mäuse nach Implantation von SKOV3.ip Tumorzellen und Applikation der Virotherapie für 120 Tage beobachtet. Beobachtungsgröße des Tierversuchs war das Überleben nach Applikation der MDR1- CRAd's sowie verschiedener Kontrollviren. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte Ad5/3MDR1E1 sowie Ad5/3MDR1E1 Δ 24 eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate im Vergleich zu Ad5wt und dem nicht-replikativen Kontrollvirus Ad5MDR1luc. Als isogenetisches Kontrollvirus diente Ad5/3 Δ 24 eine 5/3Fiberchimäre mit Deletion im E1A Gen, die schon erfolgreich getestet wurde und aktuell in der Entwicklung für klinische Studien ist (Lam et al.2004, Raki et al. 2008). Nach Applikation der MDR1- CRAd's wurden vergleichbare Überlebensraten beobachtet wie in der Gruppe der mit Ad5/3 Δ 24 therapierten Mäuse. Mit einer Überlebensrate von 80% (Ad5/3MDR1E1 Δ 24) bzw. 70% (Ad5/3MDR1E1) am Versuchsende

(Tag 120) zeigten beide MDR1- CRAD's eine hohe antitumorale Effizienz. Unterschiede bezüglich der Überlebensrate zwischen beiden MDR1-CRAD's waren nicht statistisch signifikant.

Die in dieser Arbeit verwendete Dosis von 5×10^8 VP entspricht umgerechnet auf eine 60 kg schwere Frau 1×10^{12} VP. Nach Ergebnissen aus klinischen Studien sind bei dieser Dosierung keine Dosis- limitierenden Nebenwirkungen zu erwarten (Bauerschmitz et al. 2002a, Kanerva et al.2008).

Das frühe Versterben der Ad5wt therapierten Gruppe (medianes Überleben 18 Tage) ist möglicherweise auf die Lebertoxizität der vergleichsweise unspezifischen Adenoviren zurückzuführen. Die niedrige CAR-Expression im Tumorgewebe führt in dieser Gruppe zu einer ungenügenden Transfektion des Virus in die Tumorzellen und somit zu einer erhöhten systemischen Konzentration der Viren. Dieses Ergebnis korreliert sowohl mit dem histopathologischen Befund (s.u.) als auch mit anderen Arbeiten in denen eine vergleichbare Überlebenszeit nach Applikation von Ad5wt beschrieben wurde (Lam et al.2004, Kanerva et al. 2004b).

E4- Kopienzahl im Tumor

Die 5/3 Fibermodifikation der CRAD's sichert annähernd identische Transduktions-Raten und ermöglicht somit einen direkten Vergleich der viralen Replikation anhand der Viruskopienzahl.

Die Applikation von Ad5/3 Δ 24 ergab eine 10- bzw. 30- fach stärkere Replikation im Tumor als die Applikation der MDR1-Promotor gesteuerten CRAds Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24. Die niedrige basale MDR1-Expression in den Ovarialkarzinomzellen führte erwartungsgemäß zu einer geringeren onkolytischen Potenz der MDR1-CRAD's im Vergleich zu dem isogenetischen Kontrollvirus. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays der Viren. In früheren eigenen Voruntersuchungen wurde zwar eine basale MDR1- Promotoraktivität in SKOV3 Zellen gezeigt, diese scheint jedoch dem ubiquitären CMV- Promotor unterlegen zu sein, sodass der Einbau des MDR1- Promotors gegenüber dem Wildtyppromotor einen Replikationsnachteil darstellt. Das Ergebnis dieses *in vivo* Versuchs korreliert mit vorliegenden Daten aus Zytotoxizitätsassays in

denen die Replikationseffizienzen von Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24 in Tumorzellen miteinander vergleichbar waren, jedoch unter der von Ad5/3 Δ 24 lagen.

Ein Vergleich der beiden MDR1-gesteuerten CRAd's ließ keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer onkolytischen Potenz erkennen. Da die Δ 24-Deletion im wesentlichen einen Sicherheitsmechanismus in ruhenden Zellen darstellt, ist bezüglich der Replikationspotenz im Tumorgewebe kein Unterschied zu erwarten gewesen. Die leicht unterlegene Replikation des Δ 24-deletierten Virus deutet darauf hin, dass obwohl es sich um proliferierende Zellen handelt, eine Zellzyklus-gekoppelte Replikation einen Nachteil darstellt verglichen mit einer zellzyklusunabhängigen Replikation.

Aus der mit Ad5wt therapierten Gruppe konnte kein Tumor isoliert werden und somit keine virale Replikation gemessen werden. Dies wird auf die kurze Lebensdauer der Mäuse zurückgeführt, die bedingte, dass bis zum Sektionszeitpunkt keine makroskopisch sichtbare Tumormasse anwachsen konnte.

4.4.2 Spezifität und Toxizität der Therapie

Leber

Eine der größten Herausforderungen bei der systemischen Anwendung einer adenoviralen Gentherapie besteht in der potentiellen Toxizität für normales Gewebe. Die Leber stellt in Mensch und Maus das Hauptabbauorgan der Adenoviren dar. Nach Administration höherer Dosen Ad5-basierter Vektoren ist eine Virussequestration in der Leber zu beobachten, was vor allem die Effektivität einer systemischen antitumoralen Therapie einschränkt (Shashkova et al.2009). Zudem kommt es zu einer ausgeprägten, meist dosislimitierenden Hepatotoxizität (Xu et al.2008; Shashkova et al.2007).

Eine Arbeitsgruppe um Breidenbach et al. untersuchte 2004 in einem Mausmodell Unterschiede zwischen verschiedenen Applikationsweisen adenoviraler Vektoren und deren Einfluss auf den Virusgehalt in der Leber. Hierbei zeigte sich sowohl im subkutanen als auch im intraperitonealen Tumormodell, dass der Virusgehalt in der Leber nach intraperitonealer Applikation des Vektors signifikant niedriger war als nach intravenöser Vektorapplikation (Breidenbach et al.2004). Alle bisher veröffentlichten Ovarialkarzinom- Studien basieren auf einer intraperitonealen Virus-Administration (Breidenbach et al. 2004, Raki et al. 2008, Oberg et al. 2010).

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass die Untersuchung der Ad-vermittelten Lebertoxizität im Tierversuch problematisch ist, da das menschliche Adenovirus in der Maus nur eingeschränkt repliziert und somit eine direkte Analyse der adenoviralen Replikation und der damit verbundenen Toxizität nicht möglich ist (Hay et al.2003). Neuere Untersuchungen an Präzisionsschnitten menschlicher und muriner Lebern bestätigten zwar eine eingeschränkte Replikation in dem murinen Gewebe, die Ergebnisse zeigen jedoch eine Konkordanz der CRAd vermittelten Hepatotoxizität in beiden Geweben. Somit stellt die Untersuchung der Maus-Leber ein wichtiges präklinisches Werkzeug für die Beurteilung von adenoviral vermittelter Hepatotoxizität dar (Stoff-Kallili et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zur Abschätzung der Hepatotoxizität die Bewertung molekularer und histopathologischer Parameter der isolierten Mauslebern nach Applikation der Adenoviren.

In einem ersten Schritt wurde die Biodistribution mittels quantitativer PCR untersucht, in der die virale E4-Kopienzahl im Lebergewebe (DNA) gemessen wurde. Diese Untersuchung erlaubt keinen Rückschluss darauf ob Hepatozyten oder Kupfferzellen transduziert wurden. Aus diesem Grund wird die Kopienzahl im relativen Vergleich bewertet (Ni et al.2005).

Erwartungsgemäß führte die Applikation von Ad5wt zu der höchsten Viruskopienzahl in der Leber und lag signifikant höher als die der Fiberchimäre Ad5/3 Δ 24, Ad5/3MDR1E1 und Ad5/3MDR1E1 Δ 24. Der hohe Gehalt an Ad5wt Viruskopien in der Leber ist durch den ausgeprägten Lebertropismus des Ad5 Serotypes zu erklären.

1997 zeigten Worgall et al., dass der Hauptanteil einer i.v. applizierten Ad5 Dosis innerhalb der ersten 24h von den Leber-Makrophagen (Retikuloendotheliales System= RES) aufgenommen wird und zur Nekrose der Kupffer'schen Zellen führt (Worgall et al.1997, Alemany et al.2008, Xu et al.2008). Erst nach Sättigung der Makrophagen werden Hepatozyten infiziert, in denen es zu einer effizienten Transgen-Expression kommen kann (Shashkova et al.2009, Manickan et al 2005).

Somit können Virus- Kopienzahl (determiniert durch den Virusgehalt in allen Zellen der Leber) und Transgenexpression (determiniert durch den Virusgehalt der Hepatozyten) in der Leber stark differieren.

Die bei diesem in vivo Versuch gemessene signifikant niedrigere Kopienzahl der untersuchten Ad5/3 Fiberchimäre im Vergleich zu Ad5 sind wahrscheinlich auf die

verminderte Aufnahme der Fiberchimäre in Kupffer- Zellen zurückzuführen und korrelieren mit Ergebnissen früherer Untersuchungen (Kanerva et al. 2002b).

Die Transgenexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Im Rahmen der histo-pathologischen Untersuchung wurden in der Ad5wt therapierten Gruppe im Vergleich zu den mit fibermodifizierten Adenoviren therapierten Mäusen deutliche Zellnekrosen, Inflammationszeichen und hämorrhagische Veränderungen beobachtet. Hingegen zeigten die 5/3 Fiberchimäre nur geringe Zeichen der Inflammation. Im Hinblick auf die Schlüsselfunktion der Kupffer- Zellen bei der Immunantwort, ist die geringere inflammatorische Reaktion nach Applikation der Ad5/3 Vektoren durch ihren geringeren „Kupfferzelltropismus“ erklärbar (Kanerva et al. 2002b).

Als wesentlicher Mechanismus für den Ad5 vermittelten Lebertropismus wird nach neusten Erkenntnissen die Bindung von Ad5-Hexonproteinen an Gerinnungsfaktoren wie Faktor IX und X gesehen, die die Transduktion in Hepatozyten einleitet bzw. ermöglicht (Waddington et al.2008, Arnberg et al.2009). Gruppe B zugehörige Adenoviren- Serotypen wie Ad11 und 35 die nicht in der Lage sind Faktor X zu binden verursachen geringe Lebertoxizität (Kalyuzhnev et al.2008). Obwohl für Ad3 bezüglich dieses Mechanismus noch keine Daten bekannt sind, wäre dies ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die beobachtete geringere Hepatotoxizität.

Das abrupte Versterben eines Großteils (80%) der Ad5wt therapierten Mäuse an Tag 18 (7Tage nach Virusapplikation) wurde gleichermaßen von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Verantwortlich für die Toxizität von Ad5wt ist die geringe Spezifität des nicht modifizierten Wildtyp Adenovirus. Die Transduktionseffizienz von Ad5 in die Tumorzelle wird durch die niedrige Expression des Coxsackie-Adenovirus- Rezeptor erklärt. Somit werden wenige Virionen in Tumorzellen aufgenommen und gelangen über die Blutbahn in die Leber. Durch den natürlichen Lebertropismus der Wildtyp Adenoviren kommt es rasch zu einer signifikanten Leberzellschädigung. Die Ad5/3 Chimäre hingegen erlaubt durch die effizientere Transduktion der Tumorzellen einen Eintritt in die Zielzellen und somit eine geringere Blutzirkulation der Viruspartikel (Lam et al. 2004). Der vermehrte Gehalt der Ad5wt Vektoren in der Leber hat dann vermutlich trotz der nicht effizienten Replikation von humanen Adenoviren in Mausgewebe über die vermehrte Expression des E1A Gens hepatotoxisch gewirkt (Kanerva et al. 2004b). Es wurde gezeigt, dass E1A proapoptotische

Wirtszellmechanismen triggert, die schnell den Zelltod einleiten. Zudem führt es zu einer gesteigerten TNF-alpha Freisetzung (Engler et al. 2004). Die histo-pathologischen Ergebnisse sind gut mit einem akuten Leberversagen der Ad5wt therapierten Gruppe vereinbar.

Der Vergleich zwischen den 5/3 Fiberchimären in denen das E1-Gen unter der Kontrolle des MDR1- Promotors steht und dem Kontrollvirus Ad5/3 Δ 24 ergab für die beiden MDR1- Promotor gesteuerten CRAD's eine signifikant (ca. 20-fach) niedrigere Kopienzahl im Lebergewebe als für das Kontrollvirus Ad5/3 Δ 24. Das Virus Ad5/3 Δ 24 enthält eine 24-Basenpaare umfassende Deletion der Rb- Bindungssequenz in der viralen E1A- Region. Das Virus repliziert nicht in gesunden Zellen mit intaktem G1-S-Phase-Checkpoint. Durch die erfolgreiche Anwendung dieses Ansatzes in Ovarialkarzinomen und Glioblastomen gelten Δ 24- deletierte Adenoviren als Standard in der Bewertung replikationsspezifischer CRAD's. In dieser Arbeit konnte die deutlich höhere Tumorspezifität und der geringere Lebertropismus der MDR- Promotor gesteuerten CRAD's demonstriert werden.

Grundsätzlich sind Aussagen über die Replikation humaner Ads in Mausgewebe nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Da jedoch annähernd gleiche Transduktionseffizienzen durch die identische Fieber-Knob-Domäne sichergestellt wurden, ist eine vergleichende Analyse statthaft.

Im Vergleich zu Ad5/3MDR1E1 zeigte Ad5/3MDR1E1 Δ 24 keine verminderte Replikation in der Leber. Ein zusätzlicher Sicherheitsaspekt konnte durch die zusätzliche Δ 24-Mutation in E1A nicht erreicht werden. Die Δ 24-Deletion erbrachte keinen Vorteil hinsichtlich der Lebertoxizität.

Der histopathologische Vergleich korreliert mit den Ergebnissen der PCR. Die Untersuchung der Mäuse die mit Ad5wt therapiert wurden zeigten schwere Leberzellnekrosen, Lebern der Mäuse die mit den Ad5/3-Fiberchimären behandelt wurden zeigten milde bis moderate zytomorphologische Veränderungen wobei die MDR1-CRAD's im Durchschnitt eine leichtere Leberzelldegeneration aufwiesen.

Tumor / Leber Ratio

Um die klinische Toxizität der Vektoren besser abschätzen zu können wurde die Tumor/Leber Ratio für die verschiedenen Adenoviren errechnet. Im klinischen Alltag ist die Tumor/Leber Ratio ein Hinweis auf die „therapeutischen Breite“ eines gentherapeutischen

Vektors. Gewünscht ist eine hoher Wirtsstoffspiegel im Zielgewebe bzw. ein niedriger Wirtsstoffspiegel in Nicht-Zielgeweben.

Die Infektion mit Ad5/3MDR1E1 resultierte in der höchsten Ratio aller getesteten Viren. Hier wurde ein 3700fach höherer Virusgehalt im Tumor im Vergleich zur Leber gefunden. Das zweite CRAd Ad5/3MDR1E1Δ24 zeigte einen rund 1400fach höheren Virusgehalt im Tumor im Vergleich zur Leber. Die kleinste Ratio zeigte Ad5/3Δ24 mit einem Wert von 120. Beide MDR1 gesteuerten CRAD's zeigten folglich eine signifikant bessere Ratio als das isogenetische Kontrollvirus.

Abbildung 26 zeigt eine simultane Darstellung des E4- Gehalts in der Leber, im Tumor und der Leber/Tumor Ratio. Hier ist zu erkennen, dass die Unterschiede der Ratios primär durch die Unterschiede im Lebertropismus bedingt sind. Trotz höchstem E4- Virusgehalt im Tumor hat Ad5/3Δ24 die kleinste Tumor/ Leber Ratio.

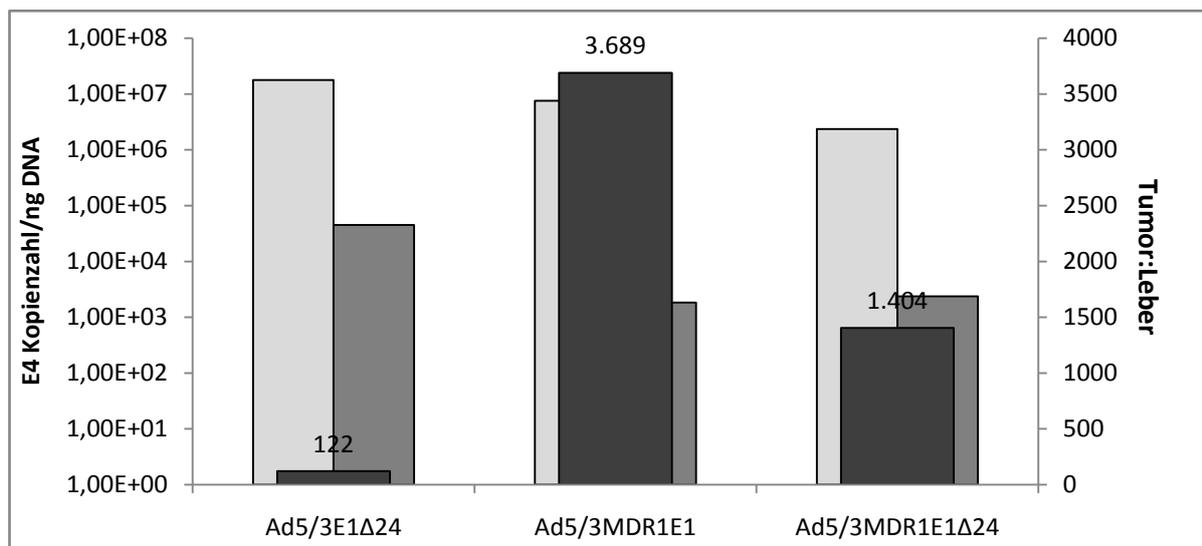


Abb.26: Quantitative Darstellung des viralen E4 Gens in der Leber der Maus und im Tumor mittels PCR sowie Darstellung der Tumor: Leber Ratio. Nach i.p. Applikation von SKOV3.ip-Tumorzellen sowie Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1 oder Ad5/3MDRE1Δ24. hellgrau: Tumor, grau: Leber, schwarz: Ratio.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten konditional replizierenden Viren einen tumorselektiven Tropismus aufwiesen, wobei nach Infektion mit Ad5/3MDR1E1 die höchste Tumor/Leber Ratio der untersuchten Vektoren gemessen wurde. (2-3fach erhöht zu Ad5/3MDR1E1Δ24, 30fach erhöht zu Ad5/3Δ24).

Peritoneum

Die meisten veröffentlichten Studien für das Ovarialkarzinom basieren auf einer intraperitonealen Vektoradministration (Kanerva et al. 2002b, Takakura et al. 2010). Da hierbei das Peritoneum naturgemäß einer hohen Viruskonzentration ausgesetzt ist, liefert die Untersuchung des Peritonealgewebes wichtige Hinweise bezüglich einer möglichen klinischen Toxizität.

Die Applikation von Ad5wt führte zu der höchsten E4- Kopienzahl im Peritoneum. Alle drei CRAd's zeigen mit 10-40fach niedrigeren Werten einen deutlich geringeren Virusgehalt im Peritoneum. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen einer Arbeit von Kanerva et al. in der die Untersuchung des Peritoneums nach i.p. Administration adenoviraler Vektoren einen geringeren Virusgehalt der Knob- modifizierten Adenoviren im Vergleich zum Wildtypvirus zeigte (Kanerva et al.2002b). (Der ebenfalls hohe Gehalt an Ad5MDR1luc verstärkt die Annahme, dass der niedrigere Virusgehalt der Ad5/3 Fiberchimäre auf Ihre geringere Transduktionsrate im Peritoneum zurückzuführen ist.) Eine mögliche Erklärung ist die Lokalisation des Ad3 Rezeptors, der im intakten Peritoneum nicht gut zugänglich für eine Infektion mit Ad3 fiberchimärisierten CRAd's zu sein scheint (Kanerva et al. 2002b).

Die Deletion im E1 Gen scheint im Peritoneum eine zusätzliche Erhöhung der Spezifität zu erbringen. Beide $\Delta 24$ -CRAd's zeigten einen reduzierten Virusgehalt im Peritoneum im Vergleich zu Ad5/3MDR1E1 (siehe Abb.25). Bei gleichen Transduktionsraten (alle drei Viren sind Ad5/3 Fiberchimäre) kann in diesem Gewebe ein bremsender Einfluss der 24-bp-Deletion im E1-Gen festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte bei der Untersuchung des Peritoneums eine hohe Spezifität aller untersuchten CRAd's im Vergleich zu Ad5wt gezeigt werden. Die Deletion des E1 Gens scheint einen zusätzlichen Nutzen zu erbringen.

4.5 Ergebnisse der Kombinationstherapie

In der Gruppe die eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und CRAd- Applikation erhielt sind alle Mäuse auffällig rasch verstorben und es konnte kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit zwischen den replizierenden Virusgruppen erkannt werden. Mit medianen Überlebensraten von 18,18,18,18,24 bzw. 21 Tagen für Ad5wt, Ad5/3 $\Delta 24$,

Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24, Ad5MDR1luc bzw. keinem Virus lag war das Überleben insgesamt unerwartet gering.

Es fällt auf, dass bis zu Tag 20 (5.Tag nach Chemo-Applikation) 87,5 % der Mäuse, die mit einem replizierenden Virus (Ad5wt, Ad5/3Δ24, Ad5/3MDR1E1, Ad5/3MDR1E1Δ24) behandelt worden waren, verstorben sind. In einem paarweisen Vergleich zeigen sowohl die Subpopulation, der mit Ad5MDR1luc therapierten Mäuse als auch die Kontrollgruppe ohne Virus ein signifikant höheres Überleben als Ad5wt, Ad5/3Δ24 und Ad5/3MDR1E1 ($p \leq 0,01$). Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass das frühe Versterben der Mäuse, die mittels Kombinationstherapie behandelt wurden, auf ein toxisches, fulminantes Leberversagen zurückzuführen ist. Die Kontrollgruppe die ohne Virus bzw. mit dem replikationsdefizienten Virus therapiert wurde zeigte eine nur geringe oder keine kumulative Hepatotoxizität.

In einer vergleichbaren Arbeit von Raki et al. wurde nach einer Kombinationstherapie von Ad5/3Δ24 und Gemcitabine ebenfalls ein frühes Versterben der Mäuse beobachtet. Als Ursache wurde ebenfalls Hepatotoxizität mittels histopathologischer Untersuchung, in der sich zentrilobuläre bis totale Lebernekrosen (>95%) fanden, bestätigt. Zudem gab es Hinweise, dass es unter der Kombinationstherapie zu einer Knochenmarkstoxizität gekommen ist (Raki et al.2005).

Bei der Literaturrecherche im Rahmen der Planung des Tierversuches hatte sich bereits gezeigt, dass nur wenige Untersuchungen zu einer kombinierten Chemo- und Genterapie durchgeführt und publiziert worden sind.

Es bleibt ungeklärt ob die ausgeprägte Hepatotoxizität auf einem synergistischen Effekt beider Therapieformen oder auf eine zu hohe Chemotherapie-dosis zurückzuführen ist.

Die Dosis wurde gewählt in Analogie zur Therapiedosis beim Menschen nämlich 6mg/kg Körpergewicht. Grundsätzlich hat sich in vergangenen Studien die Methode bewährt, die Dosis eines Zytostatikums bei der Maus in Analogie zur Dosierung beim Menschen zu wählen. In einer Kombinatinstherapie muss die Dosis der einzelnen Substanzen in künftigen Untersuchungen wahrscheinlich reduziert werden.

Wenn die Sensitivitätssteigerungen auf einen synergistischen Effekt beruhen, könnte als Mechanismus die Supprimierung von NF-kB und PARP, durch adenovirales E1A vermutet

werde. NF- κ B, das normalerweise Apoptose hemmt und PARP, welches eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur spielt sind normalerweise in zytostatisch vorbehandelten Tumorzellen hochreguliert (Raki et al.2008, Zang et al.2001). In einer Arbeit zum hepatozellulären Karzinom wurde eine auf diesem Mechanismus beruhende Sensibilitätssteigerung für Gemcitabin durch das virale E1A Protein demonstriert (Lee et al. 2003).

Die im Rahmen dieser Untersuchung aufgetretene Lebertoxizität wird bei der Planung künftiger Studien der Düsseldorfer Arbeitsgruppe entsprechend berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination des Chemotherapeutikums und der adenoviralen Vektoren in einer starken Toxizität resultierte, sodass die Evaluation des MDR1- Promotors in Kombination mit Chemotherapie nicht möglich war. Offen bleibt die Frage ob und in wie weit man mit einer Chemotherapie eine Steigerung der onkolytischen Potenz der MDR1- CRAd's erzielen kann. Dies wird aktuell in einem weiteren Tiermodell untersucht.

5. Zusammenfassung

Der Einsatz konditional replikativer Adenoviren stellt einen neuen Behandlungsansatz in der Therapie maligner Tumore dar. Grundvoraussetzung für eine effektive Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms ist eine effektive Infektion sowie eine hohe Zielzellspezifität der eingesetzten viralen Vektoren.

Die Modifikation der adenoviralen Fiber durch Einsatz einer 5/3-Fiber-Chimäre ist ein etablierter Ansatz zur Umgehung der CAR-Defizienz in Ovarialkarzinomzellen.

Zur effektiven Steuerung der viralen Infektion und Replikation wurde der Multiple Drug-Resistance Gen 1 (MDR 1)-Promotor eingesetzt. Ziel war es selektiv solche Tumorzellen zu infizieren und abzutöten, welche bedingt durch eine MDR 1 vermittelte Zytostatikaresistenz einer chemotherapeutischen Behandlung nicht zugänglich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell mit Peritonealkarzinose durchgeführt. Nach intraperitonealer Applikation der viralen Vektoren zeigen die mit MDR 1-gesteuerten replikativen Adenoviren behandelten Mäuse ein signifikant längeres Überleben als Mäuse, die mit Wildtyp-Adenoviren oder nicht-replikativen Kontrollviren behandelt wurden. Somit konnte eine hohe Effizienz einer MDR 1-gesteuerten Krebsgentherapie des Ovarialkarzinoms im Mausmodell demonstriert werden. Zur Untersuchung der Spezifität wurden vergleichende immunhistochemische Untersuchungen der Expression des viralen E1A-Gens in den Tumoren sowie gesunden peritonealen Zellen der Maus durchgeführt. Hier zeigt sich eine signifikant höhere E1A positiver Zellen in den Tumoren. Somit konnte eine Zielzellspezifität des Krebsgentherapieansatzes nachgewiesen werden.

Aufgrund des natürlichen Lebertropismus der Adenoviren spielt die Lebertoxizität bei einer adenovirusbasierten Krebsgentherapie eine besondere Rolle. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Lebertoxizität mittels histopathologischer und molekularer Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich an H&E gefärbten Schnitten der Lebern der Mäuse eine signifikant niedrigere Toxizität nach Applikation der MDR 1-gesteuerten Adenoviren im Vergleich zu verschiedenen positiven Kontrollen. Die Ergebnisse konnten auf molekularer Ebene durch vergleichende Untersuchungen der Expression des viralen E4-Gens bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine zielgerichtete, MDR 1 spezifische Behandlung auf der Basis konditional replikativer Adenoviren eine vielversprechende Option zur Behandlung zytostatikaresistenter Ovarialkarzinome darstellt. In zukünftigen Arbeiten werden synergistische Effekte einer Krebs- und Gentherapie weiter untersucht werden.

6. Literatur

Abolhoda A, Wilson A, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW. "Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin." *Clin Cancer Res* 1999. 5(11): 3352-6.

Alba R, Bosch A, Chillon M. "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." *Gene Ther* 2005. 12 Suppl 1: 18-27.

Antoniou AC, Rookus M, Andrieu N, Brohet R, Chang-Claude J, Peock S, Cook M, Evans DG, Eeles R; EMBRACE, Nogues C, Faivre L, Gesta P; GENEPSO, van Leeuwen FE, Ausems MG, Osorio A; GEO-HEBON, Caldes T, Simard J, Lubinski J, Gerdes AM, Olah E, Fürhauser C, Olsson H, Arver B, Radice P, Easton DF, Goldgar DE. "Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Feb. 18(2): 601-10.

Arao S, Suwa H, Mandai M, Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. "Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer." *Cancer Res* 1994 Mar. 54(5): 1355-9.

Arnberg N. "Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting." *Rev Med Virol* 2009 May. 19(3): 165-78.

Auner V, Sehouli J, Oskay-Oezcelik G, Horvat R, Speiser P, Zeillinger R. "ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue." *Gynecol Oncol* 2010 May. 117(2): 198-201

Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB. "P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer." *Anticancer Res* 2000 Mar-Apr. 20(2B): 1061-7.

Bai F, Feng J, Cheng Y, Shi J, Yang R, Cui H. "Analysis of gene expression patterns of ovarian cancer cell lines with different metastatic potentials." *Int J Gynecol Cancer* 2006 Jan-Feb. 16(1): 202-9.

Ballestrero A, Boy D, Moran E, Cirmena G, Brossart P, Nencioni A. "Immunotherapy with dendritic cells for cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 2008 Jan. 60(2): 173-83.

Bao Y, Peng W, Verbitsky A, Chen J, Wu L, Rauen KA, Sawicki JA. "Human coxsackie adenovirus receptor (CAR) expression in transgenic mouse prostate tumors enhances adenoviral delivery of genes." *Prostate* 2005 Sep. 64(4): 401-7.

Barnett BG, Crews C, Douglas JT. "Targeted adenoviral vectors." *Biochim Biophys Acta* 2002 May. 1575(1-3): 1-14.

Bauerschmitz GJ, Lam J, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krasnykh V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemany R, Curiel DT, Hemminki A. "Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus." *Cancer Res* 2002 Mar. 62(5): 1266-70.

Bauerschmitz GJ, Barker S, Hemminki A. "Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents " *Int J Oncol* 2002 Dec. 21(6): 1161-74.

Bauerschmitz GJ, Guse K, Kanerva A, Menzel A, Herrmann I, Desmond RA, Yamamoto M, Nettelbeck DM, Hakkarainen T, Dall P, Curiel DT, Hemminki A. "Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the cox2 promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells." *Mol Ther* 2006 Aug. 14(2): 164-74.

Benedetti Panici P, Palaia I, Graziano M, Bellati F, Mancini N, Angioli R. "Intraperitoneal paclitaxel as consolidation treatment in ovarian cancer patients: a case control study." *Oncology* 2010. 78(1): 20-5.

Bischoff JR, Kirn D, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F. "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." *Science* 1996 Oct. 274(5286): 373-6.

Breidenbach M, Rein DT, Mallmann P, Kurbacher CM. "Individualized long-term chemotherapy for recurrent ovarian cancer after failing high-dose treatment." *Anticancer Drugs* 2002 Feb. 13(2): 173-6.

Breidenbach M, Rein DT, Wang M, Nettelbeck DM, Hemminki A, Ulasov I, Rivera AR, Everts M, Alvarez RD, Douglas JT, Curiel DT. "Genetic replacement of the adenovirus shaft fiber reduces liver tropism in ovarian cancer gene therapy." *Hum Gene Ther* 2004 May. 15(5): 509-18.

Breidenbach M, Rein DT, Everts M, Glasgow JN, Wang M, Passineau MJ, Alvarez RD, Korokhov N, Curiel DT. "Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy." *Gene Ther* 2005 Jan. 12(2): 187-93.

Buller RE, Runnebaum I, Karlan BY, Horowitz JA, Shahin M, Buekers T, Petrauskas S, Kreienberg R, Slamon D, Pegram M. "A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer." *Cancer Gene Ther* 2002 Jul. 9(7): 553-66.

Chang DY, Yoo S, Hong Y, Kim S, Kim SJ, Yoon SH, Cho KG, Paek SH, Lee YD, Kim SS, Suh-Kim H, "The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase." *Int J Cancer* 2010 Apr.

Chen H, Hao J, Wang L, Li Y. "Coexpression of invasive markers (uPA, CD44) and multiple drug-resistance proteins (MDR1, MRP2) is correlated with epithelial ovarian cancer progression." *Br J Cancer* 2009 Aug. 4;101(3): 432-40.

Chene, G., Penault-Llorca, F., Le Bouedec, G., Mishellany, F., Dauplat, M.M., Jaffeux, P., Aublet-Cuvelier, B., Pouly, J.L., Dechelotte, P., Dauplat, J. "Ovarian epithelial dysplasia after ovulation induction: time and dose effects. ." *Human Reproduction* January 2009. 24(1): 132-138.

Cheng G, Zhu H, Sun L. "The expression of multiple drug resistance associated genes in ovarian cancer." *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2000 Feb. 35(2): 87-90.

Cody JJ, Douglas J. "Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy." *Cancer Gene Ther* 2009 Jun. 16(6): 473-88.

D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. "Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies." *Clin Cancer Res* 2004 Dec. 10(24): 8132-41.

Danthinne X, Imperial M. "Production of first generation adenovirus vectors: a review." *Gene Ther* 2000 Oct. 7(20): 1707-14.

Dias JD, Liikanen I., Guse K, Foloppe J, Sloniecka M, Diaconu I, Rantanen V, Eriksson M, Hakkarainen T, Lusky M, Erbs P, Escutenaire S, Kanerva A, Pesonen S, Cerullo V, Hemminki A. "Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1." *Clin Cancer Res* 2010 May. 16(9): 2540-9.

Dong X, Mattingly C, Tseng MT, Cho MJ, Liu Y, Adams VR, Mumper RJ. "Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP." *Cancer Res* 2009 May. 69(9): 3918-26.

Dorer DE, Nettelbeck D. "Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis." *Adv Drug Deliv Rev* 2009 Jul. 2;61(7-8): 554-71.

Dormond E, Perrier M, Kamen A. "From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield." *Biotechnol Adv* 2009 Mar-Apr. 27(2): 133-44.

du Bois A, Reuss A, Harter P, Pujade-Lauraine E, Ray-Coquard I, Pfisterer J; Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom; Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens. "Potential role of lymphadenectomy in advanced ovarian cancer: a combined exploratory analysis of three prospectively randomized phase III multicenter trials." *J Clin Oncol* 2010 Apr. 28(10): 1733-9.

du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. "Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials," *Cancer* 2009 Mar. 115(6): 1234-44.

Engler H, Macherer T, Philopena J, Wen SF, Quijano E, Ramachandra M, Tsai V, Ralston R. "Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF-alpha." *Virology* 2004 Oct. 328(1): 52-61.

Esche H, Siegmann B. "Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and -transformed cells." *J Gen Virol* 1982 May. 60(Pt 1): 99-113.

Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP. "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." *Oncogene* 2000 Jan. 19(1): 2-12.

Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, Endo Y, Hioki M, Ikeda Y, Sakai R, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. "Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy." *Int J Cancer* 2006 Jul. 119(2): 432-40.

Fujiwara K, Armstrong D, Morgan M, Markman M. "Principles and practice of intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer." *Int J Gynecol Cancer* 2007 Jan-Feb. 17(1): 1-20.

Fung-Kee-Fung M, Oliver T, Elit L, Oza A, Hirte HW, Bryson P. "Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer." *Curr Oncol* 2007 Oct. 14(5): 195-208.

Garber K. "China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment." *J Natl Cancer Inst* 2006 Mar. 98(5): 298-300.

Glasgow JN, Everts M, Curiel DT. "Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy." *Cancer Gene Ther* 2006 Sep. 13(9): 830-44.

Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, et al. "Expression of a multidrug resistance gene in human cancers." *J Natl Cancer Inst* 1989 Jan. 81(2): 116-24.

Gomez-Manzano C, Alonso M, Yung WK, McCormick F, Curiel DT, Lang FF, Jiang H, Bekele BN, Zhou X, Alemany R, Fueyo J. "Delta-24 increases the expression and activity of topoisomerase I and enhances the antiglioma effect of irinotecan." *Clin Cancer Res* 2006 Jan. 12(2): 556-62.

Grindedal EM, Renkonen-Sinisalo L., Vasen H, Evans G, Sala P, Blanco I, Gronwald J, Apold J, Eccles DM, Sánchez AA, Sampson J, Järvinen HJ, Bertario L, Crawford GC, Stormorken AT, Maehle L, Moller P. "Survival in women with MMR mutations and ovarian cancer: a multicentre study in Lynch syndrome kindreds." *J Med Genet* 2010 Feb. **47(2)**: 99-102.

Gynäkologische Organkommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie. "Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Leitlinien, Empfehlungen, Stellungnahmen: Stand September 2006.

Hall K, Zajdel M, Blair GE. "Defining the role of CD46, CD80 and CD86 in mediating adenovirus type 3 fiber interactions with host cells." *Virology* 2009 Sep. 392(2): 222-9.

Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K. "Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors." *J Virol* 1999. 73: 6141-6146.

Hasenburg A, Tong X, Fischer DC, Rojas-Martinez A, Nyberg-Hoffman C, Kaplan AL, Kaufman RH, Ramzy I, Aguilar-Cordova E, Kieback DG. "Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy in combination with topotecan for patients with recurrent ovarian cancer: 2.5-year follow-up." *Gynecol Oncol* 2001 Dec. 83(3): 549-54.

Haviv YS, Curiel D. "Engineering regulatory elements for conditionally-replicative adenoviruses." *Curr Gene Ther* 2003 Aug. 3(4): 357-85.

Hemminki A, Belousova N, Zinn KR, Liu B, Wang M, Chaudhuri TR, Rogers BE, Buchsbaum DJ, Siegal GP, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Curiel DT, Alvarez RD. "An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression." *Mol Ther* 2001 Sep. 4(3): 223-31.

Hemminki A, Wang M, Desmond RA, Strong TV, Alvarez RD, Curiel DT. "Serum and ascites neutralizing antibodies in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal adenoviral gene therapy." *Hum Gene Ther* 2002 Aug. 13(12): 1505-14.

Hemminki A, Kanerva A, Liu B, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT. "Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression." *Cancer Res* 2003 Feb. 63(4): 847-53.

Hille S, Rein D, Riffelmann M, Neumann R, Sartorius J, Pfützner A, Kurbacher CM, Schöndorf T, Breidenbach M. "Anticancer drugs induce mdr1 gene expression in recurrent ovarian cancer." Anticancer Drugs. 17(9): 1041-4.

Högberg T, Glimelius B, Nygren P; SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. "A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer." *Acta Oncol* 2001. 40(2-3): 340-60.

Howarth JL, Lee Y, Uney JB. "Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells)." *Cell Biol Toxicol* 2010 Feb. 26(1)

Howe JA, Demers G, Johnson DE, Neugebauer SE, Perry ST, Vaillancourt MT, Faha B. "Evaluation of E1-mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy." *Mol Ther* 2000 Nov. 2(5): 485-95.

Imperiale MJ, Kochanek S. "Adenovirus vectors: biology, design, and production." *Curr Top Microbiol Immunol* 2004. 273: 335-57.

Ingram N, Maccormac L, Oxley NT, Burns PA, Hall GD. "Role of cell surface molecules and autologous ascitic fluid in determining efficiency of adenoviral transduction of ovarian cancer cells." *Cancer Gene Ther* 2010 Jun.

Israeli D, Ziaei S, Gonin P, Garcia L. "A proposal for the physiological significance of mdr1 and Bcrp1/Abcg2 gene expression in normal tissue regeneration and after cancer therapy." *J Theor Biol* 2005 Jan. 232(1): 41-5.

Hay JG. " "Man's best friend": a new model system for cancer therapeutics?" *Mol Ther* 2003 Feb. 7(2): 144-5.

Jordan MA, Toso R, Thrower D, Wilson L. "Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death." *Cancer Res* 1996 Feb. 56(4): 816-25.

Kanerva A, Mikheeva G, Krasnykh V, Coolidge CJ, Lam JT, Mahasreshti PJ, Barker SD, Straughn M, Barnes MN, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. "Targeting Adenovirus to the Serotype 3 Receptor Increases Gene Transfer Efficiency to Ovarian Cancer Cells." *Clin Cancer Res* 2002 Jan. 8(1): 275-80.

Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ, Lam JT, Desmond RA, Bhoola SM, Barnes MN, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A. "Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses." *Mol Ther* 2002 Jun. 5(6): 695-704.

Kanerva A, Bauerschmitz G., Yamamoto M, Lam JT, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A. "A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma." *Gene Ther* 2004 Mar. 11(6): 552-9.

Kanerva A, Hemminki A. "Modified adenoviruses for cancer gene therapy." *Int J Cancer* 2004 Jul. 1;110(4): 475-80.

Kawashima H, Ogose A, Yoshizawa T, Kuwano R, Hotta Y, Hotta T, Hatano H, Kawashima H, Endo N. "Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in musculoskeletal tumors and mesenchymal tissues: efficacy of adenoviral gene therapy for osteosarcoma." *Cancer Sci* 2003 Jan. 94(1): 70-5.

Kirn D. "Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned?" *Gene Ther* 2001 Jan. 8(2): 89-98.

Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010

Kuo M. "Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 2009 Jan. 11(1) 99-133.

Lam JT, Kanerva A, Bauerschmitz GJ, Takayama K, Suzuki K, Yamamoto M, Bhoola SM, Liu B, Wang M, Barnes MN, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A. "Inter-patient variation in efficacy of five oncolytic adenovirus candidates for ovarian cancer therapy." *J Gene Med* 2004 Dec. 6(12): 1333-42.

Lanier LL, O` Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. "CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL." *J Immunol* 1995 Jan. 154(1): 97-105.

Lee WP, Tai D, Tsai SL, Yeh CT, Chao Y, Lee SD, Hung MC. "Adenovirus type 5 E1A sensitizes hepatocellular carcinoma cells to gemcitabine." *Cancer Res* 2003 Oct. 63(19): 6229-36.

Leslie EM, Deeley R, Cole SP. "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 May. 204(3): 216-37.

Li X, Liu Y, Wen Z, Li C, Lu H, Tian M, Jin K, Sun L, Gao P, Yang E, Xu X, Kan S, Wang Z, Wang Y, Jin N. "Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin in vitro and in vivo." *Mol Cancer* 2010 Jan. 9:10.

Lieber A, He C, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, Kay MA. "The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors." *J Virol* 1997 Nov. 71(11): 8798-807.

Liu YH, Di Y, Zhou ZW, Mo SL, Zhou SF. "Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010 Jan. 37(1): 115-20.

Lu L, Katsaros D, Wiley A, Rigault de la Longrais IA, Puopolo M, Yu H. "Expression of MDR1 in epithelial ovarian cancer and its association with disease progression." *Oncol Res* 2007. 16(8): 395-403.

Manickan E, Smith J, Tian J, Eggerman TL, Lozier JN, Muller J, Byrnes AP. "Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors." *Mol Ther* 2006 Jan. 13(1): 108-17.

Markman M, Brady M, Spirtos NM, Hanjani P, Rubin SC. "Phase II trial of intraperitoneal paclitaxel in carcinoma of the ovary, tube, and peritoneum: a Gynecologic Oncology Group Study." *J Clin Oncol* 1998 Aug. 16(8): 2620-4.

Martirosyan A, Clendening J, Goard CA, Penn LZ. "Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance." *BMC Cancer* 2010 Mar. 10: 103

Marttila M, Persson D., Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson JP, Wadell G, Arnberg N. "CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7." *J Virol* 2005 Nov. 79(22): 14429-36.

Materna V, Plegler J, Hoffmann U, Lage H. "RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response." *Gynecol Oncol* 2004 Jul. 94(1): 152-60.

McDonald D, Stockwin L, Matzow T, Blair Zajdel ME, Blair GE. "Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells." *Gene Ther* 1999 Sep. 6(9): 1512-9.

Matthews KS, Alvarez R, Curiel DT. "Advancements in adenoviral based virotherapy for ovarian cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 2009 Aug. 61(10): 836-41.

Nelson AR, Davydova J, Curiel DT, Yamamoto M. "Combination of conditionally replicative adenovirus and standard chemotherapies shows synergistic antitumor effect in pancreatic cancer." *Cancer Sci* 2009 Nov. 100(11): 2181-7.

Nettelbeck DM, Rivera A, Balagué C, Alemany R, Curiel DT. "Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter." *Cancer Res* 2002 Aug. 15;62(16): 4663-70.

Nettelbeck. "Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer." *J Mol Med* 2008 Apr. 86(4): 363-77.

Ni S, Bernt K, Gaggar A, Li ZY, Kiem HP, Lieber A. "Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons." *Hum Gene Ther* 2005 Jun. 16(6): 664-77.

Nicklin SA, Wu E, Nemerow GR, Baker AH. "The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy." *Mol Ther* 2005 Sep. 12(3): 384-93.

Oberg D, Yanover E, Adam V, Sweeney K, Costas C, Lemoine NR, Halldén G. "Improved potency and selectivity of an oncolytic E1ACR2 and E1B19K deleted adenoviral mutant in prostate and pancreatic cancers." *Clin Cancer Res* 2010 Jan. 16(2): 541-53.

Odening KE, Li W, Rutz R, Laufs S, Fruehauf S, Fishelson Z, Kirschfink M. "Enhanced complement resistance in drug-selected P-glycoprotein expressing multi-drug-resistant ovarian carcinoma cells." *Clin Exp Immunol* 2009 Feb. 155(2): 239-48.

Ojima I, Geney R, Ungureanu IM, Li D. "Medicinal chemistry and chemical biology of new generation taxane antitumor agents." *IUBMB Life* 2002 Apr-May. 53(4-5): 269-74.

O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, Boyle L, Pandey K, Soria C, Kunich J, Shen Y, Habets G, Ginzinger D, McCormick F. "Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity." *Cancer Cell* 2004 Dec. 6(6): 611-23.

Pérez-Tomás. "Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment." *Curr Med Chem* 2006. 3(16): 1859-76.

Pfisterer J, Hilpert F, Du Bois A, Meier W, Wagner U. "State-of-the-art first-line treatment of ovarian cancer." *Onkologie* 2003 Oct. 26(5): 446-50.

Raki M, Kanerva A, Ristimäki A, Desmond RA, Chen DT, Ranki T, Sarkioja M, Kangasniemi L, Hemminki A. "Combination of gemcitabine and Ad5/3-Delta24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus, for the treatment of ovarian cancer." *Gene Ther* 2005 Aug. 12(15): 1198-205.

Raki M, Rein DT, Kanerva A, Hemminki A. "Gene transfer approaches for gynecological diseases." *Mol Ther* 2006 Aug. 14(2): 154-63.

Raki M, Särkijoa M, Desmond RA, Chen DT, Bützow R, Hemminki A, Kanerva A. "Oncolytic adenovirus Ad5/3-delta24 and chemotherapy for treatment of orthotopic ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 2008 Jan. 108(1): 166-72.

Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. "Prognostic value of P-glycoprotein and proliferative index in advanced low grade serous ovarian carcinomas." *J Chemother* 2003 Aug. 15(4): 380-6.

Raspolini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Taddei GL. "Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival." *Int J Gynecol Cancer* 2005 Mar-Apr. 15(2): 255-60

Rein DT, Breidenbach M, Wu H, Han T, Haviv YS, Wang M, Kirby TO, Kawakami Y, Dall P, Alvarez RD, Curiel DT. "Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses." *Int J Cancer* 2004 Sep. 111(5): 698-704.

Rein DT, Breidenbach M, Kirby TO, Han T, Siegal GP, Bauerschmitz GJ, Wang M, Nettelbeck DM, Tsuruta Y, Yamamoto M, Dall P, Hemminki A, Curiel DT. "A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer." *Clin Cancer Res* 2005 Feb. 1;11(3): 1327-35.

Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT. "Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy." *Future Oncol* 2006 Feb. 2(1):137-43 2(1): 137-43.

Relph KL, Harrington K, Pandha H. "Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer." *Semin Oncol* 2005 Dec. 32(6): 573-82.

Ries SJ, Brandts C. "Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials." *Drug Discov Today* 2004 Sep. 9(17): 759-68.

Rocconi RP, Zhu Z, Stoff-Khalili M, Rivera AA, Lu B, Wang M, Alvarez RD, Curiel DT, Makhija SK. "Treatment of ovarian cancer with a novel dual targeted conditionally replicative adenovirus (CRAd)." *Gynecol Oncol* 2007 Apr. 105(1): 113-21

Röder G, Keil O, Prisack HB, Bauerschmitz G, Hanstein B, Nestle-Krämling C, Hemminki A, Bender HG, Niederacher D, Dall P. "Novel cGMP liposomal vectors mediate efficient gene transfer." *Cancer Gene Ther* 2003 Apr. 10(4): 312-7.

Roth JA. "Adenovirus p53 gene therapy." *Expert Opin Biol Ther* 2006 Jan. 6(1): 55-61.

Sakai R, Kagawa S, Yamasaki Y, Kojima T, Uno F, Hashimoto Y, Watanabe Y, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T. "Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer." *Mol Cancer Ther* 2010 Jun. 9(6): 1884-93.

Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H. "Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses." *Curr Gene Ther* 2007 Aug. 7(4): 229-38.

Särkioja M, Pesonen S, Raki M, Hakkarainen T, Salo J, Ahonen MT, Kanerva A, Hemminki A. "Changing the adenovirus fiber for retaining gene delivery efficacy in the presence of neutralizing antibodies." *Gene Ther* 2008 Jun. 15(12): 921-9.

Schmeler KM, Daniels M, Soliman PT, Broaddus RR, Deavers MT, Vu TM, Chang GJ, Lu KH. "Primary peritoneal cancer after bilateral salpingo-oophorectomy in two patients with Lynch syndrome." *Obstet Gynecol* 2010. **115(2 Pt 2)**: 432-4.

Schöndorf T, Neumann R, Benz C, Becker M, Riffelmann M, Göhring UJ, Sartorius J, von König CH, Breidenbach M, Valter MM, Hoopmann M, Di Nicolantonio F, Kurbacher CM. "Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce mdr1 gene transcription in ovarian cancer cell lines." *Recent Results Cancer Res* 2003. 161:111-6.

Sharma A, Tandon M, Bangari DS, Mittal SK. "Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy." *Curr Drug Ther* 2009 May. 4(2): 117-138.

Shashkova EV, Doronin K, Senac JS, Barry MA. "Macrophage depletion combined with anticoagulant therapy increases therapeutic window of systemic treatment with oncolytic adenovirus." *Cancer Res* 2008 Jul. 68(14): 5896-904.

Shashkova EV, May S, Barry MA. "Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents." *Virology* 2009 Sep.

Shim SH, Lee C, Hun Hah J, Lee JJ, Park SW, Heo DS, Sung MW. "Conditionally replicating adenovirus improves gene replication efficiency and anticancer effect of E1-deleted adenovirus carrying TRAIL in head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Sci* 2010 Feb. 101(2): 482-7.

Short JJ, Pereboev A, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT. "Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors." *Virology* 2004 May. 322(2): 349-59.

Short JJ, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT, Pereboev A. "Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors." *Virus Res* 2006 Dec. 122(1-2): 144-53.

Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, Kälin S, Boucke K, Beerli RR, Vogt L, Ruedl C, Bachmann MF, Greber UF, Hemmi S. "The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3." *J Virol* 2004 May. 78(9): 4454-62.

Stauber und Weyerstahl, *Gynäkologie&Geburtshilfe*, pp.293-310, 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2007

Stoff-Khalili MA, Rivera A, Le LP, Stoff A, Everts M, Contreras JL, Chen D, Teng L, Rots MG, Haisma HJ, Rocconi RP, Bauerschmitz GJ, Rein DT, Yamamoto M, Siegal GP, Dall P, Michael Mathis J, Curiel DT. "Employment of liver tissue slice analysis to assay hepatotoxicity linked to replicative and nonreplicative adenoviral agents." *Cancer Gene Ther* 2006 Jun. 13(6): 606-18.

Stoff-Khalili, Mathis M, A Stoff, DT Curiel, A Hess, P Dall, D Niederacher, HG Bender. "Zielsteuerung der Adenovirotherapie des Mammakarzinoms auf der Ebene der Translation." *Geburtsh Frauenheilk Thieme eJournals* 2007. 67.

Stoff-Khalili MA, Rivera A, Nedeljkovic-Kurepa A, DeBenedetti A, Li XL, Odaka Y, Podduturi J, Sibley DA, Siegal GP, Stoff A, Young S, Zhu ZB, Curiel DT, Mathis JM. "Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control." *Breast Cancer Res Treat* 2008 Mar. 108(1): 43-55.

Strauss R, Sova P, Liu Y, Li ZY, Tuve S, Pritchard D, Brinkkoetter P, Möller T, Wildner O, Pesonen S, Hemminki A, Urban N, Drescher C, Lieber A. "Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses." *Cancer Res* 2009 Jun. 69(12): 5115-25.

Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Mizumoto Y, Fujiwara T, Urata Y, Inoue M. "Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affects survival in a xenograft model with peritoneal dissemination." *Cancer Gene Ther* 2010 Jan. 17(1): 11-9

Tanaka T, Kuroku M, Hamada H, Kato K, Kinugasa T, Shibaguchi H, Zhao J, Kuroki M . "Cancer-targeting gene therapy using tropism-modified adenovirus." *Anticancer Res* 2007 Nov-Dec. 27(6A): 3679-84.

The Journal of Gene Medicine: Gene Therapy Clinical Trials worldwide updated June 2010.
Online: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>; letzter Abruf: 23.08.2010

Thompson DJ, e. a. " Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers." *Journal of the National Cancer Institute* 2002. 94(18): 1358-65.

Tsuruta Y, Pereboeva L, Glasgow JN, Rein DT, Kawakami Y, Alvarez RD, Rocconi RP, Siegal GP, Dent P, Fisher PB, Curiel DT. "A mosaic fiber adenovirus serotype 5 vector containing reovirus sigma 1 and adenovirus serotype 3 knob fibers increases transduction in an ovarian cancer ex vivo system via a coxsackie and adenovirus receptor-independent pathway." *Clin Cancer Res* 2007 May. 1;13(9): 2777-83.

Tsuruta Y, Pereboeva L, Breidenbach M, Rein DT, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Dent P, Fisher PB, Curiel DT. "A fiber-modified mesothelin promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer." *Clin Cancer Res* 2008 Jun. 14(11): 3582-8.

Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, Shayakhmetov D, Li Z, Strauss R, Stone D, Lieber A. "A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells." *J Virol* 2006 Dec. 80(24): 12109-20.

Tuve S, Wang H, Jacobs JD, Yumul RC, Smith DF, Lieber A. "Role of cellular heparan sulfate proteoglycans in infection of human adenovirus serotype 3 and 35." *PLoS Pathog* 2008 Oct. 4(10).

Ueno NT, Bartholomeusz C, Herrmann JL, Estrov Z, Shao R, Andreeff M, Price J, Paul RW, Anklesaria P, Yu D, Hung MC. "E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway." *Clin Cancer Res* 2000 Jan. 6(1): 250-9.

van der Kolk DM, de Bock G, Leegte BK, Schaapveld M, Mourits MJ, de Vries J, van der Hout AH, Oosterwijk JC. "Penetrance of breast cancer, ovarian cancer and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 families: high cancer incidence at older age." *Breast Cancer Res Treat* 2010.

Van Geer MA, Brevoord D, Kuhlmann KF, Bakker CT, Mizuguchi H, Wesseling JG, Ten Kate FJ, Gouma DJ, Oude Elferink RP, Bosma PJ. "A fiber modified adenovirus vector that targets to the EphrinA2 receptor reveals enhanced gene transfer to ex vivo pancreatic cancer." *Int J Oncol* 2010 Jan. 36(1): 233-44.

Vasey PA, Shulman L, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, Kirn DH, O'Neill V, Siddiqui N, Seiden MV, Kaye SB. "Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer." *J Clin Oncol* 2002 Mar. 20(6): 1562-9.

Vorburger SA, Hunt K. "Adenoviral gene therapy." *Oncologist* 2002. 7(1): 46-59.

Waddington SN, McVey J, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SM, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IM, Monteiro RQ, Barouch DH, van Rooijen N, Napoli C, Havenga MJ, Nicklin SA, Baker AH. "Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer." *Cell* 2008 Feb. 132(3): 397-409.

Wang S, Cai G. "Clinical study of multi-drug resistance gene (MDR1) expression in primary ovarian cancer." *J Tongji Med Univ* 1998. 18(1): 58-60.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment." *Cell* 1993 Apr. 73(2): 309-19.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. "Targeting adenovirus." *Gene Ther* 2000 Jan. 7(2): 110-4.

Wimberger P, Wehling M, Lehmann N, Kimmig R, Schmalfeldt B, Burges A, Harter P, Pfisterer J, du Bois A. "Influence of residual tumor on outcome in ovarian cancer patients with FIGO stage IV disease : an exploratory analysis of the AGO-OVAR (Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group)." *Ann Surg Oncol* 2010 Jun. 17(6): 1642-8

Wimberger P, Lehmann N, Kimmig R, Burges A, Meier W, Du Bois A. "Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR)." *Gynecol Oncol* 2007 Jul. 106(1): 69-74.

Wolf JK, Bodurka D, Gano JB, Deavers M, Ramondetta L, Ramirez PT, Levenback C, Gershenson DM. "A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 2004 Aug. 94(2): 442-8.

Wong HH, Lemoine N, Wang Y. "Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles." *Viruses* 2010 Jan. 2(1): 78-106.

Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. "Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration." *Hum Gene Ther* 1997 Jan. 8(1): 37-44.

Xia ZJ, Chang J, Zhang L, Jiang WQ, Guan ZZ, Liu JW, Zhang Y, Hu XH, Wu GH, Wang HQ, Chen ZC, Chen JC, Zhou QH, Lu JW, Fan QX, Huang JJ, Zheng X. "Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus." *Ai Zheng* 2004 Dec. 23(12): 1666-70

Xu Z, Tian J, Smith JS, Byrnes AP. "Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement." *J Virol* 2008 Dec. 82(23): 11705-13.

Yoon AR, Kim J, Lee YS, Kim H, Yoo JY, Sohn JH, Park BW, Yun CO. "Markedly enhanced cytolysis by E1B-19kD-deleted oncolytic adenovirus in combination with cisplatin." *Hum Gene Ther* 2006 Apr. 17(4): 379-90.

Yoshikawa M, Ito A, Ishikawa T, Ikegami Y. "[Drug resistance mediated by ABC transporters." *Gan To Kagaku Ryoho* 2004 Jan. 31(1): 1-6.

Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, Nguyen N, Amin P, Oh J, Henderson DR. "Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel." *Cancer Res* 2001 Jan. 61(2): 517-25.

Yu W, Fang H. "Clinical trials with oncolytic adenovirus in China." *Curr Cancer Drug Targets* 2007 Mar. 7(2): 141-8.

Zang RY, Shi D, Lu HJ, Cai SM, Lu DR, Zhang YJ, Qin HL. "Adenovirus 5 E1a-mediated gene therapy for human ovarian cancer cells in vitro and in vivo." *Int J Gynecol Cancer* 2001 Jan-Feb. 11(1): 18-23.

Zhang J, Wei F, Wang H, Qiu W, Li H, Ren P, Chen X, Huang Q. "Potent anti-tumor activity of telomerase-dependent and HSV-1TK armed oncolytic adenovirus for non-small cell lung cancer in vitro and in vivo." *J Exp Clin Cancer Res* 2010 May. 29(1):52.

Zhou, S. "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition." *Xenobiotica* 2008 Jul. 38(7-8): 802-32.

Zhu ZB, Lu B, Park M, Makhija SK, Numnum TM, Kendrick JE, Wang M, Tsuruta Y, Fisher P, Alvarez RD, Zhou F, Siegal GP, Wu H, Curiel DT. (2008 Jun).

7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
Ad	Adenovirus
Ad3	Adenovirus des Serotyp 3
Ad5	Adenovirus des Serotyp 5
Ad5/3	Fiberchimäre aus Ad5 Fiber (tail, shaft) und Ad3 Fiber (knob)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CMV	immediate early Promotor des Cytomegalievirus
Cox2	Cyclooxygenase 2
CRAd	konditional replizierendes Adenovirus
CXCR4	chemokine receptor 4
d.h.	das heißt
DMEM	Dubecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
E1A	adeonvirales <i>immediat early</i> E1-Gen
E4	Adeonvirales early E4-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
evt.	eventuell
FCS	fötales Kälberserum

FIGO	International Federation of Obstetrics and Gynecology
H	Stunde
HE	Hämosin Emalaun
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenös
ICH	Immunhistochemie
ITR	inverted terminal repeats
Kbp	Kilobasenpaare
Luc	Luziferase
MDR	multiple drug resistance gen 1
MDR1	multiple drug resistance gen 1
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
MSLN	Mesothelinpromotor
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pk7	Poly- Lysin(7x)
Rb	Retinoblastom
RGD-4C	Arginin-Glycin-Aparginensäure Sequenz

rpm	rounds per minute
s	Sekunde
s.c	subcutan
s.u.	siehe unten
SCID	Severe Combined Immune Deficiency
SLPI	secretory leukoprotease inhibitor
t	Zeit
Taq	Taq-Polymerase
TSP	Tumorspezifischer Promotor
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
VP	Viruspartikel
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
μm	Mikrometer
BRCA1	Breast Cancer-1 Gen
BRCA2	Breast Cancer-2 Gen
HNPCC	Hereditätes non-polypöses Kolonkarzinom
cm	Zentimeter
Tab.	Tabelle
p-Gp	p- Glykoprotein
mM	Millimol

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Janni möchte ich zunächst herzlich für die Möglichkeit danken, dass ich meine experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde durchführen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz.Dr. Daniel Rein für die Auswahl und Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung meiner Arbeit sowie die aufgebrachte Geduld und stete Hilfsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. D. Niederacher aus dem Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine freundliche Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge danken.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. S.E. Baldus aus dem Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf für die unterstützende Beurteilung der HE- Schnitte und den gedanklichen Austausch sowie für seine Bereitschaft das Korefferat zu übernehmen.

Ich danke Herrn Prof. Curiel, Dr. A. Kanerva und Dr.I. Hermann für die Bereitstellung der Adeonoviren.

Desweiteren möchte ich Ellen und Dagmar aus dem Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik für ihre besondere Hilfsbereitschaft und zahlreichen Tips danken.

Außerdem möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistentinnen Frau U. Grolik und Frau U. Löhrmann für Ihre Hilfe insbesondere bei der Anfertigung der H&E- und immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön an Levent der mich während der letzten Jahre nicht nur persönlich sondern auch fachlich immer unterstützt hat und somit zum Fertigstellen dieser Arbeit erheblich beigetragen hat.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, die meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht hat und die mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keinem anderen Institut eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 30.09.2010

Anca Dragoi

10. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Dragoi
Vorname: Anca
Geburtsdatum-/ort: 28.07.1983, Bukarest
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1990-1994 Grundschule Holthausenstraße, Wuppertal
1994-2003 Gymnasium an der Siegesstrasse, Wuppertal
Abschluss Abitur

Universitäre Ausbildung

10/2003-05/2010 Medizinstudium an der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf
Hammerexamen Frühjahr 2010

Berufliche Weiterbildung

06/2010 Erteilung der Approbation als Ärztin
Ab 1.10.2010 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Florance- Nightingale Krankenhaus, Düsseldorf