

Aus der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. G. Bender

**ADENOVIRAL VERMITTELTE ANTIANGIOGENETISCHE GENTHERAPIE
DES FORTGESCHRITTENEN OVARIALKARZINOMS UND MALIGNEN
ASZITES**

Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach
Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Vorgelegt der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

von
Monika Hampf

2003

| | | |
|------------|--|-----------|
| A | INHALTSVERZEICHNIS | 2 |
| B | ABKÜRZUNGEN | 6 |
| 1. | EINLEITUNG | 11 |
| 1.1 | Das fortgeschrittene Ovarialkarzinom | 11 |
| 1.2 | Entstehung des malignen Aszites | 12 |
| 1.3 | Mechanismus der Neoangiogenese | 13 |
| 1.4 | Rolle der Neoangiogenese in der Tumorigenese und Rationale für eine antiangiogenetische Therapie | 15 |
| 1.5 | Geneherapie zur Expression antiangiogenetischer Substanzen | 19 |
| 1.6 | Wissenschaftliche Fragestellungen | 21 |
| 2. | MATERIAL und METHODEN | 25 |
| 2.1 | Klonierung der viralen Vektoren mit dem pAdEasy System - Allgemeine Methoden | |
| 2.1.1 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 26 |
| 2.1.2 | Agarosegelelektrophorese | 27 |
| 2.1.3 | Isolierung von DNA aus Agarosegelen | 28 |
| 2.1.4 | Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonucleasen | 28 |
| 2.1.5 | Ligation von DNA | 29 |
| 2.1.6 | Dephosphorylierung von DNA | 29 |
| 2.1.7 | Phenol/Chloroform Extraktion und DNA Präzipitation | 29 |
| 2.1.8 | Elektroporation von DNA in Bakterien | 30 |
| 2.1.9 | Isolierung von Plasmid DNA (Miniprep) | 30 |
| 2.1.10 | Isolierung von Plasmid DNA (Maxiprep) | 30 |
| 2.1.11 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 31 |
| 2.2 | Amplifikation der therapeutischen Gene | 31 |
| 2.2.1 | Endostatin | 31 |
| 2.2.2 | PF4 | 33 |
| 2.2.3 | Angiostatin | 34 |
| 2.2.4 | Angiostatin/Endostatin Fusionsprotein | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3 | TOPO Vektor Klonierung | 35 |
| 2.4 | Klonierung der therapeutischen Gene in den adenoviralen Transfer Vektor pTrackCMV des pAdEasy Systems | 37 |
| 2.5 | Homologe Rekombination in Bakterien | 41 |
| 2.6 | Transfektion der rekombinanten pAdEasy Plasmide in 293 Zellen | 42 |
| 2.6.1 | Zellkultur | 42 |
| 2.6.2 | Calcium-Phosphat Transfektion und Zellasservierung | 42 |
| 2.6.3 | Virusisolierung mittels doppelter Cesiumchloridgradienten-ultrazentrifugation | 43 |
| 2.6.4 | Bestimmung des Virustiters | 44 |
| 2.7 | Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse | 45 |
| 2.8 | In vitro Funktionsteste zum Nachweis der antiangiogenetischen Wirksamkeit der expremierten Gene | 46 |
| 2.8.1 | Zelllinien und Zellkultur | 46 |
| 2.8.2 | Proliferationstest (BrdU) | 49 |
| 2.8.3 | MTT Test | 49 |
| 2.8.4 | Migrationsassay | 50 |
| 2.8.5 | In situ Apoptose Zelldetektionstest (Apoptag) | 51 |
| 2.8.6 | Nachweis von VEGF/bFGF im Zellkulturüberstand und Aszites (ELISA) | 52 |
| 2.8.7 | Nachweis der VEGF RNA Expression (Northern Blot) | 53 |
| 2.8.8 | Immunhistochemie/Fluoreszenzmarkierung | 53 |
| 2.8.8.1 | Faktor VIII Anfärbung | 53 |
| 2.8.8.2 | Apoptosenachweis im Gewebe | 54 |
| 2.8.8.3 | TRITC Markierung von rekombinantem PF4 Protein | 54 |
| 2.9 | Tierversuche | 55 |
| 2.9.1 | Vorversuche zur Etablierung der Tumormodelle | 55 |
| 2.9.2 | Untersuchungen zur Verteilung der viralen Vektoren und Proteinexpression in vivo | 56 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.9.3 | Technik der Inokulation der Tumorzellen und adenoviralen Vektoren | 56 |
| 2.9.4 | Modelle zur Gentherapie des malignen Aszites mit antiangiogenetischen viralen Vektoren | 57 |
| 2.9.5 | Tierversuche zur Asservierung von Gewebe für immunhistochemische Färbungen | 59 |
| 2.10 | Statistik | 59 |
| 3. | ERGEBNISSE | 61 |
| 3.1 | Vektor vermittelte Expression und Sekretion der antiangiogenetischen Proteine in vitro | 61 |
| 3.2 | Biologische Aktivität der expremierten antiangiogenetischen Proteine in vitro | 63 |
| 3.2.1 | Hemmung der Proliferation von Endothelzellen | 64 |
| 3.2.2 | Migrationshemmung von Endothelzellen | 65 |
| 3.2.3 | Einfluss auf die Vitalität von Endothelzellen (MTT) | 67 |
| 3.3 | Beeinflussung der VEGF Expression in vitro und in vivo | 69 |
| 3.4 | Verteilung, Transduktionseffizienz und Transgenexpression nach intraperitonealer Applikation von Adenoviren | 74 |
| 3.5 | Adenoviral vermittelte antiangiogenetische Gentherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und malignen Aszites im Tiermodell | 75 |
| 3.5.1 | Ergebnisse der Langzeitüberlebensstudien | 75 |
| 3.5.2 | Klinische Beobachtungen und Ergebnisse der Autopsien | 78 |
| 3.5.3 | Einfluss der Aszitesmenge auf das Gesamtüberleben | 82 |
| 3.5.4 | Vergleich der Effektivität der unterschiedlichen Behandlungsschemata | 82 |
| 3.6 | Beeinflussung der Blutgefäßdichte und Apoptose in vivo | 84 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4. | DISKUSSION | 87 |
| 4.1 | Rationale für die Durchführung einer antiangiogenetischen Gentherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms mit Aszites | 87 |
| 4.2 | Biologische Aktivität der expremierten antiangio- genetischen Proteine in vitro | 90 |
| 4.3 | Verteilung, Transduktionseffizienz und Transgenexpression nach i.p. Virusinjektion | 91 |
| 4.4 | Effektivität der adenoviral vermittelten Gentherapie bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mit malignem Aszites in Tiermodellen | 91 |
| 4.5 | Beeinflussung der VEGF Expression durch die antiangio- genetische Gentherapie | 95 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK | 99 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 103 |
| 7. | DANKSAGUNGEN | 120 |

B ABKÜRZUNGEN

| | |
|-----------------|---|
| A | Adenosin |
| AAV | adeno-associated virus |
| Abb. | Abbildungen |
| aFGF | acid fibroblast growth factor |
| AK | Antikörper |
| Amp | Ampicillin |
| Ang 1, 2 | Angiopoietin 1 oder 2 |
| Angio | Angiostatin |
| ANOVA | Varianzanalyse |
| ANCOVA | Kovarianzanalyse |
| AT | annealing temperature |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| bp | Basenpaar |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| BrdU | 5-bromo-2 deoxyuridin |
| bzw. | beziehungsweise |
| β-Gal | β-Galactosidase |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| CA | Kalifornien |
| CAR | coxsackie adenoviral receptor |
| cDNA | zur mRNA komplementäre DNA |
| CIP | calf intestine phosphatase |
| cm | Zentimeter |
| CM | konditioniertes Medium |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CPAE | cow pulmonary artery endothelial cell |
| CsCl | Cesiumchlorid |
| DAB | 3',3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |

| | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Dulbeccos modified Eagle Medium |
| DMSO | N,N-Dimethyl Sulfoxide |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| d'NTP | 2'-Deoxynucleosid-5'-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| d'UTP | Desoxyuridintriphosphat |
| E1 | early region 1 |
| E3 | early region 3 |
| EC | endothelial cell |
| ECGF | endothelial cell growth factor |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| E.coli | Eschericia coli |
| EDTA | EthyleneDiamine Tetraacetic Acid |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| Endo | Endostatin |
| et. al. | und andere |
| FBS | fetal bovine serum |
| FITC | fluorescein isothiocyanat |
| FLK | kinase insert domain receptor |
| Flt-1 | fms-like tyrosine kinase |
| g | Gramm |
| G | Guanosin |
| GFP | green fluorescent protein |
| ggf | gegebenenfalls |
| GTE | Glucose Tris EDTA Lösung |
| GTU | gene transfer unit |
| h; hrs | hour(s) |
| HA | Hämagglutinin |
| HBSS | Hanks balanced salt solution |
| HIV | human immundeficiency virus |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPF | high power field |

| | |
|--------------|---------------------------------|
| HUVEC | human umbilical vein cell |
| HWZ | Halbwertszeit |
| IL | Illinois |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| INF- β | Interferon β |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| Kan | Kanamycin |
| Kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| KDR-1 | Kinase insert domain Receptor 1 |
| KOAc | Potassium Acetat |
| KV | Kilovolt |
| LacZ | β -Galactosidase |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani (broth) |
| log | Logarithmus |
| M | Molar |
| m | Meter |
| m | Milli |
| MA | Massachusetts |
| MCS | multiple cloning site |
| MD | Maryland |
| MgCl | Magnesiumchlorid |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| min | Minuten |
| MOI | multiplicity of infection |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| μ | micro |
| μ g | Microgramm |
| μ l | Microliter |
| NaCl | Natriumchlorid |

| | |
|------|---|
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NEB | New England BioLabs |
| NIH | National Institutes of Health |
| NP40 | Nonidet P40 |
| O.D. | optische Dichte |
| p | Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese gilt |
| pg | picogramm |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PEDF | pigment epithelium derived factor |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PF4 | Plättchenfaktor 4 |
| PFU | plaque forming units |
| PI | Propidium Iodide |
| PLG | placental growth factor |
| PMSF | phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PVDF | Polyvinyliden-Difluorid |
| rev | reverse |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| sec | Sekunde |
| sig | Signal-Peptid |
| T | Thymidin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TBE | Tris Borat EDTA |
| TBS | Tris buffered saline |
| TE | Tris-EDTA buffer |
| TGF | transforming growth factor |
| TIMP | tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases |

| | |
|----------|--|
| TNF | tumor necrosis factor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tris HCL | Tris Salzsäure |
| TSP | thrombospondin |
| TUNEL | terminal deoxynucleotidyltransferase(TdT)mediated dUTP nick end labeling |
| U | unit |
| u.a. | unter anderem |
| UV | ultraviolett |
| u-PA | urokinase-type plasminogen activator |
| V | Volt |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | vascular endothelial growth factor receptor |
| VP | viral particle |
| VPF | vascular permeability factor |
| W | Watt |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-Galactopyranoside |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

1 EINLEITUNG

1.1 Das fortgeschrittene Ovarialkarzinoms

Die hohe Letalität macht das Ovarialkarzinom zu der führenden Todesursache bei den Krebserkrankungen des weiblichen Genitale in den USA und Europa. Pro Jahr werden in Deutschland ca. 8.000 Neuerkrankungen gezählt, in den westlichen Ländern wird eine von 70-90 Frauen am Ovarialkarzinom erkranken. Durch das Fehlen früher Symptome und die Unzulänglichkeit der Screening- und Früherkennungsuntersuchungen werden 70% der Ovarialkarzinomfälle in einem fortgeschrittenen Stadium (Stadium II und höher) erstdiagnostiziert, was zur Folge hat, dass die Erkrankung eine Todesrate von ca. 50% aufweist. Trotz enormer Anstrengungen auf dem Gebiet der operativen Interventionen und konventionellen Chemotherapie, hat sich das Gesamtüberleben in den letzten Jahren nur unwesentlich verbessern lassen, so dass die Prognose für Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium mit einer Langzeitüberlebensrate von nur ca. 30% schlecht bleibt.

Zum Zeitpunkt der Diagnose hat sich der Tumor bei einem Großteil der Patientinnen bereits intraabdominell ausgebreitet mit Metastasen im Bereich des Peritoneums, der peritonealen Oberflächen der intraabdominellen Organe wie Darm, Leber, Diaphragma und Omentum majus. Diese Läsionen prädisponieren und induzieren die Entstehung von Aszites, eine die Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium sehr belastende Begleiterscheinung des Ovarialkarzinoms. Spannungsschmerzen, Dyspnoe, Anorexie und meist starke Beeinträchtigung der Lebensqualität sind Folgen des Aszites. Die bislang bei rezidivierendem Aszites zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen mit wiederholten Punktionen oder intraperitonealer Applikation von Chemotherapie oder Supramycin sind wenig erfolgversprechend und die Palliation meist nur von kurzer Dauer.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms mit malignem Aszites dringend vonnöten sind.

1.2 Entstehung des malignen Aszites

Mehrere Mechanismen spielen bei der Entstehung des malignen Aszites eine entscheidende Rolle:

- Einer der Hauptursachen für die Aszitesbildung bei intraperitoneal ausgebreiteten malignen Tumoren ist die vermehrte Gefäßdurchlässigkeit der im Peritoneum befindlichen Mikrogefäße (Hirabayashi *et al.*, 1970; Senger *et al.*, 1983; Garrison *et al.*, 1986; Garrison *et al.*, 1987)
- Beeinträchtigung und Reduktion des Lymphdrainagesystems, bedingt durch die Obstruktion der abführenden Lymphgefäße durch intraabdominelle, intrahepatische und diaphragmale Tumore (Feldman *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2001)
- Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass die tumorbedingte Neoangiogenese bei der Entstehung von Aszites eine entscheidende Rolle spielt. Diese Erkenntnisse basieren auf der Tatsache, dass eine ausgeprägte Zunahme der Gefäßdichte im Peritoneum die Entstehung von intraabdominell metastasierenden Tumoren begleitet und dass Angiogenese-Inhibitoren die Aszitesbildung durch Hemmung der Neoangiogenese verringern können (Heuser *et al.*, 1984; Nagy *et al.*, 1995; Mesiano *et al.*, 1998)

Eine Reihe von Faktoren spielen bei der Induktion der Hyperpermeabilität von Mikrogefäßen im Zusammenhang mit malignen Tumoren in vivo eine Rolle. Dazu gehören inflammatorische Substanzen wie z.B. Prostaglandine (Sykes, 1970), Leukotriene (Greenbaum *et al.*, 1975), Bradykinin (Maeda *et al.*, 1988), Histamin (White *et al.*, 1988), sowie eine Reihe von Cytokinen wie z.B. TNF, IL-2 (Ettinghausen *et al.*, 1988), TGF (Ohmura *et al.*, 1990) und VEGF (Nagy *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1998; Mesiano *et al.*, 1998; Yoneda *et al.*, 1998; Shibuya *et al.*, 1999). Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) ist ein Cytokin, das spezifisch die Wanderung und Proliferation von Endothelzellen fördert, und eine herausragende Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Neoangiogenese spielt (Connolly *et al.*, 1989; Keck *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989; Ferrara *et al.*, 1992). Weiterhin war VEGF, primär auch VPF –vascular permeability factor- genannt, ursprünglich als sehr potentes, von Tumorzellen sezerniertes Protein identifiziert worden, welches die Extravasation von

Eiweißen aus tumorassoziierten Gefäßen fördert (Senger *et al.*, 1983; Garrison *et al.*, 1986). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Überexpression von VEGF in malignen Tumoren, die mit Peritonealkarzinose vergesellschaftet sind, zu einer tumorinduzierten Neoangiogenese im Tumor und der begleitenden Peritonealkarzinose führt, sowie einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäße im Peritoneum, gefolgt von Aszitesbildung (Nagy *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Somit spielt das von den Tumorzellen sezernierte VEGF bei der Aszitesbildung in zweifacher Hinsicht eine entscheidende Rolle: zum einen indirekt, indem es über Stimulation der Angiogenese das Tumorwachstum fördert und zum anderen direkt über eine Steigerung der Gefäßpermeabilität der peritonealen Mikrogefäße.

1.3 Mechanismus der Neoangiogenese

Wenn man von Blutgefäßneubildung spricht muss man zwischen *Vaskulogenese* und *Angiogenese* unterscheiden. Vaskulogenese ist die Neubildung von Gefäßen über eine de novo Differenzierung von Endothelzellen aus mesodermalen Vorläuferzellen. Vaskulogenese findet nur in den frühesten Phasen der Embryonalentwicklung statt.

Angiogenese dagegen ist die Neubildung von Gefäßen aus bereits existierenden. Angiogenese findet in den späteren Phasen der Embryonalentwicklung statt und auch im erwachsenen Organismus während des weiblichen Zyklus, Schwangerschaft, Wundheilung, einer Reihe von pathologischen Prozessen (Retinopathie, Psoriasis, Arthritis, ischämische Kardiomyopathie) und während der Tumorigenese und Metastasierung. Der Prozess der Angiogenese verläuft in mehreren Schritten:

- Vasodilatation, Zunahme der Endothelpermeabilität, Degradierung der extrazellulären Matrix: nach Initiieren der Neoangiogenese durch die Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren kommt es zunächst zur Vasodilatation, Zunahme der Gefäßwandpermeabilität als Antwort auf VEGF mit Extravasation von Plasmaproteinen, um ein Gerüst für das Wandern der Endothelzellen (EC) aufzubauen. Gleichzeitig wird die extrazelluläre Matrix durch verstärkte Expression von Proteinasen (MMP,

u-PA, Heparanasen) degradiert, um die Proliferation und Migration von ECs zu ermöglichen.

- Sobald der "Wanderweg" vorbereitet ist, wandern die proliferierenden ECs in die Peripherie. Multiple Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren spielen bei der Aktivierung dieses Schrittes eine Rolle, allen voran die VEGF Familie (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D) und ihre Tyrosin Kinase Rezeptoren FLK-1 (fetal liver kinase 1)/KDR (kinase insert domaine receptor) und flt-1 (fms-like tyrosine kinase), bFGF (basic fibroblast growth factor), PLG (placental growth factor), Angiopoeitin 1 und 2 (Ang 1, 2), Tie2, PDGF (platelet-derived growth factor), $\alpha_v\beta_3$ Integrin sowie multiple weitere Chemokine und Hormone (siehe Übersichtsartikel: Carmeliet, 2000). Der Prozess des Sprießens der Gefäße wird kontrolliert durch das Gleichgewicht zwischen diesen proangiogenetischen Faktoren und natürlich vorkommenden Inhibitoren, die häufig Spaltprodukte von Gerinnungsfaktoren darstellen. Dazu gehören Angiostatin, Endostatin, Antithrombin III, INF β , PF4 und andere.
- Die gewanderten Endothelzellen versammeln sich primär am Ort der Gefäßneuentstehung als solider Strang, der sekundär ein Lumen erhält. Erneut spielen VEGF, Ang 1 und Integrine eine entscheidende Rolle bei der Lumentstehung und Verlängerung der Gefäße. Das „Remodeling“ und Anordnen der neugebildeten Gefäße in ein geordnetes Netzwerk scheint vornehmlich von entfernten VEGF Isoformen und VEGFR3 geregelt zu werden.
- Im letzten Schritt werden die neugebildeten Gefäße stabilisiert durch Rekrutieren von glatten Muskelzellen und Perizyten und die extrazelluläre Matrix wird wieder aufgebaut und verfestigt. Dies geschieht u.a. unter der "Anleitung" von Ang 1/Tie2, TGF β , Endoglin und Smad 5.

Der Prozess der Angiogenese ist bildlich in Abb. 1 dargestellt. Wie man diesem Schema entnehmen kann, gibt es mehrere Ansatzpunkte, an denen man mit einer antiangiogenetischen Therapie diesen komplexen Prozess unterbrechen kann.

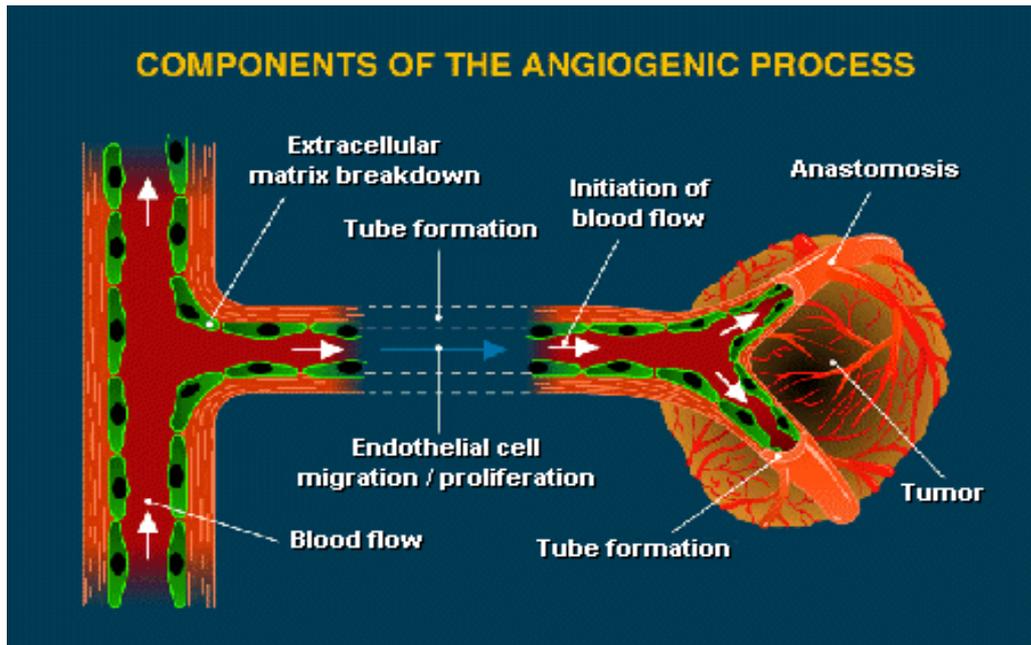


Abb.1: Schematische Darstellung des Prozesses der Gefäßneubildung im Rahmen der Tumorigenese

1.4 Rolle der Neoangiogenese in der Tumorigenese und Rationale für eine antiangiogenetische Tumorthherapie

Die heute allgemein anerkannte herausragende Rolle der Angiogenese in der Entstehung und Ausbreitung maligner Tumore beruht auf der Entdeckung im Labor von Judah Folkman an der Harvard Medical School in Boston im Jahre 1961, dass Tumore klein und harmlos bleiben (Durchmesser von 1-2 mm), wenn das Gefäßwachstum nicht aktiviert wird. Diese "Dormancy" der Mikrotumore beruht auf einem Gleichgewicht zwischen den vom Tumor produzierten Angiogeneseaktivatoren, wie z.B. VEGF (Ferrara *et al.*, 1989), aFGF (Maciag *et al.*, 1984), bFGF (Shing *et al.*, 1984), Angiogenin (Fett *et al.*, 1985) u.a. und den natürlich vorkommenden Angiogenese-Inhibitoren wie Thrombospondin (TSP) (Rastinejad *et al.*, 1989), Interferon (Sidky *et al.*, 1987), Angiostatin oder Endostatin (O'Reilly *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1997). Wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Aktivatoren verschoben, kann der Tumor die Neubildung von Gefäßen initiieren (s. Prozess der Neoangiogenese in 1.3), Sauerstoff und Nährstoffe akquirieren und sein Wachstum beginnen.

Diese Erkenntnisse führten zur Initiierung der Antiangiogenesetherapie in der Behandlung maligner Tumore. Eine antiangiogenetische Therapie kann theoretisch an verschiedenen Stellen in den komplexen Prozess der Neoangiogenese eingreifen (s. Abb.1):

- Hemmung der die extrazelluläre Matrix verdauenden Proteinase: Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen TIMP (Moses *et al.*, 1990; Takigawa *et al.*, 1990; Wojtowicz-Praga *et al.*, 1997; Valente *et al.*, 1998), Inhibitoren des u-PA Rezeptors (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000) und PEX (Brooks *et al.*, 1998), ein natürlich vorkommendes Fragment des MMP2, das die Bindung von MMP2 an $\alpha_v\beta_3$ Intergrin blockiert. Weitere synthetische Substanzen sind Batismastat, Marimastat, MM1270, AG334, die z.T. bereits in der Klinik eingesetzt werden (siehe Übersichtsartikel: (Eatock *et al.*, 2000)).
- Hemmung der von den Tumoren sezernierten proangiogenetischen Faktoren wie z.B. bFGF oder VEGF durch anti-bFGF bzw. anti-VEGF Antikörper (Hori *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1993; Borgstrom *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1996; Ke *et al.*, 1996; Mesiano *et al.*, 1998; Im *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Vitaliti *et al.*, 2000). Thalidomid, eine Substanz, die in den 50-er Jahren zur Antiemese und als Sedativa bei Schwangeren eingesetzt wurde und zu schweren Gliedmaßenmissbildungen bei den Neugeborenen führte, gehört ebenso in diese Substanzklasse, da es die bFGF induzierte Endothelzellproliferation inhibiert (D'Amato *et al.*, 1994). Der Nachteil dieser Strategie liegt in dem Risiko einer Resistenzentwicklung, weil davon auszugehen ist, dass die Tumore alternative Wachstumsfaktoren vermehrt exprimieren werden.
- Eine weitere Strategie stellt die Unterbrechung der spezifischen Signaltransduktionswege dar, die von den proangiogenetischen Faktoren VEGF und Angiopoetin benutzt werden. Angriffspunkte stellen dabei die VEGF spezifischen Rezeptor Tyrosin Kinasen Flk-1/KDR (Matthews *et al.*, 1991; Terman *et al.*, 1992) und flt-1 Rezeptor (Shibuya *et al.*, 1990), sowie der Tie 2/Tek Rezeptor (Dumont *et al.*, 1993; Iwama *et al.*, 1993) dar, die z.B. durch dominant negative Konstrukte (Millauer *et al.*, 1994; Goldman *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998), monoklonale Antikörper (Kong *et al.*, 1998;

Mesiano *et al.*, 1998; Prewett *et al.*, 1999) oder synthetische Moleküle (Fong *et al.*, 1999) inhibiert werden können. Diese Strategie greift direkt an den Tumorgefäßen an (nur dort werden diese Rezeptoren exprimiert) und muss somit nicht jede Tumorzelle erreichen.

- Während obige Strategien in die Signaltransduktion eingreifen, kann durch die Applikation von antiangiogenetischen Molekülen das Gleichgewicht in der Umgebung des Tumors zugunsten der Angiogenese-Inhibitoren verschoben werden. Diese Behandlungsstrategien hat zur Entdeckung einer ganzen Reihe von natürlich vorkommenden und künstlich hergestellten Proteinen mit antiangiogenetischen Eigenschaften geführt (siehe Tabelle 1). Diese Gruppe von Molekülen greift direkt an den EC an, behindert deren Proliferation und Migration und treibt diese Zellen selektiv in die Apoptose.

| Substanzgruppe | Substanzen |
|--------------------------|---|
| Proteolytische Fragmente | Angiostatin, Endostatin, Antithrombinfragment, Vasostatin, PEX, Prolaktin, Arrestin, Canstatin, Restin, Prothrombin kringle-2, Fibronectin Fragmente ect. |
| Interleukine | IL 1, 4, 10, 12, 18 |
| Interferone | INF α , β , |
| TIMP | TIMP 1, 2, 3 |
| Andere Moleküle | Angiopoeitin 2, PF4, TSP, 2-Methoxyestradiol, Retinolsäure, p53, p16, Maspin, PEDF, Protamin, lösl. FGF Rezeptor, Vitamin D ₃ ect. |

Tabelle 1: Endogene Inhibitoren der Angiogenese

Bis dato sind eine ganze Reihe dieser Proteine mit antiangiogenetischen Eigenschaften in der Prüfung in Phase II und III klinischen Studien. Auf der WebSite des NIH ist eine Liste der "Antiangiogenesis Inhibitors in Clinical Trials" einzusehen (<http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio/table.html>), eine gute Zusammenfassung findet sich in dem Review von A.L. Harris im British

Journal of Hematology aus dem Jahr 2000 (Talks *et al.*, 2000). Die Vor- und Nachteile der Antiangiogenesetherapie sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Vorteil | Nachteil |
|---|--|
| Solide Tumore sind abhängig von Angiogenese | Gabe auf Dauer erforderlich |
| Keine Toxizität | Probleme bei der Herstellung wegen Instabilität und den hohen erforderlichen Dosen |
| Keine Resistenzentwicklung | Ökonomische Überlegungen wegen Dauertherapie mit rekombinanten biologisch aktiven Substanzen |
| Gleiches Target (Gefäßneubildung) in verschiedensten Tumorentitäten | Suboptimaler Effekt bei Bolusgabe durch kurze Peaks bei kurzer HWZ der Substanzen |
| | Risiko der Beeinträchtigung der physiologischen Neoangiogenese |

Tabelle 2: Vor- und Nachteile einer antiangiogenetischen Therapie.

Die systemische Verabreichung dieser Substanzen bringt eine Reihe von schwer zu lösenden, praktischen Problemen mit sich, die die rasche Einführung der antiangiogenetischen Therapie maligner Tumore in der breiten Praxis bisher behindert haben. Die Herstellung dieser rekombinanten Proteine in großen Mengen in biologisch aktiver Form stellt die Industrie vor große Probleme (Instabilität, sehr aufwendige Fabrikation, Lagerung); die Proteine haben bei systemischer Applikation in vivo nur eine kurze Halbwertszeit und, da die antiangiogenetische Therapie eine angiostatische Therapie darstellt, müssen die Medikamente zumindestens langfristig intermittierend oder gar lebenslang kontinuierlich verabreicht werden - eine Therapie, die das Budget der Krankenkassen und die Compliance der Patientinnen stark belastet. Alternative Verabreichungsformen stellen daher ein interessantes Forschungsgebiet dar.

1.5 Genterapie zur Expression antiangiogenetischer Substanzen in vivo

Die Applikation von Genen, die der Synthese der antiangiogenetischen Substanzen im Organismus dienen und gegebenenfalls deren Produktion für eine gewisse Dauer aufrechterhalten, scheint aus den oben erläuterten Gründen eine erfolgversprechende, alternative Induktionsform für antiangiogenetische Substanzen darzustellen, v.a. in der Behandlung von Tumoren, welche ihr Wachstum auf ein gut erreichbares Kompartiment beschränken. Solche abgeschlossene Kompartimente stellen z.B. das zentrale Nervensystem, die Pleurahöhle und die Bauchhöhle beim metastasierenden Ovarialkarzinom dar. Durch die Applikation der die antiangiogenetischen Substanzen exprimierenden Gene in die Bauchhöhle werden sowohl Tumorzellen als auch Normalzellen transduziert, die daraufhin das Transgen kontinuierlich über einen längeren Zeitraum exprimieren, so dass eine hohe Konzentration antiangiogenetischer Substanzen lokal am Ort des Tumorwachstums erzeugt wird.

Die Genterapie, d.h. die Behandlung oder Vermeidung einer Erkrankung durch Gentransfer, stellt eine erfolgversprechende Therapieform dar, da sie auf die zugrundeliegenden Ursachen einer Erkrankung abzielt (z.B. Neoangiogenese), während die konventionellen Therapeutika meist die unspezifischen Spät-Phänomene behandeln. Dieses Wirkungsprinzip ist möglich, da der genterapeutische Ansatz gezielt eingesetzt werden kann und längeranhaltende Wirkungen zeigt. Weiterhin stellt die Genterapie eine sogenannte weitläufige Plattformtechnologie dar, die in vielen verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt werden kann.

Die wichtigsten, im klinischen Setting bereits eingesetzten Vektorsysteme zum Gentransfer können unterteilt werden in virale, nicht virale und physikalische Methoden, wobei letzere in vivo eine untergeordnete Rolle spielen.

Zu den nicht viralen Vektoren gehören die nackte DNA, DNA Komplexe mit kationischen Lipiden und DNA verpackt in kationische Polymere. Der Nachteil der nicht viralen Systeme ist ihre geringe Transfektionseffizienz in vivo und die nur transiente Expression der Gene. Ihr Vorteil besteht in der großen

Transgenkapazität, der fehlenden Immunogenität und der einfachen Herstellung.

Zu den klinisch relevanten viralen Vektoren gehören der Retrovirus, Adenovirus, adenoassoziierte Virus (AAV), Lentivirus und Herpesvirus. Die Vor- und Nachteile dieser viralen Vektoren sind in Tabelle 2 aufgelistet.

| Vektor | Vorteile | Nachteile |
|------------|---|--|
| Adenovirus | Hohe Transfektionseffizienz in vivo und ex vivo, Transfektion sich teilender und nicht teilender Zellen, kann in hohen Titern produziert werden, Tropismus kann modifiziert werden, schon reichlich klinische Erfahrung vorhanden | Immunogen, integriert nicht, wiederholte Gaben wegen Immunreaktion nicht effektiv, löst Entzündungsreaktionen aus, limitierte Transgenkapazität, kurze Expressionsdauer, Herstellung aufwendig. |
| Retrovirus | Gering immunogen, hohe Transfektionseffektivität ex vivo, länger anhaltende Expression, reichlich klinische Erfahrung mit ex vivo Transfektion | Infiziert nur proliferierende Zellen, geringe Transduktionseffizienz in vivo, Transgenkapazität 8-10 kb, Risiko der Insertionsmutagenese, replikationskompetent, Verpackungszelllinie erforderlich, Herstellung und Lagerung sehr schwierig, |
| AAV | Hohe Transfektionseffizienz vieler verschiedener Zelltypen in vivo, gering immunogen, stark verlängerte Transgenexpression in vivo, keine viralen Proteine | Transgenkapazität < 4.5 kb, sehr schwierig herzustellen (Verpackungszelllinie), niedrige Titer, wenig klinische Erfahrung, Risiko der Insertionsmutagenese, wiederholte Gabe durch neutralisierende Antikörper eingeschränkt |
| Lentivirus | Transfiziert proliferierende und sich nicht teilende Zellen, transfiziert hämatopoetische Stammzellen | Große Sicherheitsbedenken, da der Virus von HIV Virus abstammt, Herstellung und Lagerung sehr schwierig, bisher keine klinische Erfahrung, Transgenkapazität < 8kb |

| | | |
|------------------------|--|--|
| Poxvirus (Vaccinia) | Große Insertkapazität, ausreichend klinische Erfahrung | Stark immunogen, löst starke Entzündung aus, Effektivität?, Sicherheitsbedenken |
| Herpesvirus HSV1 | Hohe Transgenkapazität > 30 kb, hohe Transfektionseffizienz vieler verschiedener Zelltypen, hohe Transgenexpression, kann in hohen Titern hergestellt werden, wiederholte Gaben möglich, replizierende Vektoren erhältlich, Neurotropismus | Keine Erfahrung bei Patienten, Probleme mit Langzeitexpression z.B. im Gehirn, Verpackungszelllinie erforderlich |

Tabelle 3: Vorteile und Nachteile der viralen Gentransfer Vektoren (modifiziert aus A. Mountain, TIBTECH 18, March 2000, 119-128 (Mountain, 2000).

Adenoviren stellen die bislang am weitesten verbreiteten viralen Vektoren dar, da sie- wenn auch mit hohem Arbeits- und Materialaufwand- in großen Mengen mit hohem Titer relativ verlässlich synthetisiert werden können. Da sie sowohl teilende als auch sich nicht teilende Zellen infizieren, weisen Sie eine hohe Transfektionseffizienz in Tierversuchen auf und führen zur hohen Transgenexpression.

1.6 Wissenschaftliche Fragestellung

Die derzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Optionen bei der Behandlung des fortgeschrittenen, metastasierten Ovarialkarzinoms mit malignem Aszites sind unzulänglich und geben den Patientinnen nur kurzzeitig Erleichterung. Die Entwicklung neuer, palliativer Therapiestrategien sind daher angezeigt.

Bei der Entstehung des malignen Aszites spielt die VEGF induzierte Bildung neuer Blutgefäße im Peritoneum, sowie die VEGF induzierte Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände eine entscheidende Rolle. Die Hemmung der Gefäßneubildung und Beeinflussung der VEGF Expression stellen daher potentielle Angriffspunkte in der Behandlung des malignen Aszites dar.

Antiangiogenetische Substanzen stellen eine neuartige Substanzklasse von Therapeutika dar, die zumindestens in in vivo Tierversuchen und in beschränktem Maße auch in der Tumortherapie erste erfolgversprechende Ergebnisse zeigten. Da der verbreitete klinische Einsatz dieser Substanzen jedoch mit großen Problemen verbunden ist, stellt die Gentherapie einen erfolgversprechenden alternativen Ansatz zur Verabreichung dieser Substanzen dar. Das Ovarialkarzinom mit seiner meist fortgeschrittenen intraperitonealen Ausdehnung stellt als abgeschlossenes Kompartiment ein ideales Krankheitsmodell dar, um die Effektivität einer antiangiogenetischen Gentherapie zu prüfen. Dabei kann sowohl die Beeinflussung des Tumorwachstums als auch die Verhinderung der Aszitesproduktion als klinisch messbarer Parameter für die Effektivität der Therapie eingesetzt werden

Adenoviren sind die bislang am besten untersuchten viralen Vektoren und werden bereits in der klinischen Prüfung in ausgewählten Therapiestudien (z.B. adenoviral vermittelte p53 Gentherapie des Ovarialkarzinoms) eingesetzt. Bis zur Durchführung dieser Arbeit gab es keine Untersuchungen zum palliativen Einsatz von antiangiogenetischer adenoviral vermittelter Gentherapie bei malignem Aszites bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Konstruktion, Klonierung und Herstellung von vier verschiedenen adenoviralen Vektoren, die sezernierte Formen antiangiogenetischer Substanzen exprimieren (padAngio, padEndo, padPF4, padAngio/Endo), deren in vitro Funktionsprüfung und in vivo Applikation in zwei verschiedenen Tiermodellen des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms mit Aszites und eines Tiermodelles zum malignen Aszites. Dabei wurden unterschiedliche Therapieschemata, sowie Mono- und Kombinationstherapien durchgeführt. Die in vitro und in vivo Versuche sollten prüfen, ob eine antiangiogenetische Gentherapie bei malignem Aszites zu einer Verminderung der Aszitesproduktion führt, das Tumorwachstum hemmt und konsekutiv zu einem Überlebensvorteil führen würde. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, über welchen Mechanismus der therapeutische Effekt der antiangiogenetischen Substanzen ausgelöst wird.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden im Einzelnen die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

1. Konstruktion, Klonierung und Herstellung der die antiangiogenetischen Proteine exprimierenden Adenoviren

Es wurden vier E1/E3 deletierte Adenoviren, die sezernierte Form von Angiostatin, Endostatin, PF4 und eines Angiostatin/Endostatin Fusionsproteins exprimieren, konstruiert, kloniert und produziert. Als Kontrollvirus diente ein GFP exprimierender Vektor. Zur Herstellung dieser Viren wurde das pAdEasy System etabliert

2. Vektor vermittelte Expression und Sekretion der antiangiogenetischen Proteine in vitro

Zunächst wurde in Western Blot Analysen nachgewiesen, dass die konstruierten Viren die entsprechenden Proteine exprimieren und durch Analysen des Zellkulturüberstandes gezeigt, dass die Proteine aufgrund der integrierten Signalpeptide an die Umgebung abgegeben wurden.

3. Biologische Aktivität der exprimierten antiangiogenetischen Proteine in vitro

Hierbei sollten die vier exprimierten und sezernierten antiangiogenetisch wirkenden Proteine in unterschiedlichen in vitro Testverfahren auf ihre intakte biologische Funktion hin untersucht werden.

- Hemmung der Proliferation von Endothelzellen
- Migrationshemmung von Endothelzellen
- Einfluss auf die Vitalität von Endothelzellen

4. Untersuchungen zur Beeinflussung der VEGF Expression nach antiangiogenetischer Gentherapie in vitro und in vivo

Bislang gab es nur wenige, widersprüchliche Daten zur Veränderung des VEGF Spiegels nach antiangiogenetischer Gentherapie. Es sollten sowohl in in vitro Untersuchungen im Zellkulturüberstand, sowie im Aszites der tumortragenden, behandelten Mäuse die VEGF Konzentration bestimmt werden und ggf. auftretende Veränderungen auf ihre zugrundeliegenden Ursachen hin untersucht werden

5. Untersuchungen zur Verteilung, Transduktionseffizienz und Transgenexpression nach intraperitonealer Applikation von Adenoviren

Hierzu wurden tumortragende Mäuse mit einem Lac-Z exprimierenden Adenovirus i.p. injiziert und die Expression des Transgens in vivo dokumentiert.

6. Adenoviral vermittelte antiangiogenetische Gentherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und malignen Aszites im Tiermodell

Zunächst wurden Vorversuche unter Einsatz von 9 verschiedenen Tumorzelllinien zur Etablierung verlässlicher und reproduzierbarer Tiermodelle durchgeführt. Drei der am besten reproduzierbaren Modelle mit der höchsten Angehrate wurden ausgewählt und unter Einsatz von 230 Mäusen wurde im Hauptversuch die Effizienz verschiedener Therapieschemata mit Mono- und Kombinationstherapien der antiangiogenetischen Viren evaluiert.

- Ergebnisse der Langzeitüberlebensstudien
- Klinische Beobachtungen und Ergebnisse der Autopsien
- Untersuchungen zum Einfluss der Aszitesmenge auf das Überleben: Hierbei sollte in einer statistischen Analyse der in vivo Daten der Frage nachgegangen werden, ob über die Aszitesmenge eine Aussage über die Überlebenszeit der Tiere getroffen werden kann.
- Vergleich der Effektivität der unterschiedlichen Behandlungsschemata: Hier sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Kombinationstherapien den Monotherapien überlegen waren, ob Dauer und zeitliche Abfolge der Gentherapie einen Einfluss auf das Überleben hatte und ob einer der viralen Vektoren den anderen in seiner Wirkung überlegen war.

7. Einfluss der antiangiogenetischen Therapie auf die Blutgefäßdichte und Apoptose *in vivo*

Unter Asservierung von Gewebe der Tiere sollte in immunhistochemischen Färbungen mit endothelzellspezifischen Antikörpern eine Quantifizierung des antiangiogenetischen Effektes, sowie der Nachweis einer Apoptoseinduktion erfolgen.

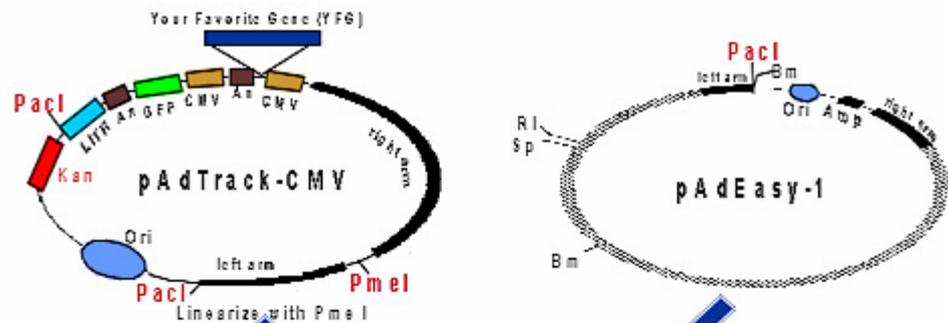
2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Klonierung der viralen Vektoren mit dem pAdEasy System -

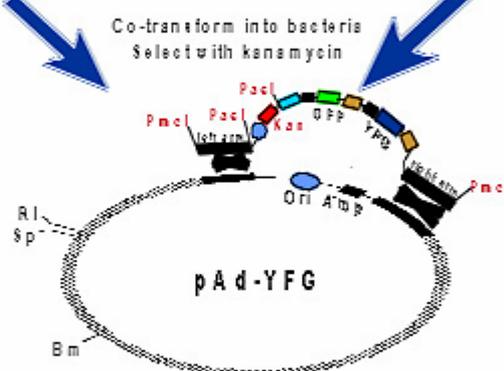
Allgemeine Methoden

Die Herstellung der die antiangiogenetischen Gene exprimierenden adenoviralen Vektoren padEndostatin, padPF4, padAngiostatin, padAngio/Endo und des Kontrollvektors padGFP wurde mit dem pAdEasy System durchgeführt, das uns freundlicherweise von B. Vogelstein, Howard Hughes Medical Institute and Molecular Genetics Laboratory, John Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD zur Verfügung gestellt wurde. Eine genaue Beschreibung des Systems ist über das Internet unter <http://www.COLONCANCER.org/adeasy/protocol.htm> abrufbar. Der Vorteil dieses Systems gegenüber der herkömmlichen Methode adenovirale Vektoren herzustellen besteht v.a. darin, dass die Rekombination zwischen dem Shuttle Vektor pTrackCMV, in den das therapeutische Gen kloniert wird, und dem adenoviralen Backbone Vektor pAdEasy nicht in mit adenoviralen Genen substituierten 293 Säugetierzellen, sondern in hochrekombinanten *E.coli* Bakterien (BJ 5183) erfolgt. Dort ist die Wahrscheinlichkeit der Rekombination deutlich höher als in 293 Zellen. Weiterhin exprimiert der Vektor GFP, so dass die Transfektions- und auch die Infektionseffizienz sehr leicht fluoreszenzmikroskopisch verfolgt und kontrolliert werden kann. Ein weiterer Vorteil des Systems besteht darin, dass sehr hohe Virustiter (bis 10^{11} – 10^{12} PFU/ml) erzielt werden können. Abb. 2 zeigt schematisch das Prinzip der Virusherstellung mit dem von He et. al. (He *et al.*, 1998) entwickelten pAdEasy System. Es handelt sich um einen Prozess, der in zwei Schritten erfolgt, indem zunächst das therapeutische Gen in die Multi Cloning Site (MCS) des Transfer Vektor kloniert und anschließend über homologe Rekombination in das adenovirale Genom (im folgenden als Backbone Vektor pAdEasy bezeichnet) transferiert wird. Die Virusproduktion umfasst die in 2.4 - 2.6 im Einzelnen beschriebenen Arbeitsschritte. Da im Rahmen der Herstellung dieser Viren ein Großteil der Methoden mehrmals eingesetzt wurden, sollen zunächst die Standardmethoden aufgelistet und beschrieben werden.

Schritt 1: Klonierung der cDNA in das Transfer Plasmid



Schritt 2: In vivo homologe Rekombination in Bakterien



Schritt 3: Virusproduktion in 293 Zellen

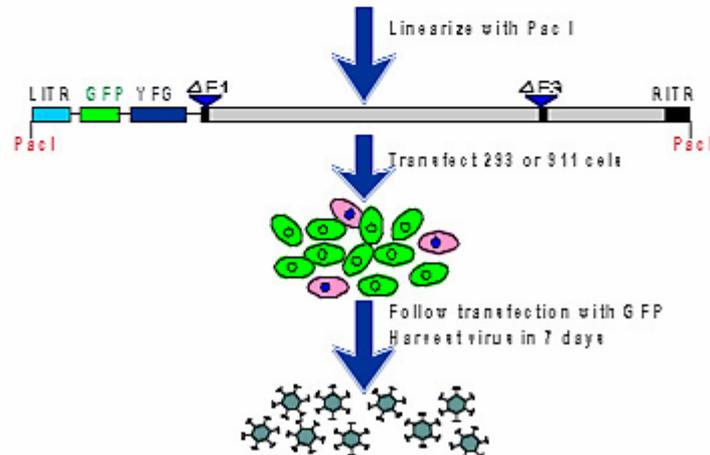


Abb.2: Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mit dem pAdEasy System (nach He *et al.*, 1998)

2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der therapeutischen Gene erfolgte über PCR. Die Zusammensetzung einer Standard 50 µl PCR Reaktion ist in Tabelle 4 aufgelistet. Die Reagentien wurden von der Firma Perkin-Elmer, Foster City, CA

bezogen, die für die einzelnen Gene konstruierten Primerpaare wurden von Gibco BRL, Grand Island, NY synthetisiert.

| | Volumen | Konzentration |
|-----------------------------------|---------|---------------|
| 50 mM MgCl ₂ Lösung | 2 µl | 2 mM |
| 10x PCR-Puffer | 5 µl | 1x |
| DNA | 1 µl | --- |
| dNTP's (50 mM) | 2 µl | 2 mM |
| Primer fw (5µM) | 2 µl | 0,2 µM |
| Primer rev (5 µM) | 2 µl | 0,2 mM |
| DEPC-behandeltes H ₂ O | 35 µl | |
| Taq Polymerase (1U/µl) | 1 µl | 1U |
| Gesamtvolumen der PCR | 50 µl | |

Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR

Der PCR Mix wurde auf Eis angesetzt und sofort nach Zufügen des Enzyms die Reaktion in einem DNA-Thermocycler (Perkin-Elmer, Foster City, CA) gestartet. Das **Standard PCR Programm** umfasste eine Denaturierung eventuell kontaminierender Proteine über 5 min auf 94°C. Anschließend wurde die erste PCR Reaktion mit den Parametern 94°C für 60 sec, 54°C für 60 sec, und 72°C für 60 sec durchgeführt. Nach 30 Reaktionszyklen mit diesen Parametern wurde die Reaktion bei 72°C für 5 min komplettiert und durch Abkühlung auf 4°C beendet.

Das **Long PCR Programm** wurde immer dann eingesetzt, wenn die Primer sehr lange Überhänge aufwiesen (z.B. ein HA Tag oder die Signal Peptide Sequenz). In diesem Falle wurden nach der Denaturierung (94°, 5 min) zunächst 2 Zyklen mit 94 ° 30 sec, 37° 60 sec, 55° 90 sec durchgeführt. Die extrem niedrige Anlagerungs- und Extensions-Temperaturen sollten es dem Enzym ermöglichen, den langen Primerüberhang mitzusynthetisieren. Anschließend folgten 28 Zyklen mit 94° 30 sec, 55° 60 sec und 72° 90 sec, gefolgt von einer final extension von 72° 10 min und einer Abkühlung auf 4 °. Bis zur Verarbeitung wurden die PCR Produkte bei -20° gelagert.

2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Visualisierung und Überprüfung der DNA Produkte (PCR Produkte, Klonierungsschritte, Restriktionsenzymverdauungen ect.) erfolgte über

horizontale Agarosegelelektrophoresen. Die Konzentration der Gele wurde nach Größe der zu erwartenden DNA Fragment zwischen 0,8 % und 1,5 % variiert. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose (1,2 g - 2,25 g Agarose, Sigma, St. Louis, MI) in 150ml TAE Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 70°C mit 7 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach Erstarren wurde die DNA, die 1:1 mit Probenpuffer (0,25 % Bromphenol, 0,25 % Xylene blue, 30 % Glycerol) verdünnt wurde, in die Geltaschen eingefüllt. Zur Feststellung der Größe wurde entweder ein 1 kb Molecular Weight Marker (500 bp - 10 kb, NEB, Beverly, MA) oder ein Lambda DNA-HINDIII Marker (2 kb – 23 kb) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100-120 Volt über ca. 60 min durchgeführt und die Banden unter einem Transluminator (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA) visualisiert, photodokumentiert und ggf. ausgeschnitten.

2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Gelelektrophorese wurden die DNA Banden mittels UV Licht sichtbar gemacht und die Banden entsprechender Größe mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Zur DNA Isolierung wurde das GeneClean Protokoll (<http://sgi.bls.umkc.edu/funnylab/protocols>) verwendet. Das Gelstück wurde in 500 µl NaI Lösung bei 55° in ca. 10 min zum Schmelzen gebracht und anschließend 5 µl Glasmilch zugegeben, an die die DNA bindet. Nach Zentrifugieren und 3-maligem Waschen des Pelletts in 500 µl New Wash Washpuffer wurde das Pellet in 20 µl H₂O aufgelöst und die DNA bei 37° in 5 min eluiert. Nach Zentrifugation (1 min , 14.000 rpm) wurde die DNA Lösung im Überstand in ein neues Tube pipettiert und war nun bereit für die Klonierung.

2.1.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Die gewünschte DNA Menge wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut. Ein Standard Mix bestand aus 2 µl Pufferlösung, die abhängig von dem Restriktionsenzym gewählt werden musste (Puffer 1, 2, 3 oder 4; NEB, Beverly, MA), der gewünschten DNA Menge (1 - 10 µg) und 0,5 µl Restriktionsendonuklease (NEB). Die Inkubation erfolgte bei der

enzymoptimierten Temperatur (meist 37°) über 1 h oder über Nacht. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden unter UV Licht visualisiert und ggf. die DNA mittels Gene Clean aus dem Gel isoliert.

2.1.5 Ligation von DNA

Zwei µl 10x Pufferlösung, die entsprechende Menge dephosphorylierter Vektor und Insert DNA, 0,5 µl Ligase (Gibco BRL, Grand Island, NY) und H₂O ad 20 µl wurden gemischt und die Ligation bei 16° im Wasserbad über Nacht durchgeführt.

2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Um eine intramolekulare Re-Ligation von Plasmidvektoren zu verhindern, wurden die 5` Enden mit alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) dephosphoryliert. Nach Restriktionsverdau des Vektors wurde das Restriktionsenzym bei 65° über 20 min inaktiviert. Da das Enzym in allen zum Restriktionsverdau benutzten Pufferlösungen (Puffer 1, 2, 3 oder 4 von NEB) wirksam war, wurden der Lösung direkt 0,1 µl Phosphatase und die Reaktion bei 37° über 4 h durchgeführt. Die Enzyminaktivierung erfolgte nach Zugabe von 0,5 M EDTA zu einer endgültigen Konzentration von 10 mM (10 min bei RT) bei 75° über 10 min, gefolgt von einer Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation (s. 2.1.7)

2.1.7 Phenol-Chloroform Extraktion und DNA Präzipitation

Die DNA Lösungen wurden auf 200 µl aufgefüllt, gefolgt von Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Lösung (GibcoBRL), Vortexen und Zentrifugation bei 14.000 rpm über 2 min. Die wässrige, oben liegende Phase wurde asserviert und die DNA in dieser Lösung mit doppeltem Volumen 100% Ethanol und 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat bei -20° über 1-2 h (oder über Nacht) gefällt. Nach Zentrifugieren über 10 min bei 14.000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand abgezogen, das Pellet in der Vakuumpumpe getrocknet und in H₂O oder TE aufgelöst.

2.1.8 Elektroporation von DNA in Bakterien

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA erfolgte in der Regel über Elektroporation. Diese wurde in einem Gene Pulser mit Pulse Controller (Biorad, Hercules, CA) bei 25 μ F Stromstärke, 200 Ohm Widerstand und 2,5 kV Spannung durchgeführt. Zur Transformation von Bakterien wurden 0,2 mm Küvetten eingesetzt (BioRad). 40 μ l elektrokompetenter Bakterien (z.B. Top 10, Invitrogen, Carlsbad, CA) wurden mit 1-2 μ l DNA auf Eis gemischt, in die vorgekühlten Küvetten pipettiert und zügig elektroporiert. Nach dem Puls wurden in die Küvette sofort 480 μ l Medium pipettiert, die Lösungen gut gemischt, in ein 15 ml Falcon Tube überführt und bei 37° im Brutschrank über eine Stunde geschüttelt, damit das Antibiotikaresistenzgen exprimiert werden konnte. Danach steriles Verteilen der gewünschten Menge der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit Antibiotika versetzt (Kanamycin oder Ampicillin) und Inkubation bei 37° über Nacht.

2.1.9 Isolierung von Plasmid DNA (Miniprep)

Die Isolierung von Miniprep DNA erfolgte mit der Alkali-Lyse Methode. Die mit einer sterilen Öse isolierten Kolonien wurden in 5 ml LB über Nacht bei 37° im Rüttler bebrütet. Vor der Zentrifugation bei 4.000 rpm über 15 min wurden 500 μ l mit 300 μ l Glycerol versetzt und als bacterial stock eingefroren. Das Pellet wurde sorgfältig in 200 μ l kaltem GTE aufgelöst (50mM Glucose, 25mM Tris-HCl, pH=8, 10mM EDTA) und 5 min bei RT inkubiert, gefolgt von Zugabe von 400 μ l Alkali-SDS (0,2M NaOH, 1% SDS) (5 min Inkubation auf Eis) und 300 μ l Acetatpuffer (3M KOAc, 5M Acetat) (gutes Mischen, 10 min auf Eis). Es bildet sich ein weißes Präzipitat. Zentrifugation bei 14.000 rpm über 5 min in Eppendorf Röhrchen. Es folgt eine Phenol/Chloroform Extraktion und DNA Präzipitation (s. 2.1.8). Das getrocknete Pellett wird in 50 μ l TE oder H₂O aufgelöst und die DNA bei 4° gelagert.

2.1.10 Isolierung von Plasmid DNA (Maxiprep)

Die Isolierung von größeren DNA Mengen erfolgte aus einer 500 ml LB Kultur mit dem QIAfilter Maxiprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Nach Identifikation des

korrekten Klones im Miniprep wurde aus dem entsprechenden bacterial stock zunächst eine 5 ml LB Kultur über 8-12 h angesetzt, damit 500 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, beimpft und über Nacht bei 37° im Schüttler kultiviert. Nach Asservierung eines bacterial stock erfolgte die Zentrifugation über 20 min bei 4000 rpm und 4°. Das Pellet wurde in 10 ml Lysebuffer 1 gut aufgelöst, danach Zufügen von 10 ml Puffer 2 und 10 ml Puffer 3. Es bildete sich ein dickes weißes Präzipitat. Die gesamte Lösung wurde auf die QIAGEN Säulen aufgetragen, 10 min inkubiert und unter Einsatz des Stempels in die mit Harz gefüllten Säulen filtriert. Während des Durchsickern der Lösung wurde die DNA an den Harz gebunden. Nach 3x Waschen, Herauslösen der DNA mit 15 ml Eluationslösung, Fällern mit Ethanol, Waschen und Trocknen des Pellets in der Vakuumpumpe. Auflösen der DNA in 500 µl TE. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (s. 2.1.11).

2.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

5 µl der DNA Lösung wurden mit 495 µl H₂O gemischt (Verdünnung 1:100) und die O.D. (optische Dichte) in einem Beckman Spektrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) bei 260 nm Wellenlänge mit dem DNA Programm gemessen. Dieses Programm errechnet direkt die DNA Konzentration in der Lösung (alternativ: 1 O.D. = 50 µg/ml DNA) und die Ratio 260/280 nm (Maß für die Reinheit der DNA), die 1.8-2.0 betragen sollte.

2.2 Amplifikation der therapeutischen Gene

2.2.1 Endostatin

Die modifizierte Amplifikation des Endostatin Genes (552 bp) erfolgte über PCR Reaktionen, zu denen uns als template DNA ein das Endostatin Gen enthaltender Vektor (pNF-HTH) zur Verfügung stand, der uns freundlicherweise von B.R. Olsen, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA zur Verfügung gestellt wurde. Um sicherzustellen, dass das Endostatin Gen nach seiner Expression aus der Zelle ausgeschleust wird, haben wir das Signal Gen JE/MCP-1 (84 bp) von Rattus norvegicus (Gene Bank accession

number AF058786) am 5' Ende angefügt. Desweiteren wurde zur vereinfachten Detektion (im Western Blot) ein Hämagglutinin Tag (42 bp) angefügt. Da die Klonierung in den pTrack CMV Stuttle Vektor über *NotI* Restriktionsstellen möglich ist, wurden jeweils am 5' und 3' Ende eine *NotI* Restriktionsstelle eingefügt. Abb. 3 zeigt schematisch die modifizierte Genstruktur und die Amplifikationsstrategie.

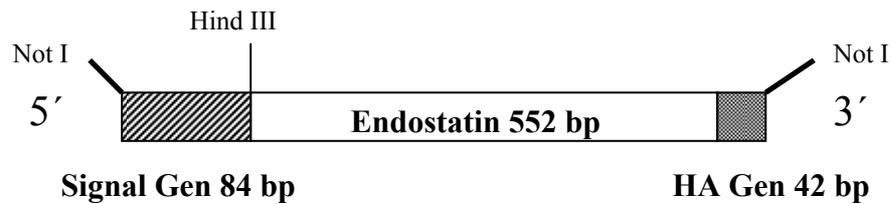


Abb. 3: Schema der Genstruktur des Signal-Endostatin-HA Genes mit Restriktionsenzym-schnittstellen

Zunächst wurde mittels PCR das Signal-Gen mit einer 5' *NotI* Restriktionsenzymstelle und einer 3' *HindIII* Restriktionsstelle amplifiziert. Als template diente der das Signal Gen exprimierende Vektor pSP72-JE/MCP-PF4, als Primer das Primerpaar *NotI* sig fw/*HindIII* sig rev. Die Amplifikation erfolgte im Standardprogramm mit einer Anlagerungstemperatur von 55 °. Das Endostatingen mit dem HA Tag wurde mit den Primern *HindIII* Endo fw und *NotI* HA Endo rev im Long PCR Programm amplifiziert. In Tabelle 5 sind die Primer aufgelistet, die von der Firma Gibco BRL synthetisiert wurden.

Vor der Ligation des Signal- und Endostatin-HA Genes müssen die Restriktionsenden, die im Rahmen der PCR aufgefüllt wurden, demarkiert werden (Restriktionsendonucleasenverdau mit *HindIII*, 37°, über Nacht). Nach Gelelektrophorese und Isolierung der entsprechenden DNA Fragmente wurden gleiche DNA Mengen ligiert. Die Ligation erfolgte in 20 µl Gesamtvolumen bei 16° über Nacht. Nach Enzyminaktivierung stand das Produkt zur Klonierung in den TOPO Vektor bereit.

| Primer | 5'-3'Sequenz |
|------------------------|--|
| <i>NotI</i> sig fw | TCA GCGGCCGC ATG GCA CAG GTC TCT GTC ACG CTT CTG |
| <i>HindIII</i> sig rev | TCA AAGCTT AAC TGC ATC TGG CTG AGA CAG CA |

| | |
|------------------|---|
| HindIII Endo fw | TCA AAGCTT CAT ACT CAT CAG GAC |
| NotI HA Endo rev | TCA GCGGCCGC TCC GAG GGA GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA GGC CAT TTT GGA GAA AGA |

Tabelle 5: Primersequenzen zur Amplifikation des Signal Genes und des Endostatin-HA Genes. Fw = forward Primer; rev = Reverse Primer; sig = Signal-Gen, Endo = Endostatin, HA = Hämagglutinin Gen, kursiv gedruckte Sequenz entspricht den Restriktionsenzymstellen.

2.2.2 Plättchenfaktor 4 (PF4)

Zur Amplifikation des PF4 Genes (212 bp) stand uns ein das PF4 Gen exprimierender Vektor zur Verfügung (pSP72JE/MCP/PF4). Zum vereinfachten Nachweis des exprimierten Proteins wurde erneut ein HA Tag an das Gen gekoppelt, sowie das Signal Peptid eingefügt. Abb. 4 zeigt die Genstruktur sig-HA-PF4 mit einer 5' und 3' NotI Restriktionsstelle.

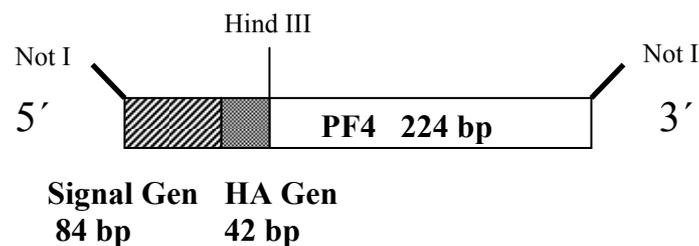


Abb. 4: Genstruktur des Signal-HA-PF4 Genes mit Restriktionsenzymchnittstellen

Zunächst wurde unter Verwendung des pSP72JE/MCP/PF4 Vektors als template DNA eine PCR mit den Primern NotI sig fw und HindIII HA sig rev durchgeführt (Tabelle 6). Wegen des langen Überhanges im reverse Primer wurde das Long PCR Programm eingesetzt. Über eine 2. PCR wurde das PF4 Gen amplifiziert (Primerpaar HindIII PF4 fw und NotI PF4 rev, Standard PCR Programm, AT 54°.) Nach Restriktionsenzymverdau mit HindIII wurde eine Ligation der beiden DNAs in gleicher Menge bei 16° über Nacht durchgeführt. Nach Inaktivierung der Ligase (70°, 10 min) und Abkühlung der Lösung ist die Ligation bereit zur Klonierung in den TOPO Vektor.

| Primer | 5'-3'Sequenz |
|--------------------|---|
| NotI sig fw | TCA GCGGCCGC ATG GCA CAG GTC TCT GTC ACG CTT CTG |
| HindIII HA sig rev | TCA AAGCTT TCC GAG GGA GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA GGC CAT AAC TGC ATC TGG CTG AGC CAA CAC |
| HindIII PF4 fw | TCA AAGCTT GAA GCT GAA GAA GAT GGG GAC CTG CAG |
| NotI PF4 rev | TCA GCGGCCGC CTA ACT CTC CAA AAG TTT CTT AAT TAT TTT C |

Tabelle 6: Primersequenzen zur Amplifikation des Signal HA Genes und des PF4 Genes. Fw = forward Primer; rev = Reverse Primer; sig = Signal Gen, HA = Hämagglutinin Gen; kursiv gedruckte Sequenz entspricht den Restriktionsenzymstellen.

2.2.3 Angiostatin

Der adenovirale Vektor pAdAngiostatin HA war von Toshihide Tanaka in unserem Labor konstruiert und hergestellt worden und wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Tanaka *et al.*, 1998). Angiostatin ist ein relativ großes Gen mit 1422 bp und auch in diesem Vektor ist ein HA Tag und ein Signal-Gen enthalten.

2.2.4 Fusionsprotein Angiostatin/Endostatin

Das Fusionsprotein zwischen Angiostatin und Endostatin (Abb. 5) wurde konstruiert unter der Zielsetzung, durch einen solches Fusionsprotein eine synergistische, antiangiogenetische Wirkung in Bezug auf das Tumorstadium zu erzielen.

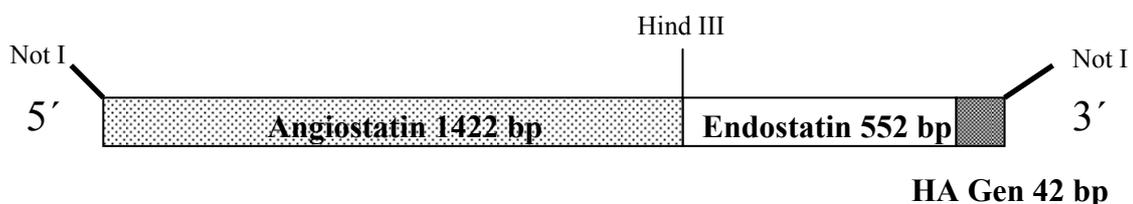


Abb. 5: Schema der Genstruktur des Fusionsproteins zwischen Angiostatin und Endostatin mit Restriktionsenzymstellen

Nach PCR Amplifikation von Angiostatin mit einem 5'Primer mit NotI Linker und einem 3'Primer mit einer HINDIII Restriktionsstelle (s. Tabelle 7, template DNA: padAngio, Standard PCR Programm mit einer AT von 55° und Endostatin mit einem 5'Primer mit HindIII Linker und einem 3' HA- Primer mit NotI Linker (template DNA: pTrack Endo HA, Standard PCR Programm, AT von 54°) wurden die PCR Produkte auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, die entsprechenden Banden (Angiostatin ca. 1450 bp, Endo HA ca. 600 bp) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA eluiert (Gene Clean, s. 2.1.3). Anschließend wurde ein HindIII Restriktionsverdau von beiden DNA Lösungen durchgeführt (2.1.4), die Enzyme inaktiviert und die beiden Fragmente bei 16° über Nacht ligiert (2.1.5). Nach Phenol-Chloroform Extraktion und DNA Präzipitation (2.1.7) wurde das Fusionsgen NotI Angio/EndoHA NotI in den TOPO Vektor kloniert und ein Maxiprep durchgeführt (2.1.10).

| Primer | 5'-3'Sequenz |
|-------------------|--------------------------------------|
| NotI Angio fw | ACG GCGGCCGC ATG GAC CAT AAG GAA GTA |
| HindIII Angio rev | TCA AAGCTT TGT GGG CAA TTC CAC AAC |
| HindIII Endo fw | TCA AAGCTT CAT ACT CAT CAG GAC |
| NotI HA rev | TCA GCGGCCGC TCC GAG GGA GGC GTA GTC |

Tabelle 7: Primersequenzen zur Amplifikation des Angiostatin und des Endostatin-HA Genes. Fw = forward Primer; rev = reverse Primer; Angio = Angiostatin, Endo = Endostatin, HA = Hämagglutinin Gen; kursiv gedruckte Sequenz entspricht den Restriktionsenzymstellen.

2.3 TOPO Vektor Klonierung

Rationale für die Klonierung in TOPO TA: Das TOPO TA Cloning System (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) ist ein einfach zu handhabendes Vektorsystem zur Klonierung von *Taq* Polymerase amplifizierten PCR Produkten. Der Vorteil dieses Vektorsystemes besteht darin, dass für weitere Klonierungsschritte jederzeit über einen neuen Maxiprep von dem TOPO Vektor bacterial stock genügend DNA des therapeutischen Genes zur Verfügung steht. Das in den TOPO Vektor klonierte Gen kann mit Standard M13 Primern sequenziert und somit auf fehlerhafte Sequenzen überprüft werden. Zudem

befinden sich in dem TOPO Vektor multiple Restriktionsstellen vor und hinter dem inserierten Gen, so dass das Gen für weitere Klonierungen mit verschiedensten Restriktionsenden ausgeschnitten werden kann. Wir haben alle PCR amplifizierten Gene aus diesem Grund vor der Klonierung in den Shuttle Vektor pTrackCMV in TOPO TA Vektoren kloniert, mehrere Klone sequenziert, um sicherzustellen, dass über die PCR und Ligationen ein Gen in frame mit der korrekten Sequenz amplifiziert wurde.

Das Vektorsystem nutzt die Tatsache, dass *Taq* Polymerase eine terminale Transferase Aktivität besitzt, die eine einzelne Desoxyadenosin Nukleinsäure (A) an die 3' Enden von PCR Produkten anfügt. Der linealisierte TOPO TA Vektor besitzt eine einzelne 3'Desoxythymidinbase (T), über die die PCR Produkte ligiert werden. Die Energie für diesen Ligationsvorgang wird von dem Enzym Topoisomerase geliefert (Shuman, 1994), die kovalent an den Vektor gebunden ist. Die Klonierung, die mit den in dem Kit zur Verfügung gestellten Substanzen durchgeführt wurde, umfasste für alle PCR Produkte die folgenden Arbeitsschritte:

- Pro Klonierungsreaktion wurden 3 Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) bei 37° für 30 min angewärmt. Anschließend wurden 40 µl X-gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) steril auf den Platten ausgestrichen und die Platten im Brutschrank inkubiert.
- Ansetzen der TOPO TA Cloning Reaktion: 4 µl PCR Produkt wurden mit 1 µl 1:4 verdünnter Salzlösung und 1 µl TOPO Vektor (pCRII-TOPO, Invitrogen) auf Eis in einem Eppendorf Tube gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Kontrollreaktion erfolgte mit Vektor ohne PCR Produkt.
 - 50 µl One Shot Electrocompetent *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl TOPO Klonierungsreaktion gemischt und in eine 0,2 cm Küvette (Biorad, Hercules, CA) pipettiert.
- Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser with Pulse Controller (Biorad, Hercules, CA) bei 25 µF, 200 Ohm und 2,5 kV. Sofort nach dem Puls wurden in die Küvette sofort 480 µl SOC Medium pipettiert, die Lösungen gut gemischt, in ein 15 ml Falcon Tube überführt und bei 37° im Brutschrank über eine Stunde geschüttelt, damit das Antibiotikaresistenzgen exprimiert werden konnte. Jeweils 10 µl bzw. 50 µl der Ligations- und

Kontrollbakteriensuspension wurden steril auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37° über Nacht inkubiert.

Es bilden sich normalerweise reichlich weiße Kolonien, da das Insert die Expression des X-gal Genes unterbricht, blaue Kolonien werden durch Religation des Vektors selbst gebildet. Pro Konstrukt haben wir 10 weiße Kolonien in 5 ml LB-Medium gepickt (10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto Hefeextract, 10 g NaCl, ad 100 ml Aqua dest), über Nacht bei 37° im Schüttler inkubiert, die Plasmid DNA über einen Miniprep isoliert (siehe 2.1.8), 5 µl der Miniprep DNA mit NotI verdaut und in einem Agarosegel das Vorhandensein des Inserts verifiziert. 3-4 korrekte Klone eines Konstruktes wurden sequenziert (Sequencing Core Facility des Dana Farber Cancer Institutes, Boston MA bzw. Core Facility des NCI, NIH, Bethesda, MD) und die Sequenzen unter Zuhilfenahme des Blast Programmes aus der GenBank Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des National Institutes of Health (NIH) übers Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>) überprüft. Nur in frame klonierte Gene mit komplett korrekter Sequenz wurden weiterverwendet und von diesem Klon für jedes Konstrukt (TOPO sig Endo HA, TOPO sig HA PF4, TOPO sig Angio/Endo HA) ein Maxiprep angefertigt (siehe 2.1.10) und die DNA Konzentration spektrophotometrisch gemessen (2.1.11).

2.4 Klonierung der therapeutischen Gene in den adenoviralen Transfer Vektor pTrackCMV des pAdEasy Systems

Wie in 2.1 beschrieben und aus Abb. 2 ersichtlich umfasst der 1. Schritt in der Herstellung der adenoviralen Vektoren die Klonierung der therapeutischen Genkassette in den Transfer Vektor pTrackCMV. Dieser besitzt in Anschluss an den CMV Promotor eine MCS bestehend aus 8 Restriktionsenzymstellen (Abb. 6). Wir haben aus Praktikabilitätsgründen alle unsere Genkassetten mit *NotI/NotI* Restriktionseenden versehen und somit einheitlich in die NotI Restriktionsstelle der MCS des pTrack Vektors kloniert und mittels Restriktionsenzymanalyse auf Direktionalität geprüft. Zunächst wurden pro Ligation 2-3 µg DNA des pTrackCMV Vektors mit 1 µl *NotI* bei 37° über Nacht verdaut (s. 2.1.4), am nächsten Morgen 1 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um die komplette

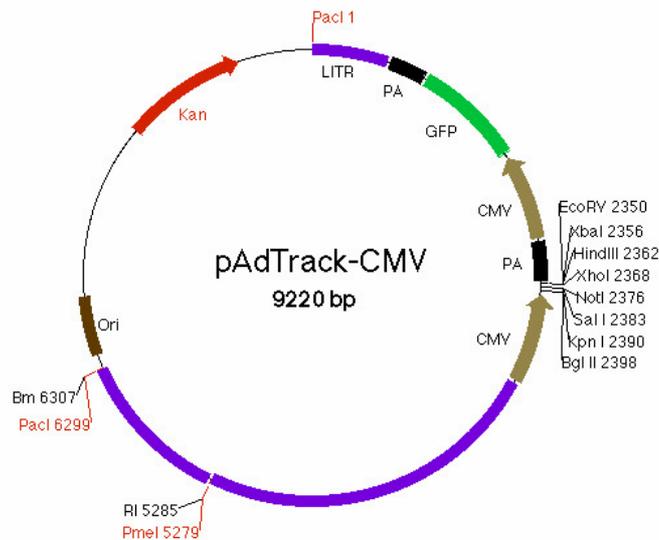
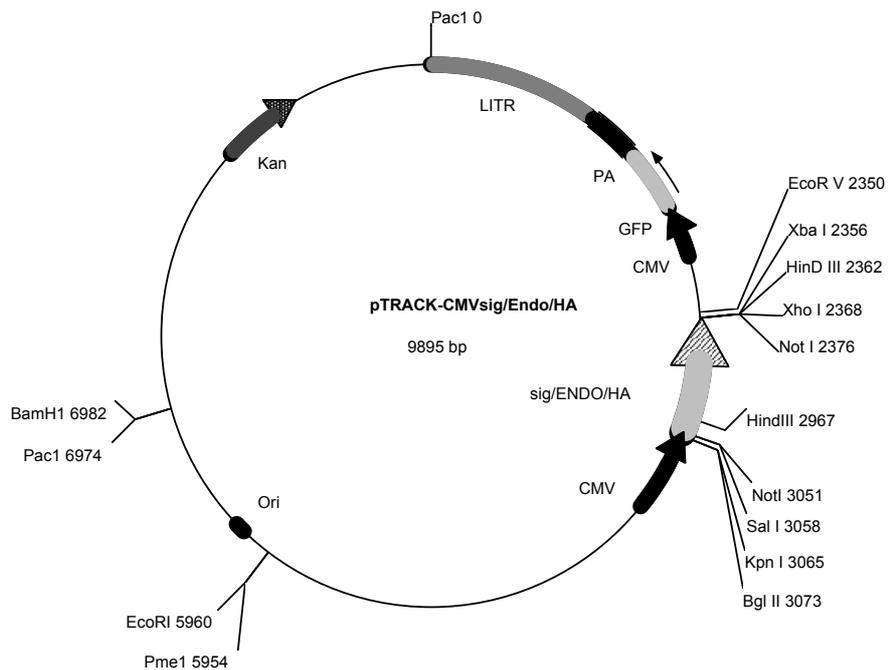


Abb 6: Genkarte des Transfer Vektors pAdTrackCMV, in den die therapeutischen Gene Angiostatin, Endostatin, PF4 und das Fusionsgen Angio/Endo in die *NotI* Restriktionsstelle kloniert wurden.

Linearisierung zu überprüfen, die Enden mit *CIP* dephosphoryliert (s. 2.1.6) und eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt (s. 2.1.7). Gleichzeitig wurden 5-10 μg des die Genkassette tragenden TOPO Vektors mit *NotI* über Nacht verdaut und eine Gelelektrophorese zur Auftrennung von Vektor und ausgeschnittenem Insert durchgeführt. Nach Herauslösen der aus dem Gel ausgeschnittenen Insert DNA aus dem Gel mittels Gene Clean (s. 2.1.3), wurden 100-200 ng der linearisierten pTrack Vektor DNA mit 5-10facher Menge der Insert DNA über Nacht bei 16° ligiert (s. 2.1.5). Die Menge der Insert DNA wurde anhand der Dicke der Bande auf dem Agarosegel durch Vergleich mit den Banden des in einer Menge von 1 μg aufgetragenen 1 kb Längenstandards (NEB) abgeschätzt (3 kb Bande = 250 ng DNA bei 1 μg Gesamtmenge). Am nächsten Tag wurde die DNA mit Phenol/Chloroform gereinigt, mit 100% Ethanol präzipitiert (s. 2.1.7), gewaschen, in der Vakuumpumpe getrocknet und in 5 μl TE aufgelöst. 1-2 μl dieser ligierten DNA wurde in 40 μl TOP10 elektrokompetenter Bakterien (Invitrogen, Carlsbad, CA) elektroporiert, mit SOC Medium versetzt, 1 h im Brutschrank geschüttelt, anschließend 100-200 μl auf Kanamycin (Kan) Agar Platten (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) steril ausgestrichen (s. 2.1.8) und über Nacht bei 37° bebrütet. Am nächsten Abend wurden pro Ligation 30 Kolonien isoliert und in 5 ml LB Kan Medium über Nacht bei 37° bebrütet. Es folgte eine Extraktion von Plasmid DNA aus Bakterienlösung unter Konservierung eines

bacterial stock (s. 2.1.9). Zur Überprüfung der Klone wurde zunächst für alle klonierten Konstrukte (pTrackCMVsigEndoHA, pTrack CMV sig HA PF4, pTrack CMV Angio/EndoHA) ein *NotI* Restriktionsenzymverdau angesetzt und bei Klonen mit Nachweis eines Inserts in einer 1%igen Agarosegelelektrophorese wurden zusätzliche Restriktionsenzymanalysen zur Feststellung der korrekten Richtung des Inserts durchgeführt.



Plasmid name: pTRACK-CMVsig/Endo/HA
Plasmid size: 9895 bp
Constructed by: Monika Hampf
Construction date: 2/10/99
Comments/References: Shuttle vector for pAdEASY system. Hind III site between signal and Endo at 2976 bp. sig Endo HA cloned in NotI/NotI.

Abb. 7: Schematische Darstellung des Transfer Vektors pTrackCMVsigEndoHA mit Auflistung der Restriktionsenzymstellen.

Im Falle von pTrackCMVsigEndoHA (Abb. 7) wurde z.B. die Richtung über einen *HindIII* Verdau kontrolliert: *HindIII* schneidet den pTrack Vektor bei 2362 bp, das Endo Gen wurde in *NotI* zwischen 2376 bp und 3053 bp eingefügt und

besitzt zwischen dem Signal Gen und ATG des Endostatin Genes eine *HindIII* Restriktionsstelle. Der CMV Promotor befindet sich in "antisense" Richtung, so dass das Gen auch in "antisense" Richtung liegen muss, um exprimiert zu werden (s. Abb 6). Liegt die Genkassette in korrekter Richtung, fanden wir somit beim *HindIII* Verdau ein 606 bp Fragment und den Restvektor von 9300 bp, bei Lage in der falschen Richtung wurde ein 100 bp und ein 9800 bp Fragment gewonnen.

Sowohl für pTrackCMVsigHAPF4 als auch pTrack CMVAngio/EndoHA wurde die korrekte Lage der Genkassette in Bezug auf den CMV Promotor ebenfalls über einen *HindIII* Verdau kontrolliert: Beim *HindIII* Verdau von pTrackCMV sigHAPF4 wurde bei korrekter Lage der Genkassette ein 226 bp Fragment und 9330 bp großes Restvektorfragment nachgewiesen, im Falle einer "antisense" Lage in Bezug auf den Promotor zeigte sich ein 130 bp Fragment und ein Restvektor von 9418 bp. Da die Unterscheidung zwischen 226 bp und 137 bp nicht einfach ist, wurde ein 1,5% iges Agarosegel präpariert, ein 1 kb und 100 bp DNA Marker geladen (NEB) und die Elektrophorese über 90min durchgeführt. Der Verdau von pTrackCMVAngio/EndoHA mit *HindIII* führte bei korrekter Lage zu einem 600 bp Fragment + Restvektor, bei inkorrekt Lage zu einem 1436 bp Fragment + Restvektor.

Sobald die/der korrekte(n) Klon(e) eines jeden Vektorkonstruktes identifiziert und verifiziert worden waren, wurde aus dem bei 4° gelagerten bacterial stock eine 5 ml Kultur angelegt und mit dieser 500 ml LB Medium/Kanamycin inokuliert und über Nacht bei 37° im Schüttler inkubiert. Von dieser Kultur wurde ein Maxiprep angefertigt (s. 2.1.10) und die DNA Konzentration bestimmt (s. 2.1.11). Von jedem Klon wurde ein bacterial stock (500 µl Bakteriensuspension + 50 µl Glycerol) in Kryoröhrchen (Greiner, bio-one, Longwood, FL) bei -80° asserviert.

2.5 Homologe Rekombination in Bakterien

Die homologe Rekombination (2. Schritt, Abb. 2) zwischen den das therapeutische Gen tragenden Shuttle Vektoren pTracksigHAPF4, pTracksigEndoHA, pTrackAngio/EndoHA bzw. pTrack ohne Insert zur Herstellung eines GFP exprimierenden Kontrollvektors und dem adenoviralen Genom des Backbone Vektors pAdEasy wurde in dem hoch-rekombinanten, elektrokompetenten *E.coli* Stamm BJ5183 durchgeführt. Zu Anfang wurden die Bakterien in unserem Labor selbst hergestellt, später über die Firma Quantum Biotechnology, Montreal, Canada bezogen.

Zunächst wurden 4µg der klonierten Shuttle Vektoren bzw. des pTrack Vektors mit *PmeI* verdaut (37° über Nacht) und somit linearisiert (*PmeI* schneidet den Vektor nur an einer Stelle). Am nächsten Tag wird die DNA Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen um die komplette Verdauung zu kontrollieren. Der linearisierte Vektor wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA eluiert (Gene Clean, s. 2.1.3).

Für die Rekombination wurden 1 µg des linearisierten pTrack Vektors mit 100ng DNA des Backbone Vektors pAdEasy gemischt und mit 40 µl BJ 5138 *E.coli* Bakterien gemischt. Anschließend erfolgt die Elektroporation nach Standardbedingungen (s. 2.1.8). Nach 1 h Inkubation wurden mit der Bakteriensuspension pro Konstrukt 2 Agarplatten beimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Kontrolle bestand aus linearisiertem pTrack Vektor ohne Backbone. Am nächsten Tag wurden 30 der kleinen Kolonien in 5 ml LB überführt und über Nacht im Schüttler bei 37° inkubiert. Es folgte eine Plasmid DNA Isolierung (s. 2.1.9) und Agarosegelelektrophorese (0,8%ig, Lambda-*HindIII* Marker). Rekombinante Klone besaßen eine Größe von ca. 40 kb. Korrekte rekombinante Klone (im folgenden als "Provirus" bezeichnet) wurden mit *BamHI* und *Pac* zur Überprüfung der Struktur geschnitten. *BamHI* lieferte ein 21 kb, ein 11 kb und ein 5 kb Fragment, *Pac* linearisierte den Vektor und lieferte oft ein kleines Fragment von 3 oder 4,5 kb, das durch Rekombination der linken Armen entstehen konnte. Im Falle eines korrekten Klones (die Rekombinationsfrequenz liegt bei nur ca. 10%!) wurde diese Miniprep DNA in DH5α Zellen umtransformiert (Elektroporation unter Standardbedingungen s. 2.1.8, gefolgt von Ausstreichen der Bakterienlösung auf Agarplatten

(Verdünnung bis 1:100), Asservierung von Kolonien und Miniprep), da das große pAdEasy Plasmid in den hoch-rekombinanten BJ5183 Bakterien nicht stabil war und oft Deletionen auftraten. Die neue Miniprep DNA wurde erneut durch Restriktionsenzymverdau überprüft und bei korrekter Struktur des adenoviralen Vektors DNA über einen QIAfilter Maxiprep (QIAGEN, Valencia, CA) isoliert (s. 2.1.10, extrem wichtig ist hier das Abfrieren eines bakteriellen stock!) und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt (s. 2.1.11).

2.6 Transfektion des rekombinanten pAdEasy Plasmids in 293 Zellen

2.6.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten und Arbeiten zur Virusisolierung wurden in einer Lamina Air Flow Hood unter sterilen Bedingungen mit sterilen Einmalpipetten und Filterpipettenspitzen durchgeführt.

Die Transfektion der rekombinanten pAdEasy Plasmide in 293 Zellen entsprach dem 3. Schritt in der Herstellung der Adenoviren (s. Abb. 2). 293 Zellen (mit dem adenoviralen E1 Gen transformierte menschliche embryonale Nierenzellen) wurden am Tag vor der Transfektion in einer 15 cm Schale mit einer Zelldichte von ca. 5×10^6 ausgesät, damit sie am darauffolgenden Tag eine Zelldichte von 50-70% besitzen. Das Bebrüten der Zellen erfolgte bei 37°, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Heraeus Brutschrank. Die Zellen wurden in DMEM Medium mit 4,5 g/L L-Glucose, 2mM Glutamine, 10% Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von Gibco BRL, Grand Island, NY) kultiviert. 1-3 h vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch 20 ml frisches Medium ersetzt.

2.6.2 Calcium Phosphat Transfektion und Zellasservierung

100 µg der Provirus DNA wurden mit 3 µl *PacI* in 50µl Gesamtvolumen über Nacht bei 37° verdaut (Linearisierung des Vektors), gefolgt von einer Phenol/Chloroform Extraktion, Präzipitation mit Ethanol und Auflösen in 886 µl sterilem H₂O (s. 2.1.7). Zu der DNA wurden 124 µl Calcium Lösung (CalPhosMaximizer Transfection Kit, Clontech, Palo Alto, CA) pipettiert (Lösung

A). In ein 15 ml Falcon Tube wurden 1000 μ l 2 x HBSS pipettiert (Lösung B). Unter Schütteln der Lösung B wurde die Lösung A tropfenweise der B Lösung zugefügt und 5 min inkubiert. Das feine Präzipitat wurde anschließend tropfenweise gleichmäßig auf die Zellen verteilt, diese 8 h im Brutschrank inkubiert und danach vorsichtig 2x mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt. Die initiale Transfektion (grüne Zellen nach 24 - 48h) und dann eintretende Virusproduktion (nach 3 - 4 Tagen) wurde anhand der GFP Expression täglich unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Der zytopathische Effekt der Adenoviren trat meist nach 6 - 7 Tagen oder auch später ein. Zu diesem Zeitpunkt wurden dann die Zellen samt Medium auf 5 frisch ausgesäten 15 cm Platten mit 50% konfluenten 293 Zellen verteilt, um diese zu infizieren. Sobald in diesen 5 Platten ein zytopathischer Effekt zu sehen war und alle Zellen GFP exprimierten, wurden für die endgültige Produktion 40 - 50 15 cm Platten mit 293 Zellen mit diesen infizierten Zellen und ihrem Medium, in dem sich massenhaft Viren befinden, infiziert. Sobald ca. 50% der Zellen sich abrundeten und von der Platte abhoben, wurden die Zellen von der Platte mit einem Zellschaber abgelöst und samt ihrem Medium in 250 ml Zentrifugationsflaschen gesammelt und bei 3000 rpm und 4° über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei -80° eingefroren, da er idealerweise für eine erneute Infektion von 293 Zellen und Produktion von Viren benutzt werden kann. Das Zellpellet aus allen Flaschen wurde in ca. 30 ml sterilem PBS aufgelöst, in ein 50 ml Kryoröhrchen mit Schraubverschluss überführt und bei -80° eingefroren.

2.6.3 Virusisolierung mittels doppelter Cesiumchloridgradientenultra-zentrifugation

Die folgenden CsCl Gradienten Lösungen wurden in sterilem PBS hergestellt und steril gefiltert (0,45 μ m Filter, Nalgene, Rochester, NY)

A. Dichte 1,40 (62,0 g CsCl und 100 ml PBS)

B Dichte 1,25 (36,16 g CsCl und 100 ml PBS)

C: Dichte 1,34 (51,20 g CsCl und 100 ml PBS)

Zur Aufreinigung des Virus im Cesiumchlorid Gradienten wurde die 293 Zellsuspension 3 x hintereinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Schütteln im 37° Wasserbad aufgetaut (Zellyse). Nach 10 min Zentrifugieren bei 3000 rpm wurde der klare Überstand abpipettiert und vorsichtig auf den ersten, diskontinuierlichen Gradienten (in Polyallomer Beckman Ultra Clear Tubes, Beckman Coulter) bestehend aus 2 ml CsCl A (am Boden des Tube) und 4 ml CsCl B (über A) pipettiert. In diesem Schritt wurden die infektiösen Viruspartikel von defekten Viruspartikeln und Zellresten getrennt. In einer Beckman Ultrazentrifuge wurde der 1. Gradient bei 12° über 1 h bei 35.000 rpm in einem SW 41 Rotor zentrifugiert. Der Adenovirus sammelte sich in einer bläulich schimmernden Bande, aus der er mit einer 5 ml sterilen Spritze und 18G Nadel vorsichtig abgezogen und auf den zweiten, kontinuierlichen Gradienten bestehend aus 8 ml CsCl C aufgetragen wurde, der zum kompletten Trennen von infektiösen Viruspartikel und defekten Viruspartikeln führen sollte. Erneutes Zentrifugieren bei 35.000 rpm über 18 h und Asservieren der nunmehr dichten, weißlichen Virusbande mit der Spritze (in der Regel ca. 1 ml). Anschließend wurde der Virus zur Entfernung des zelltoxischen CsCl dialysiert. Dazu wurden 3 l Dialysepuffer bestehend aus 2M Tris-HCl, 1M MgCl₂ und 300 ml Glycerol hergestellt, steril gefiltert und der Virus in Dialysekassetten mit einem Molekulargewichts-Cut-off von 25.000 Dalton (Pierce, Rockford, IL) in 1 l des Puffers für 1 h bei 4° unter Rühren dialysiert. Der Puffer wurde 2x gewechselt, um somit ein komplettes Entfernen des CsCl Salzes zu erreichen. Nach Abschluss der Dialysierung wird der Virus in kleinen Alliquots (5–50 µl) in sterilen Kryoröhrchen bei -80° gelagert.

2.6.4 Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über die Methode der "gene transfer unit" (GTU) oder "transducing particles", in dem erstmals GFP positive 293 Zellen in seriellen Verdünnungen aus der Viruslösung gezählt werden (biologische Methode). Es wird 1 µl der Viruslösung in 10 ml DMEM pipettiert, was einer Verdünnung von 10⁻⁴ entspricht. Aus dieser Lösung werden weitere serielle Verdünnungen bis 10⁻¹³ angefertigt. Je 2 x 10⁵ 293 Zellen pro Vertiefung werden in zwei 6 Lochplatten am Vortag ausplattiert. Das Medium wird entfernt

und die Zellen mit je 1 ml aus den Lösungen der Verdünnungsreihe infiziert. Nach ca. 18 h wurde der Virustiter abgelesen, indem die höchste Verdünnung, in der noch 1 bis max. 10 GFP positive Zellen zu finden waren, als der Virustiter der Lösung definiert wurde.

Zur Überprüfung wurde zusätzlich die optische Dichte (O.D.) der Viruslösung im Spektrophotometer bei 260 nm bestimmt (VP/ml) (physikalische Methode). Dazu wurden 50 µl Viruslösung mit 440 µl PBS und 10 µl 5% SDS (Verdünnung 1:10) auf dem Vortexer gemischt, kurz zentrifugiert und die O.D. bei 260 nm im Beckman Spektrophotometer gemessen. Da der Virus 1:10 verdünnt wurde, musste der Messwert x 10 genommen werden. 1 O.D. unit entspricht 10^{12} Partikeln/ml. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass sowohl infektiöse als auch defekte Viruspartikel gemessen wurden. Man konnte daher aus Erfahrung davon ausgehen, dass der eigentliche Titer (infektiöse Partikel) eine 10er Potenz niedriger als der gemessene O.D. Wert lag, was sich in unserem Falle durch die gleichzeitige Bestimmung der infektiösen Partikel meist bestätigen ließ.

In der Regel wurde mit der oben beschriebenen Anzahl an infizierten Platten mit 293 Zellen Virustiter von 1×10^{11} erreicht.

2.7 Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse

Der erste Schritt in der Prüfung der Funktionalität der klonierten viralen Vektoren besteht darin, die von dem therapeutischen Gen expremierten Proteine in den infizierten Zellen und im Zellkulturüberstand (Frage: werden die Proteine in die Umgebung abgegeben?) nachzuweisen.

Vorbereitung der Proben:

- a. Proteinnachweis im Zellysat: In einer 10 cm Platte wurden Tumorzellen (z.B. 2×10^6 TA3) mit einer MOI (multiplicity of infection) von 50 mit dem entsprechenden Virus infiziert und die Zellen 48 - 72 h nach der Infektion über 30 min bei 4° unter Schütteln lysiert (200 µl EBC Lysepuffer 50mM Tris pH=8, 120mM NaCl, 0,5% NP40 + Proteaseinhibitormix (Boehringer, Mannheim)), zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (Biorad Protein Assay, Biorad, Hercules, CA). 50-100 µg Protein

wurden mit 2x SDS Ladepuffer (100mM Tris pH=6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% Bromphenol Blau, 20% Glycerol) versetzt, aufgekocht und über ein 10% SDS Polyacrylamid Gel aufgetrennt.

- b. Proteinnachweis im Zellkulturüberstand: Von 1 ml des Überstand der virusinfizierten Zellen wurde eine Immunopräzipitation mit 2 µl eines Anti-HA Antikörpers (Clone Y11, polyklonaler Kaninchenantikörper, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) und 30 µl 1:1 Protein A-Sepharose Beads durchgeführt. Nach Zentrifugieren und 3x Waschen bei 4mM Tris pH=8, 100mM NaCl, 1mM EDTA) wurde das Pellett mit 50 µl 2 x SDS Ladepuffer aufgelöst, gekocht und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Elektrophorese erfolgte auf 10% SDS-Polyacrylamidgelen bei 100 V in einer senkrechten Gelkammer (Biorad, Hercules, CA) zusammen mit einem Proteinmarker (Kaleidoscope Standards, Biorad, Hercules, CA). Der Transfer auf eine PDVF Membran wurde in einer Nasstransferzelle (Transblot, Biorad, Hercules, CA) bei 450 mA in 2 h bei 4° durchgeführt. Anschließend erfolgte das Immunoblotting: zunächst Blocken der Membran mit 5% Trockenmilchpulver in TBS/0,02% Tween, gefolgt von 3x Waschen, 1 h Inkubation mit dem primären Antikörper (Maus Anti-HA Antikörper 12CA5, 1:400, Boehringer, Mannheim), 3 x Waschen, 30 min Inkubation mit sekundärem Antikörper (Ziegen-anti Maus Meerrettichperoxidase gekoppelter AK, 1:5000, Pharmingen, San Diego, CA), 3 x Waschen, 5 min Inkubation mit einer Chemilumineszenzlösung (ECL Western blotting analysis system, Amersham, Arlington Heights, IL) und Anfertigen eines Röntgenfilmes.

2.8 In vitro Funktionsteste zum Nachweis der antiangiogenetischen Wirksamkeit der expremierten Gene

2.8.1 Zelllinien und Zellkultur

Die folgenden Zelllinien standen für die in vitro und in vivo Versuche zur Verfügung:

| Name | Gewebe | Organismus | Quelle | Medium |
|--------------------|--|------------|---|---|
| SKOV-3 | Adenokarzinom des Ovars | Mensch | ATCC | HAM F12 (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| SKOV-3 i.p. | Malignere Version aus Aszites | Mensch | selbst kultiviert aus Aszites von SKOV-3 tumortragenden Tieren | HAM F12 (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| MDAH 2774 | Adenokarzinom des Ovars | Mensch | ATCC | HAM F12 (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| ES-2 | Klarzellkarzinom des Ovars | Mensch | ATCC | HAM F12 (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| TA3 | Brustkrebs Aszitestumorzelllinie | Maus | H:F.Dvorak, Department of Pathology, Beth Israel Hospital, Boston | DMEM (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| U87 | Malignes Glioblastom | Mensch | ATCC | MEM (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| MDA MB231 | Adenokarzinom der Mamma | Mensch | ATCC | HAM F12 (+10% FBS, 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |
| HUVEC | Endothelzellen, Nabelschnurvene | Mensch | ATCC | Medium 199 (+10% FBS, 100units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + ECGF 30 µg/ml + Heparin 100µg/ml) |
| 293 | Embryonale Nierenepithelzellen, substituiert mit adenoviralem E1-Gen | Mensch | ATCC | DMEM (+10% FBS, 10units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) |

| | | | | |
|-------------|----------------------------------|-----|------|--|
| CPAE | Endothelzellen, Lungenarterie | Kuh | ATCC | DMEM (+10% FBS, 10units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 1,0 mM Natrium- pyruvat + 0,1 mM nichtessentielle AS und 1,5 g/l Natrium- bicarbonat + VEGF 10ng/ml |
|-------------|----------------------------------|-----|------|--|

Tabelle 8: Beschreibung der eukaryonten Zelllinien mit den entsprechenden Zellkulturmedien und Zusätzen (Gibco BRL, Grand Island, NY bzw. Sigma, St. Louis, MO). Die Zelllinien wurden größtenteils über ATCC = American Type Culture Collection bezogen.

Alle Zellen wurden in Gewebekulturflaschen oder Schalen der entsprechenden Größe in den spezifischen Kulturmedien im Begasungsbrutschrank (5% CO₂, Heraeus) bei 37° und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Konfluenz der Zellen oder zum Ansetzen eines Experimentes wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,25%/0.03% w/v) von der Unterlage abgelöst (Inkubation ca. 3-5 min bei RT). Nach Zugabe einer entsprechenden Menge frischen Mediums zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Suspension in ein steriles Röhrchen pipettiert und bei 1000 rpm für 5-10 min zentrifugiert. Nach Auflösen des Zellpellets in frischem Medium wurden die Zellen in einer Neugebauer Zählkammer unter dem Mikroskop oder in einem Coulter Counter gezählt und in der erwünschten Zellzahl bzw. in einer Subkultivierungsratio von 1:3 bei Endothelzellen, bis 1:5 bei Tumorzellen neu ausgesät.

Zur Kryokonservierung wurden die trypsinierten und zentrifugierten Zellen in einer Gefrierlösung (FBS mit 10% DMSO) in Kryokonservierungsröhrchen (Greiner) bei -80° schockgefroren und anschließend im Flüssigstickstofftank gelagert.

Das Auftauen der tiefgefrorenen Zellen erfolgte durch kurzes Schütteln im Wasserbad bei 37°; gefolgt von Waschen mit frischem Medium, Ausplattieren in Zellkulturflaschen und Kultivieren für mehrere Tagen unter Mediumwechsel bis zur Konfluenz.

2.8.2 Proliferationstest (BrdU)

Angiostatin, Endostatin, PF4 und das Fusionsprotein führen zu einer Hemmung der Endothelzell-(EC) Proliferation. Zur Prüfung der Funktionalität der von den viralen Vektoren exprimierten Proteine wurde deshalb ein Proliferationstest eingesetzt, bei dem ein Pyrimidinanalog (5'-Bromo-2'Deoxyuridin=BrdU) anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA inkorporiert wird und anschließend über eine Immunfarbreaktion nachgewiesen wird. HUVEC's wurden in mit Kollagen-überzogenen 96 Lochplatten in einer Dichte von 3.000 Zellen/Vertiefung 3-fach ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium ersetzt durch 100 µl konditioniertes Medium 199 (angereichert mit ECGF), das von Virus infizierten Zellen stammte, die entweder mit den Einzelviren oder mit der Kombination von zwei Viren (pAdAngio+pAdEndo, pAdAngio+pAdPF4, pAdEndo+pAdPF4) vor 48 h infiziert worden waren und somit die exprimierten Proteine beinhaltete. Als Negativkontrolle wurden nicht-infizierte und mit dem GFP Kontrollvirus infizierte Zellen eingesetzt. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit 10 µl BrdU Lösung (100µM) über 6-12 h inkubiert, fixiert und denaturiert, mit einem sekundären Antikörper inkubiert (anti-BrdU-POD) und anschließend die Farbreaktion ausgelöst (Colorimetric cell proliferation ELISA, BrdU, Boehringer, Mannheim). Die Absorption in den einzelnen Kammern wurde in einem ELISA Reader bei 370/490 nm gemessen. Die Proliferation in den mit den antiangiogenetischen Substanzen inkubierten EC Zellen wurde als mittlere Absorption im Vergleich zu den GFP infizierten Zellen angegeben.

2.8.3 MTT Test

Antiangiogenetische Substanzen haben einen Einfluss auf die Vitalität von Endothelzellen (aber nicht von Tumorzellen), so dass ein MTT Zytotoxizitätstest (MTT cell proliferation kit I, Boehringer Mannheim) als ein weiterer Test zur Überprüfung der Funktionalität der von den Vektoren exprimierten antiangiogenetischen Substanzen eingesetzt wurde.

Dieser Test beruht darauf, dass nur lebende Zellen das Tetrazolium Salz MTT in ein farbiges, nicht-wasserlösliches Formazan Salz umwandeln, geschädigte oder tote Zellen dagegen nicht. Nach Auflösen des Formazans mit einer

Solubilisierungslösung (über Nacht im Inkubator) wird die Farbintensität im ELISA Reader bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) bestimmt.

HUVEC Zellen wurden in einer mit Kollagen beschichteten 96 Lochplatte in einer Zelldichte von 3000 Zellen/Vertiefung in dreifacher Ausführung ausplattiert. Als Vergleich wurde derselbe Test mit der Tumorzelllinie TA3 (5000 Zellen/Vertiefung, kein Kollagen) durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 48 h altes, putativ die exprimierten antiangiogenetischen Substanzen enthaltendes Medium (konditioniertes Medium) ersetzt, das von Zellen, die mit den viralen Vektoren vor 48 h infiziert worden waren, stammte. Die HUVE Zellen wurden ca. 48 - 72 h in diesem konditionierten Medium bzw. in einem Kontrollmedium (Medium von mit dem GFP Vektor infizierten Zellen und auch 48 h altes Medium von nicht infizierten Zellen) kultiviert, anschließend die Vitalität der Zellen pro Vertiefung mit dem MTT Test bestimmt und somit der Einfluss der antiangiogenetischen Substanzen auf die HUVEC Vitalität bzw. Tumorzellvitalität gemessen. Als positiv Kontrolle wurde das zytotoxische TNF eingesetzt.

2.8.4 Endothelzell Migrationsassay

Antiangiogenetische Substanzen hemmen die Migration von Endothelzellen in Richtung chemotaktischer Substanzen/Faktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) oder ECGF (endothelial cell growth factor). Zum in vitro Nachweis dieser Endothelzellmigrationshemmung durch die von unseren viralen Vektoren exprimierten antiangiogenetischen Substanzen wurde eine 96 Loch Chemotaxis Kammer (modifizierte Boyden Kammer) mit einer Nucleopore Polycarbonat Membran mit einer 8 µm Porengröße (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD) eingesetzt. Diese Membran wurde über Nacht mit Kollagen (2 mg/ml in 0,2% Essigsäure, Boehringer, Mannheim) überzogen. 25.000 HUVE Zellen wurden in einem 25 µl Tropfen serumfreies, konditioniertes Kulturmedium 199 (ohne Wachstumsfaktoren), das von mit den viralen Vektoren über 48 h infizierten HUVEC stammte, auf die Oberseite der 96 Loch Membran aufpipettiert. In die Vertiefungen unter der Membran wurden die chemotaktischen Substanzen (VEGF 100 ng/ml, bFGF 100 ng/ml, ECGF 1x) jeweils in 29 µl Medium 199

eingefüllt und die Membran so aufgesetzt, dass sie Kontakt zu den Chemotaxislösungen hatte. Die HUVEC wanderten nunmehr aufgrund des bestehenden Gradienten durch die Membran. Nach 5 h wurde die Membran entfernt, gespült und die Zellen in den Poren mit 1% PFA fixiert und mit Methylengrün gefärbt und unter dem Mikroskop bei 10x Vergrößerung gezählt.

2.8.5 In situ Apoptose Zelldetektionstest (ApopTag)

Eine der Wirkungsweisen antiangiogenetischer Substanzen ist die Induktion von Apoptose (Zelltod) von EC, jedoch nicht von Tumorzellen. Um zu prüfen, ob die von unseren viralen Vektoren exprimierten antiangiogenetischen Substanzen EC in die Apoptose schickten, wurde ein *in vitro* Apoptose Test durchgeführt. Dieser Test markierte die 3'Enden der im Rahmen der Apoptose entstehenden DNA Fragmente mit Digoxigenin dUTP Nukleotiden und im Rahmen einer Antigen-Antikörper-Substratreaktion wurden die DNA Fragmente sichtbar gemacht (ApopTag plus *in situ* detection kit Rhodamine, Intergene, Gaithersburg, MD).

CPAE Zellen wurden in 6 Loch Kulturschalen auf mit Fibronectin überzogenen Glasplättchen ausplattiert (1×10^5 pro Vertiefung). In einer weiteren 6 Lochplatte mit Filtereinsätzen wurden Tumorzellen (4×10^5) mit den viralen Vektoren pAdEndo, pAdAngio, pAdPF4, pAdAngio/Endo und pAdGFP infiziert (MOI 50). Nach 24 h wurden die Einsätze in die 6 Lochplatten mit den CPAE Zellen gesetzt und 48 h inkubiert. Die von den Viren produzierte antiangiogenetische Substanz diffundierte durch die Filtermembran hindurch und konnte somit 48 h lang kontinuierlich auf die CPAE Zellen einwirken. Nach 48 h wurden die CPAE Zellen auf den Glasplättchen mit 1% PFA fixiert, mit kalter Ethanol/Essigsäure (2:1, v/v) permeabilisiert, mit dem Enzym terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) und dem Substratpuffer inkubiert, danach der Antikörper zugegeben und die Farbreaktion ausgelöst. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Propidium Iodid (PI) Lösung. Von insgesamt 500 Zellen wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Zählen bei 400 x Vergrößerung unter dem Fluoreszenz Mikroskop (Nikon, Melville, NY) ermittelt.

2.8.6 Nachweis von VEGF/bFGF im Zellkulturüberstand und Aszites (ELISA)

Der Gehalt an VEGF bzw. bFGF Protein im Zellkulturüberstand und dem asservierten Aszites der genterapeutisch behandelten Mäuse wurde mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt. Der humane bzw. Maus VEGF Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) detektiert spezifisch die VEGF 165 Isoform und hat ein Detektionslimit von 5 pg/ml. Der bFGF Quantikine ELISA detektiert bFGF. Das Testprinzip beruht auf einer quantitativen Sandwich Enzym Immunoassay Technik. Der auf der Mikrotiterplatte gebundene VEGF/bFGF spezifische Antikörper bindet das bFGF/VEGF aus der Testlösung/Standardlösung. Nach Entfernen ungebundener Substanzen wird ein Enzym-gebundener polyklonaler bFGF/VEGF spezifischer Antikörper zugefügt und zuletzt mittels einer Substratlösung eine Farbreaktion ausgelöst. Die Farbintensität (optische Dichte.) wird im ELISA Reader gemessen (Wellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 570 nm) und über den Vergleich mit der Farbintensität in den Standardreaktionslösungen die bFGF/VEGF Konzentration in den Testlösungen über ein Computerprogramm berechnet.

Um die Auswirkungen einer Therapie mit antiangiogenetischen Substanzen auf die VEGF/bFGF Expression von Tumorzellen zu untersuchen, wurden Tumorzellen (SKOV3 i.p., MDA MB 231, TA3, U87, 5×10^4 - 1×10^5) in 6 Loch Platten (3-fach Bestimmung) kultiviert, mit den antiangiogenetische Substanzen exprimierenden viralen Vektoren bzw. dem GFP Kontrollvektor mit einer MOI von 50-100 infiziert und nach 48 h Zellen und Zellkulturüberstand asserviert. Die Zellkulturüberstände wurden vor der Bestimmung filtriert, die Zellen mit EBC (50mM Tris 8, 120 mM NaCl, 0.5% NP40 + Proteaseinhibitoren) lysiert (30 min bei 4° schütteln), zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4°) und der die Proteine enthaltende Überstand bis zur Bestimmung tiefgefroren.

Der am Todestag frisch entnommene Aszites von tumortragenden Mäusen, die mit den viralen Vektoren behandelt worden waren, wurde mit Proteaseinhibitoren (Endkonzentration: PMSF 0.35 mg/ml, Aprotinin 210 KIU/ml, Leupeptin 5 µg/ml) versetzt, bei 180 x g über 20 min bei 4° zentrifugiert, sofort bei -80° tiefgefroren und erst kurz vor der Bestimmung aufgetaut. Die

VEGF/bFGF Bestimmung erfolgte laut Protokoll des Herstellers, die Auswertung erfolgte mit der Software des ELISA Readers (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.8.7 Nachweis der VEGF RNA Expression (Northern Blot)

Die Isolierung von Gesamt RNA aus TA3, MDA MB231, SKOV3 i.p. und U87 Tumorzellen, die zuvor entweder mit padGFP oder padPF4 (MOI 20-50, abhängig von der Zelllinie) infiziert worden waren, erfolgte mit dem TRIZOL Reagenz (Life Technologies, Rockville, MD). Die Zellen wurden zunächst in TRIZOL lysiert und homogenisiert. Durch Zugabe von Chloroform wurde die RNA von der DNA und den Proteinen getrennt, mittels Isopropanol präzipitiert, in Alkohol gewaschen und nach kurzem Trocknen in RNase freiem H₂O aufgelöst.

Pro Probe wurden 20 µg der Gesamt RNA in einem 1% Agarose-Formaldehyd Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nitrozellulose Filter übertragen. Nach UV-Cross-Linken der DNA und Prähybridisierung, erfolgte die Hybridisierung mit einer mit ³²P markierten VEGF₁₆₅ Probe. Nach ausgiebigen Waschschritten in SSC/SDS Waschlösungen in absteigenden Konzentrationen erfolgte die Photodokumentation auf einem Röntgenfilm.

2.8.8 Immunhistochemie/Fluoreszenzmarkierung

2.8.8.1 Faktor VIII Anfärbung

Zur Quantifizierung der Gefäßdichte in Tumor- und Peritonealgewebe von unbehandelten und behandelten Mäuse wurde eine immunhistochemische Untersuchung des fixierten Gewebes mit dem endothelzellspezifischen Von Willebrand Faktor (Faktor VIII) Antikörper durchgeführt (Dako, Carpinteria, CA). In Paraffin eingebettetes Tumorgewebe, das den tumortragenden mit den viralen Vektoren behandelten bzw. mit dem GFP Kontrollvektor injizierten Tieren zu bestimmten Zeitpunkten entnommen worden war (s. 2.9 Tierversuche), wurde geschnitten, auf Objektträger aufgebracht, mit Xylen entparaffiniert und mit 100% Alkohol rehydriert, mit H₂O₂ geblockt, gefolgt von einem Verdau mit Protease (Typ 24 0,025%, Sigma) zur Demarkierung der

Antigene (5 min, RT) und Blocken der unspezifischen Proteine (Dako Protein Block). Anschließend erfolgte die Antigen-Antikörperreaktion mit der Avidin Biotin Technik (Vectastain Universal Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) in einer feuchten Kammer bei RT:

1. Primärer Antikörper: polyklonaler Kaninchenantikörper gegen das Faktor VIII-assoziierte Antigen (Dako), 1:500, 1 h, Waschen
2. Sekundärer Antikörper: biotinyliertes Ziege gegen Kaninchen Immunglobulin (Dako), 1:500, 30 min, Waschen
3. ABC Reagenz (Avidin Lösung, biotinylierte Meerrettichperoxidase), 30 min, Waschen
4. Farbreaktion mit DAB (3,3'Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) (5 min)

Die Objektträger wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Gefäßdichte in Gegenden mit eindeutiger Peritonealkarzinose bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt. Die Gefäßdichte wurde über den Mittelwert von 5 ausgezählten Gesichtsfeldern pro Objektträger (pro Tier und Vektor wurden jeweils 3 Objektträger gefärbt) ermittelt.

2.8.8.2 Apoptosenachweis im Gewebe

Der Effekt der antiangiogenetischen Substanzen auf die Apoptoserate von Zellen in vivo wurde über ein immunhistochemische Anfärbung der Peritonealgewebeschnitte mit dem unter 2.8.5 beschriebenen ApopTag plus in situ Apoptose Kit durchgeführt. Die Farbreaktion erfolgte unter Anwendung von DAB und die Gegenfärbung mit Methylengrün. In Abschnitten mit Peritonealkarzinose wurde die Anzahl apoptotischer Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung in fünf zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bestimmt und ein Mittelwert gebildet.

2.8.8.3 TRITC Markierung von rekombinantem PF4 Protein

Rekombinantes PF4 Protein und TAT-LFG Kontrollprotein (Bachem, King of Prussia, PA) wurde mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert, um das Protein intrazellulär nachzuweisen. Das Kontrollprotein TAT-LFG wurde

gewählt, weil durch das TAT-Signal von HIV eine sichere intranukleäre Penetration des Proteins in hoher Konzentration gewährleistet war. TRITC (Tetramethylrhodamine Isothiocyanat, Pierce, Rockford, IL) wurde in DMSO aufgelöst, das zu markierende PF4 Protein bzw. TAT-LFG mit Konjugationspuffer (100mM Karbonat/Bikarbonat Puffer, pH 9.0) und FITC für eine Stunde bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (SKOV3 i.p., TA3, U87, MDA MB231, HUVEC) mit dem markierten PF4 Protein/TAT-LFG in verschiedenen Konzentrationen (10 µg/µl - 200 µg/µl) über 2 h inkubiert, fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

2.9 Tierversuche

2.9.1 Vorversuche zur Etablierung der Tumormodelle

Alle Tierversuche wurden entsprechend den Richtlinien des "Animal Research Advisory Committee" der National Institutes of Health, Bethesda, MD und des Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA nach Genehmigung eines Tierversuchsantrages in den entsprechenden Tierhaltungsräumlichkeiten unter sterilen Bedingungen in einer Lamina Air Flow Einrichtung durchgeführt.

In Vorversuchen wurden zunächst 4-6 Wochen alte athymische Nacktmäuse (NCr-nu^fBR, Taconic, Germantown, MD) zur Etablierung eines verlässlichen Ovarialkarzinommodells bzw. Erzeugung einer Peritonealkarzinose/Aszites mit einer unterschiedlichen Anzahl Tumorzellen injiziert und der Verlauf der Erkrankung dokumentiert (Klinik wie Aktivität, Fressverhalten, Gewicht, Bauchumfangszunahme, Anorexie, Tumormassen, Todeszeitpunkt, Aszites- und Tumormenge am Todestag). Die Vorversuche wurden mit SKOV-3, SKOV-3 i.p., MDAH 2774, PA1, ES-2 (Ovarialkarzinommodelle) und TA3, MOT, Ehrlich Lettre und MM2 (Aszitesmodelle) in Dosierungen von 1×10^6 bis 5×10^7 Tumorzellen i.p. durchgeführt. Letztendlich erwiesen sich das SKOV-3 i.p. Ovarialkarzinommodell mit 10^7 Zellen, das TA3 Aszitesmodell mit 10^6 Zellen und das ES-2 Klarzellkarzinommodell des Ovars mit 10^6 Tumorzellen i.p. am verlässlichsten, da die Angehörigen für alle drei Modelle in Versuchsreihen mit je 20 Tieren sehr hoch (95-100%) und der Verlauf der Erkrankung äußerst konstant war: TA3 Mäuse entwickelten nach 10-12 Tagen massiven Aszites

und starben wenige Tage später an Anämie (blutiger Aszites). SKOV3 i.p. Mäuse lebten wesentlich länger (ca. 20 Tage) und verstarben an den Tumormassen und Anorexie (klinisch wie ein Stadium III des Ovarialkarzinoms). Mäuse mit einem ES-2 Klarzellkarzinom entwickelten innerhalb von ca. 14 Tagen zellreichen, dickflüssigen Aszites und intraperitoneale gel-artige Tumormassen und starben rasch 4-5 Tagen später.

Die Toleranzschwelle für die intraperitoneale Virusapplikation wurde in Vorversuchen mit bis zu 5×10^9 PFU pro Tag und Injektion ermittelt. Bei der Gabe von 10^{10} PFU kam es zum spontanen Exitus von mehreren Tieren innerhalb von 24 h, so dass die therapeutischen Vektorinjektionen mit 10^9 PFU pro Injektion pro Virus erfolgten (Gesamtdosis 2×10^9).

2.9.2 Untersuchungen zur Verteilung der viralen Vektoren und Proteinexpression *in vivo*

Um die Effizienz und anatomische Verteilung der adenoviralen Transduktion und Expression des Transgenes *in vivo* nach intraperitonealer Injektion der viralen Vektoren zu demonstrieren, hatten wir einen LacZ-exprimierenden adenoviralen Vektor (padLacZ, 10^9 PFU) in tumortragende Mäuse (SKOV3 i.p.) i.p. injiziert und die Tiere 48 h später seziiert. Die Organe und Peritoneum wurden fixiert, in X-Gal Lösung (2mM MgCl, 5mM Kaliumferrocyanid, 5mM Kaliumferricyanid, 1 mg/ml X-gal in PBS) 2 h bei 37° inkubiert und das Ergebnis photodokumentiert.

2.9.3 Technik der Inokulation der Tumorzellen und adenoviralen Vektoren

Die Tumorzellen wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn frisch ausgesät, um die Zellen in die Exponentialphase des Wachstums zu bringen. Am Tag der Injektion wurden sie trypsiniert, zentrifugiert (1000 rpm, 10 min), 3x mit PBS gewaschen, gezählt und die jeweilige Tumorzellzahl pro Tier in einem Injektionsvolumen von 200 µl reinem DMEM ohne Zusätze aufgelöst. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mit einer Insulinspritze in den rechten Unterbauch der Nacktmäuse. Die Injektion der antiangiogenetischen adenoviralen Vektoren erfolgte ebenfalls intraperitoneal in einer Dosis von

1×10^9 PFU in 100 μ l HBSS (Hanks balanced salt solution) in den linken Unterbauch der Tiere.

2.9.4 Modelle zur Gentherapie des malignen Aszites mit antiangiogenetischen viralen Vektoren

Das Vorhandensein eines signifikanten therapeutischen Effektes einer antiangiogenetischen Gentherapie bei malignem Aszites wurde zunächst in Vorversuchen im TA3 Mausmammakarzinomaszitesmodell in Form einer intraperitonealen Applikation von padPF4 nachgewiesen. Aufgrund der in der Wiederholung gut reproduzierbaren Ergebnisse mit einem deutlichen Überlebensvorteil der antiangiogenetisch behandelten Tiere wurde eine große Serie von Tierversuchen in drei verschiedenen Tiermodellen mit malignem Aszites unter folgenden Fragestellungen konzipiert:

1. Kann eine antiangiogenetische Gentherapie die Produktion von malignem Aszites bei metastasierendem Ovarial- und Mammakarzinom verhindern/reduzieren?
2. Kann eine antiangiogenetische Gentherapie das Tumorwachstum bei metastasierendem Ovarial- und Mammakarzinom verhindern oder verlangsamen?
3. Ist eine Kombinationstherapie mit zwei antiangiogenetischen Viren einer Monotherapie überlegen?
4. Führt die antiangiogenetische Gentherapie zu einem signifikanten Überlebensvorteil?
5. Hat der Zeitpunkt des Beginnes der Gentherapie einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis?
6. Welche Nebenwirkungen hat eine solche Therapie?

Zur Etablierung der intraperitonealen Tumore wurden zunächst je 80 Tiere am Tag 0 mit SKOV-3 i.p. und TA3 und 64 Tiere mit ES-2 Tumorzellen in der oben genannten Dosierung i.p. injiziert. Die 80 bzw. 64 Tiere eines Tumormodelles wurden jeweils in 8 verschiedene Therapiearme unterteilt (n=10 Tiere pro Therapiearm bei SKOV3 und TA3, n=8 Tiere pro Therapiearm bei ES-2).

Monotherapien

Kombinationstherapien

Arm 1 (Kontrolle): padGFP + pad β -gal

Arm 2: padAngio + pad GFP

Arm 3: padEndo + pad GFP

Arm 4: padPF4 + padGFP

Arm 5: pAdAngio/Endo + padGFP

Arm 6: padAngio + padEndo

Arm 7: padAngio + padPF4

Arm 8: padEndo + pad PF4

Tabelle 9: Definition der Vektor Mono- bzw. Kombinationstherapien

Der Zeitpunkt des Behandlungsbeginneres, die Anzahl der therapeutischen Injektionen und die Dauer der Behandlung wurde in den drei unterschiedlichen Tumormodellen variiert (präventiver oder therapeutischer Ansatz) um die bestmögliche Behandlungsstrategie zu evaluieren. Der Verlauf eines jeden Versuches ist schematisch in Abb. 8 skizziert.

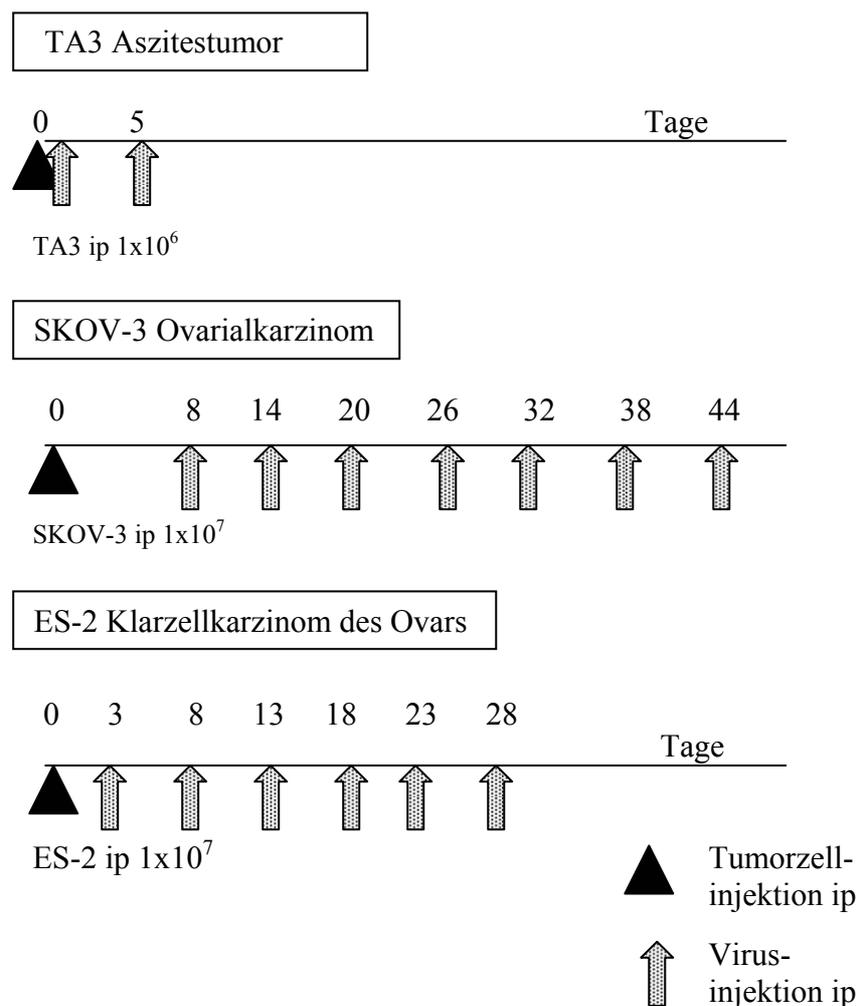


Abb. 8: Schematische Darstellung der Behandlungsabläufe in den drei Tumormodellen

Die Tiere wurden täglich auf Anzeichen von Aszites und Tumorentstehung kontrolliert und der Zeitpunkt des Todes dokumentiert. Tiere, die aufgrund des Tumorleidens nicht mehr fähig waren zu fressen oder schwer krank erschienen, wurden entsprechend der Tierschutzrichtlinien mit CO₂ Narkose getötet. Aszitesmenge, -farbe und Tumorgößen wurden gemessen und dokumentiert. Aszitesflüssigkeit wurde zur VEGF und bFGF Bestimmung entsprechend der Angaben in 2.8.6 asserviert und bei –80° eingefroren.

2.9.5 Tierversuche zur Asservierung von Gewebe für immunhistochemische Färbungen

Jeweils 6 Tiere pro Behandlungsarm wurden am Tag 0 mit 10⁶ TA3 Tumorzellen i.p. injiziert und gleichzeitig 10⁹ PFU padAngio, padEndo, padPF4, padAngio/Endo oder padGFP (Kontrollgruppe) verabreicht. Jeweils 2 Tiere pro Behandlungsarm wurden an Tag 5, 9 und 13 getötet, Peritoneum und Tumorgewebe (falls vorhanden) fixiert (4% PFA), in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte für immunhistochemische Untersuchungen angefertigt.

2.10 Statistik

Zum Vergleich der Differenzen der Mittelwerte innerhalb einer Vektorgruppe wurden Varianzanalysen durchgeführt (ANOVA). Ein einseitige Varianzanalyse wurde eingesetzt, wenn der Vektor die alleinige Variable darstellte, bei Vorliegen von zwei Variablen wurde eine zweiseitige Varianzanalyse durchgeführt. Die Werte wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft, falls eine nicht normalverteilte Wertemenge vorlag, erfolgte z.T. eine logarithmische Transformation der Rohdaten. Mittels F-Test (ANOVA F-Test) wurde auf einen Gesamtunterschied über alle Vektoren getestet. Um mehrere verschiedene Behandlungsarme gegen einen Kontrollarm (padGFP) zu vergleichen, wurde über die Dunnett'sche Mehrfachvergleichstestung adjustiert (Fleiss, 1986). Dieser Test kontrolliert den Typ I Fehler im Gesamtexperiment und wurde speziell erarbeitet, um mehrere Behandlungsarme gegen einen Kontrollarm vergleichen zu dürfen. Ein Unterschied wurde dann als signifikant definiert, wenn das zweiseitig korrigierte 95% Konfidenzintervall eines Unterschiedes den Nullwert ausschloss. Dies entsprach einem Gesamt-Typ I Fehler von 0.05.

Um zu testen, ob ein Zusammenhang zwischen Aszitesvolumen und Gesamtüberleben der Tiere bestand, wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt (ANCOVA). Da die Überlebenszeiten der Tiere auf der logarithmischen Skala normalverteilt waren, wurden die logarithmischen Werte zur Berechnung herangezogen. Zunächst wurde getestet, ob die einzelnen Behandlungsarme einen Einfluss auf das Aszitesvolumen oder das Überleben hatten. Nachdem dieser Einfluss ausgeschlossen worden war, wurde unabhängig von der Art der Behandlung getestet, ob über die Aszitesmenge am Todestag die Überlebenszeit voraussagesagt werden konnte. Mittels log-rank Analyse wurden sowohl die Überlebenszeiten aller Gruppen verglichen als auch paarweise das Überleben einer einzelnen Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (unter Bonferroni Adjustierung, sieben Vergleiche). Ein p Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Eine Interaktion zwischen den verschiedenen Behandlungsarmen und den Untersuchungen wurde mittels des Cox Proportional Hazard-Modells untersucht. Das Gesamtüberleben der Tiere wurde nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vektor vermittelte Expression und Sekretion der antiangiogenetischen Proteine in vitro

Nachdem die vier adenoviralen Vektoren padAngio, padEndo, padPF4 und padAngio/Endo kloniert und mittels Sequenzierung die Gensequenz kontrolliert worden war, wurde im nächsten Schritt in einer Western Blot Analyse überprüft, ob und in welcher Höhe die antiangiogenetischen Proteine durch diese adenoviralen Vektoren exprimiert und sezerniert wurden.

Tumorzellen wurden in vitro mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren mit ansteigender MOI (MOI 1, 20, 50 und 100) infiziert und am nächsten Morgen die Infektionseffektivität in jeder Zellkulturschale über die GFP Expression im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Zum Nachweis der Sekretion der exprimierten Proteine aus den Zellen, wurde 48 h später der Zellkulturüberstand einer jeden Kulturschale filtriert und asserviert. Die Herstellung eines Zellysates diente dem Nachweis der intrazellulären Proteinexpression. Mittels Western Blot Analyse konnte sowohl im Proteinzellysat als auch im Zellkulturüberstand die von den viralen Vektoren exprimierten Proteine Angiostatin, Endostatin, PF4 und das Fusionsprotein Angio/Endo über den eingefügten HA-Tag mit einem HA spezifischen Antikörper nachgewiesen werden: in mit padAngio infizierten Zellen/Zellkulturüberstand wurde eine spezifische Bande bei 69 kDa nachgewiesen, das exprimierte/sezernierte Endostatin Protein wies eine erwartete Proteingröße von 20 kDa auf, PF4 konnte über eine Bande bei 14 kDa identifiziert werden. Interessanterweise wurde im ersten Schritt der Endostatin Vektor ohne ein Signalpeptid kloniert. Dieser Vektor exprimierte das Endostatinprotein in der Zelle, im i.p. Western Blot konnte jedoch im Zellkulturüberstand kein Endostatin nachgewiesen werden, so dass der Endostatin Vektor unter Einfügen des Signalpeptides (padsigEndoHA) neu kloniert wurde mit dem hier gezeigten Ergebnis. Die Infektion von Zellen mit dem adenoviralen padAngio/Endo Vektor führte zur Expression eines mit dem HA Antikörper nachweisbaren 90 kDa Proteins, was der erwarteten Summe aus Angiostatin (69 kDa) und Endostatin (20 kDa) entsprach (Abb. 9).

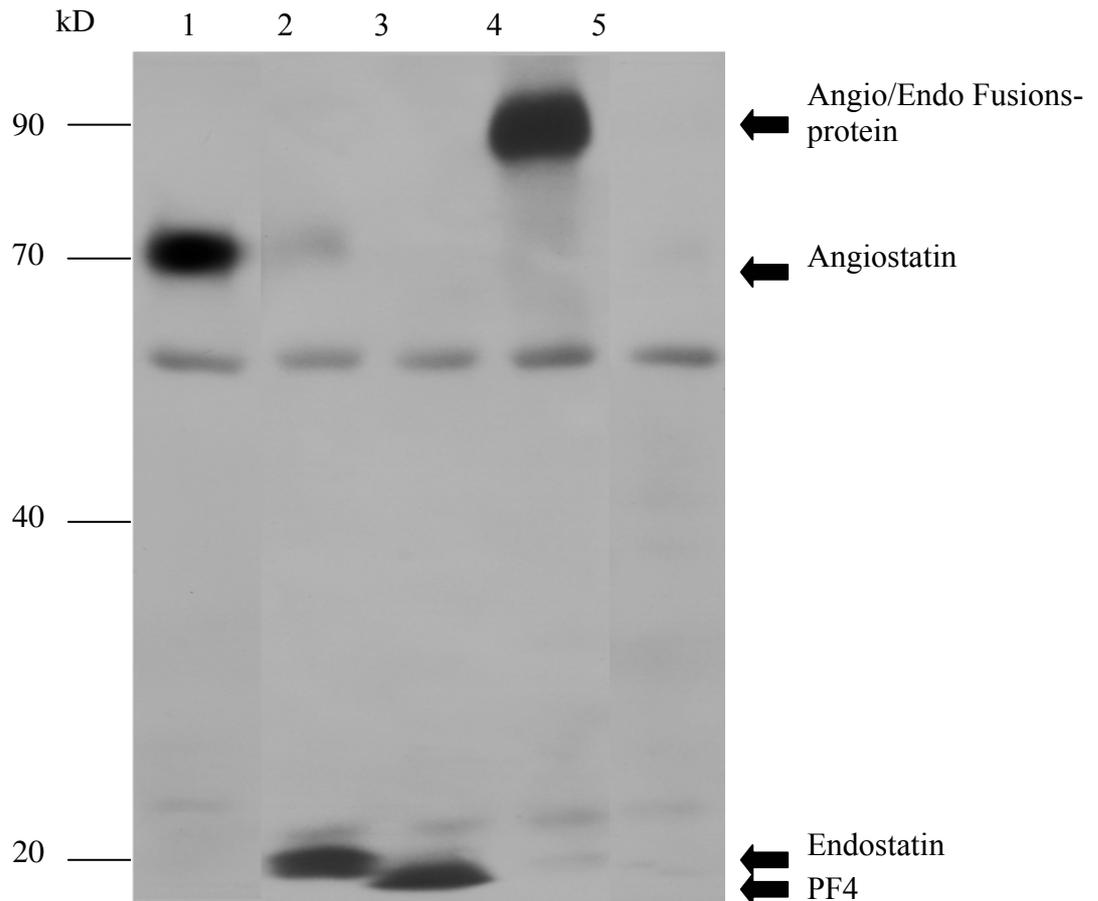


Abb 9: Expression und Sekretion der antiangiogenetischen Proteine durch die adenoviralen Vektoren (Western Blot Analyse). Die sezernierten Proteine aus Tumorzellen (TA3), die mit padAngio (Spalte 1), padEndo (Spalte 2), padPF4 (Spalte 3) oder padAngio/Endo (Spalte 4) (jeweils MOI 50 über 48h) infiziert worden waren wurden durch einen i.p. Western Blot unter Einsatz von HA Antikörpern identifiziert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine gute Korrelation zwischen Anzahl infizierter Zellen (und somit der MOI) und Menge der sezernierten Proteine bestand: die Expression der sezernierten Proteine von mit MOI 1 infizierten Zellen war gering ausgeprägt, die exprimierte Proteinmenge nahm mit zunehmender MOI deutlich zu und auch über die Dauer der Infektion (24 h, 48 h, 72 h) konnte erwarteterweise die Expression gesteuert werden In Abbildung 10 ist beispielhaft dieser Effekt in einer Western Blot Analyse für Angiostatin dargestellt.

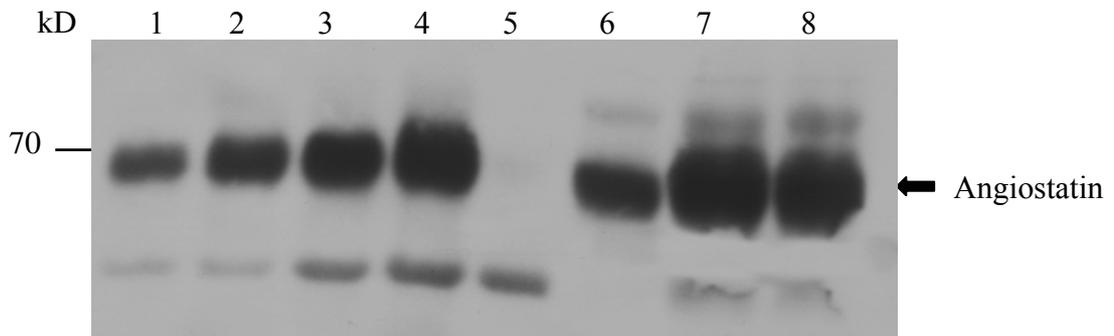


Abb. 10: Zunehmende Expression von Angiostatin nach Transduktion von TA3 Tumorzellen mit ansteigenden MOI's von padAngio: MOI 1 (Spalte 1), MOI 20 (Spalte 2), MOI 50 (Spalte 3), MOI 100 jeweils über 48 h (Spalte 4), negative Kontrolle (Spalte 5). Weiterhin ist die ansteigende Expression bei MOI 100 in Abhängigkeit von der Dauer der Transduktion in Spalte 6 (24 h), 7 (48 h) und 8 (72 h) dargestellt.

Somit war der Beweis erbracht, dass alle klonierten Konstrukte die entsprechenden Proteine exprimieren und in die Umgebung sezernieren, d.h. die angefügten Signalpeptide ihre Funktion erfüllen. Die Funktionalität der HA Tags in allen vier Konstrukten konnte über den Nachweis einer spezifischen Bande in der Western Blot Analyse mit einem HA Antikörper demonstriert werden. Über die biologische Funktionalität geben die im weiteren beschriebenen Experimente Auskunft.

3.2 Biologische Aktivität der exprimierten antiangiogenetischen Proteine in vitro

Antiangiogenetische Substanzen wie Angiostatin, Endostatin und PF4 üben spezifische Funktionen aus, u.a. :

1. führen sie zur Proliferationshemmung von Endothelzellen (O'Reilly *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1997)
2. hemmen die Migration von Endothelzellen (Yamaguchi *et al.*, 1999) und
3. führen zur Apoptose von Endothelzellen (Claesson-Welsh *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1998; Dhanabal *et al.*, 1999).

Um die biologische Funktionalität der von unseren adenoviralen Vektoren exprimierten antiangiogenetischen Proteine nachzuweisen, wurde deshalb ein Proliferationstest und ein Migrationstest durchgeführt, sowie die apoptoseinduzierende Wirkung von Angiostatin und Endostatin und fraglich von PF4 im Zellzytotoxizitätstest sowie immunhistochemisch getestet.

3.2.1 Hemmung der Proliferation von Endothelzellen

Antiangiogenetische Substanzen hemmen spezifisch die Proliferation von Endothelzellen, aber nicht von Tumorzellen. Mitogen (ECGF, Sigma) stimulierte HUVEC Zellen wurden in konditioniertem Medium von Zellen, die 48 h zuvor entweder mit den vier Einzelvektoren oder der Kombination von zwei Vektoren transduziert worden waren, kultiviert. Die Ergebnisse wurden im Vergleich zu HUVEC gemessen, die mit 48 h altem Medium von mit padGFP infizierten Zellen kultiviert worden waren. Unter identischem Versuchsansatz wurden Tumorzellen mit den konditionierten Medien behandelt.

Abbildung 11 a zeigt, dass die mitogen stimulierte HUVEC Proliferation durch die exprimierten, antiangiogenetischen Proteine in den konditionierten Medien zwischen 30% (padPF4) und 41% (padAngio) im Vergleich zu konditioniertem Medium von padGFP gehemmt wurde (* 95% Konfidenzintervall, $p < 0.05$).

a.)

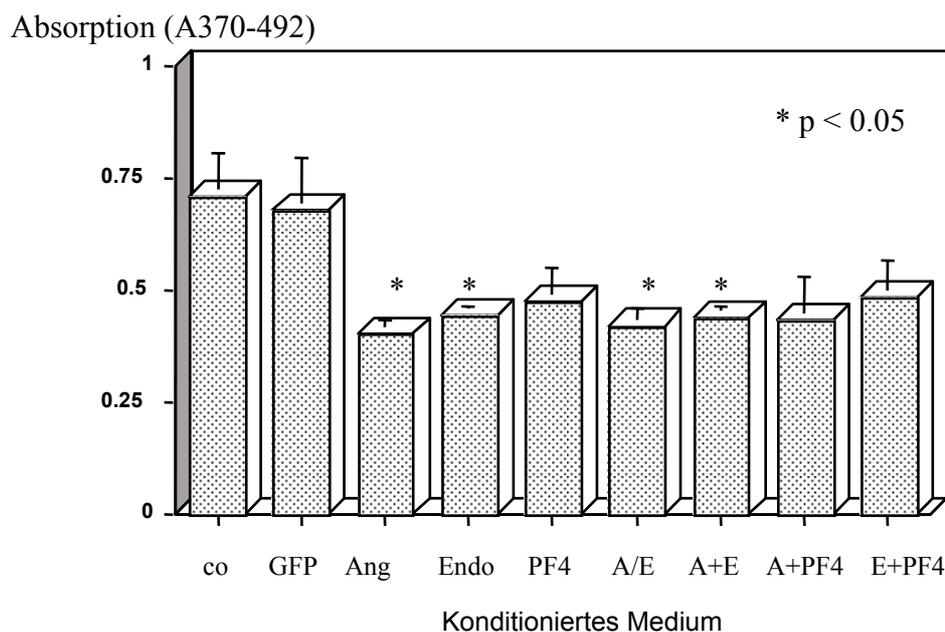


Abb. 11 a: In vivo Funktionstest der adenoviralen Vektoren mittels Proliferationstest (BrdU). Die Proliferation von HUVE Zellen wurde durch die von den adenoviralen Vektoren sezernierten antiangiogenetischen Proteine Angiostatin (Ang bzw. A), Endostatin (Endo bzw. E), PF4, dem Fusionsprotein (A/E) oder deren Kombinationen (A+E, A+PF4, E+PF4) z.T. signifikant ($p < 0.05$) gehemmt. Dargestellt ist die mittlere Extinktion mit Standardabweichung aus drei verschiedenen Untersuchungen im Vergleich zum GFP exprimierenden Adenovirus.

Dass diese proliferationshemmende Eigenschaft der antiangiogenetischen Substanzen EC spezifisch war, ließ sich über den fehlenden Effekt auf Tumorzellen nachweisen (Abb. 11 b). Ein synergistisch oder additiver Effekt bei der Applikation des Gemisches von zwei antiangiogenetischen Proteinen ließ sich im BrdU nicht nachweisen.

b.)

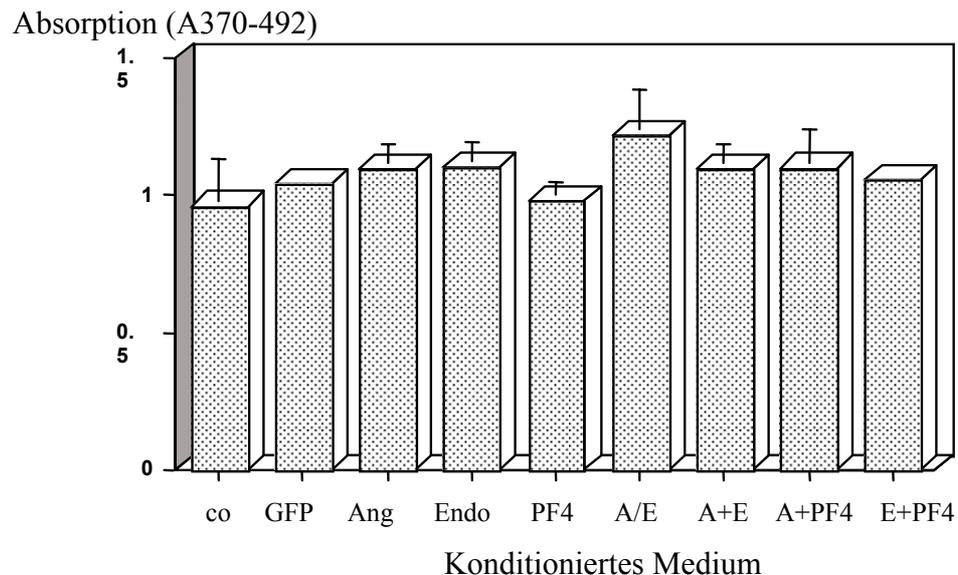


Abb. 11 b: In vivo Funktionstest der adenviralen Vektoren mittels Proliferationstest (BrdU). Kein Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen (TA3) durch die von den adenviralen Vektoren sezernierten antiangiogenetischen Proteine Angiostatin (Säule 3), Endostatin (Säule 4), PF4 (Säule 5) und dem Fusionsprotein. Dargestellt ist die mittlere Extinktion mit Standardabweichung aus drei verschiedenen Untersuchungen im Vergleich zum GFP exprimierenden Adenovirus.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die von den adenviralen Vektoren exprimierten antiangiogenetischen Substanzen Angiostatin, Endostatin, PF4 und das Fusionsprotein Angio/Endo biologisch aktiv sind und ihre antiproliferative Wirkung spezifisch an Endothelzellen entfalten.

3.2.2 Migrationshemmung von Endothelzellen

In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, dass Angiostatin und Endostatin die durch bFGF oder VEGF angeregte Wanderung von HUVE Zellen hemmen (Claesson-Welsh *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1998; Dhanabal *et al.*,

1999; Yamaguchi *et al.*, 1999). Bislang gab es noch keine Daten bezüglich PF4 und des Fusionsproteins Angio/Endo. Wir führten deshalb Migrationsuntersuchungen mit HUVE Zellen unter Anwendung von konditioniertem Medium von mit padAngio, padEndo, padPF4 und padAngio/Endo transduzierten HUVECs durch. Als stärkstes Chemoattractant für HUVECs erwies sich VEGF, während die Wanderung gegen bFGF und ECGF etwas weniger stark ausgeprägt war. Die migrationshemmende Wirkung von Angiostatin und Endostatin konnten wir mit den von unseren viralen Vektoren sezernierten Proteinen bestätigen, erwarteterweise zeigte auch das Fusionsprotein eine migrationshemmende Wirkung (Abb. 12 schwarze Säule) und interessanterweise konnten wir sie auch für das bislang nicht untersuchte PF4 Protein nachweisen. Diese Ergebnisse waren eine weitere Bestätigung für die Aktivität der von den viralen Vektoren produzierten Proteine.

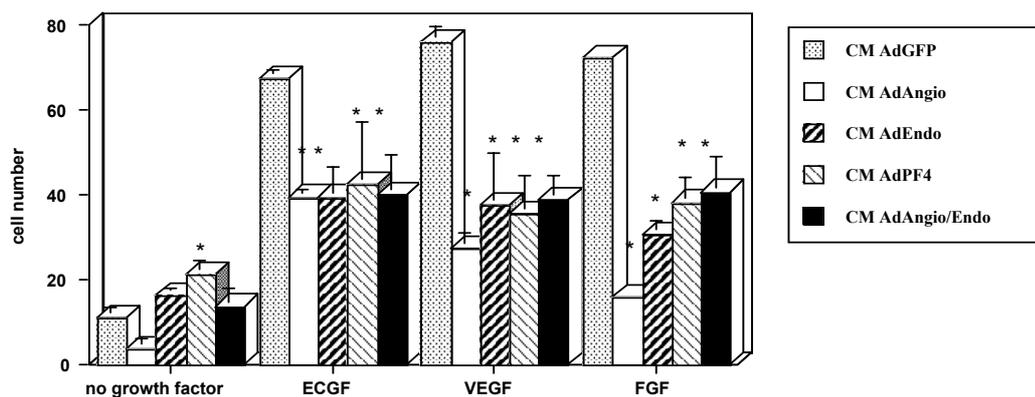


Abb 12: Hemmung der Wachstumsfaktor-stimulierten HUVEC Migration durch konditioniertes Medium von EC, die mit den adenoviralen Vektoren padAngio (weiße Säule), padEndo (dick gestreifte Säule), padPF4 (dünn gestreifte Säule) und padAngio/Endo (schwarze Säule) 48 h zuvor transduziert worden waren. Die Wanderung der HUVEC wurde durch die drei Wachstumsfaktoren ECGF (2. Säulenblock), VEGF (3. Säulenblock) und FGF (4. Säulenblock) stimuliert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 10 ausgezählten Gesichtsfeldern bei 400 - facher Vergrößerung dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger Varianzanalyse im Vergleich zur Zahl der gewanderten Zellen im konditionierten Kontrollmedium (CM von mit padGFP infizierten Zellen). Es fand sich ein signifikanter Unterschied bei allen antiangiogenetische Substanzen enthaltendem CM im Vergleich zum GFP CM (* 95% Konfidenzintervall, $p < 0.05$).

3.2.3 Einfluss auf die Vitalität von Endothelzellen (MTT)

In einem letzten Schritt wurde die Funktionalität der antiangiogenetischen Substanzen über die Beeinflussung der Vitalität von Endothelzellen getestet. In dem Zellzytotoxizitätsassay MTT konnten wir nachweisen, dass die von den Viren sezernierten Proteine Endostatin, PF4 und das Fusionsprotein eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bedingen (34% - 36%), eine additive oder synergistische Wirkung der Kombinationen war auch hier nicht nachweisbar (Abb. 13 a). Auf die Tumorzelllinie TA3 übten die antiangiogenetischen Substanzen keinen zytotoxischen Effekt aus (Abb. 13 b).

Im TUNEL Assay (Abb. 13 c) konnten die typischen bei der Apoptose entstehende Bruchstücke der Zellkern DNA mikroskopisch nachgewiesen werden, wenn Angiostatin und Endostatin auf Endothelzellen einwirkten. Auch das bisher nicht im TUNEL Assay untersuchte PF4 und das Fusionsprotein wiesen apoptoseinduzierende Funktionen auf (Abb. 13 c, Spalte e und f).

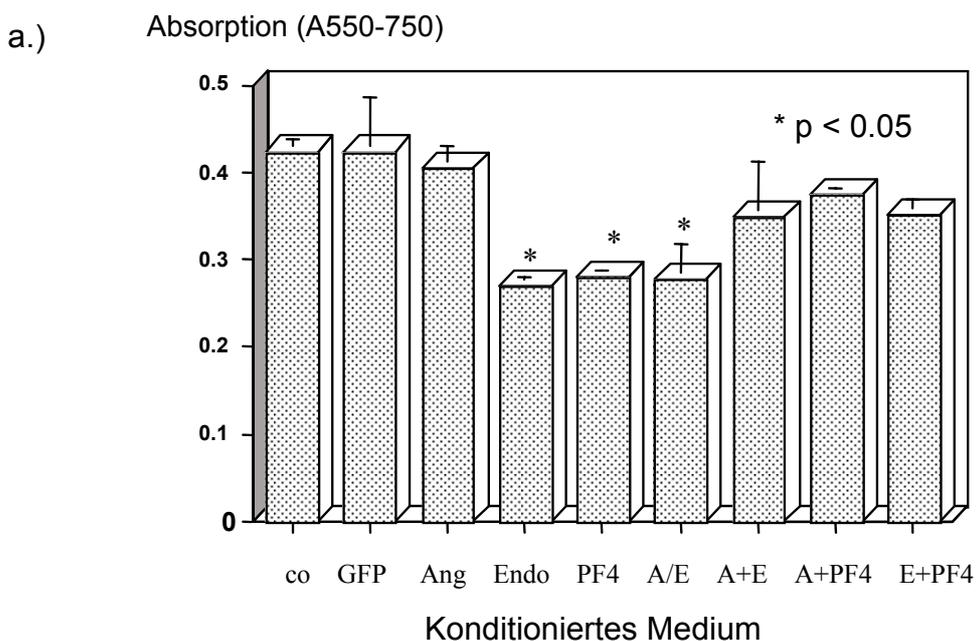


Abb. 13:

a.) Nachweis der durch die antiangiogenetischen Proteine Angiostatin (Ang bzw. A), Endostatin (Endo bzw. E), PF4 und des Fusionsproteins (A/E) sowie deren Kombinationen induzierten Endothelzelltodes (an HUVEC) im MTT Test. Die Daten entsprechen den Mittelwerten +/- Standardabweichung aus der dreifachen Bestimmung der Absorption im MTT Test. Die Daten wurden mittels einseitiger Varianzanalyse statistisch analysiert ($p < 0.05$, * 95 % Konfidenzintervall im Vergleich zu padGFP unter Ausschluss von 0)

b.) Keine Zellzytotoxizität (MTT Test) der Proteine auf TA3 Tumorzellen

b.) Absorption (A550-750)

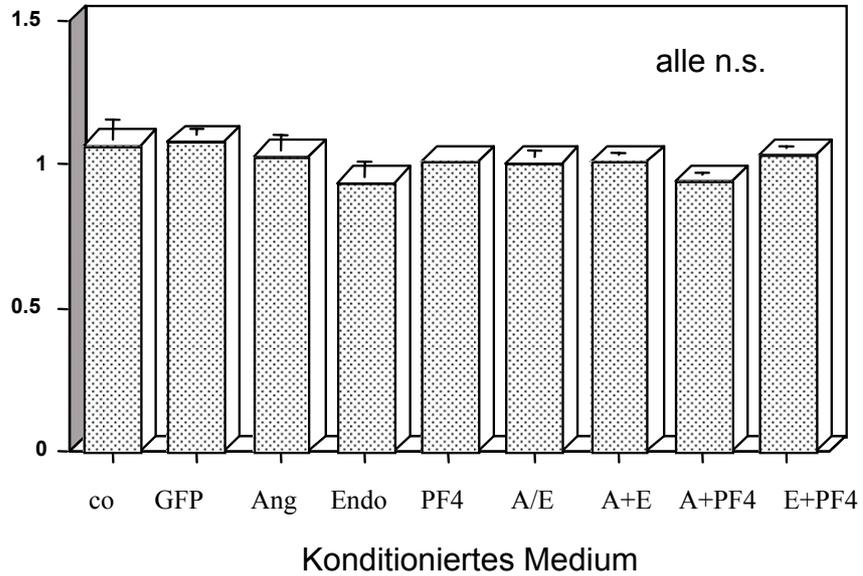
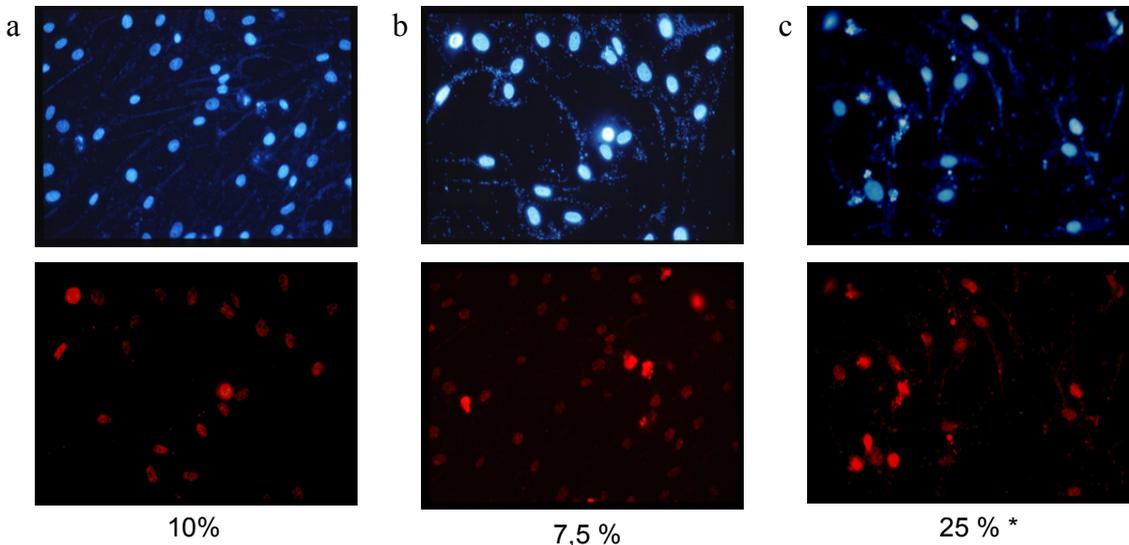


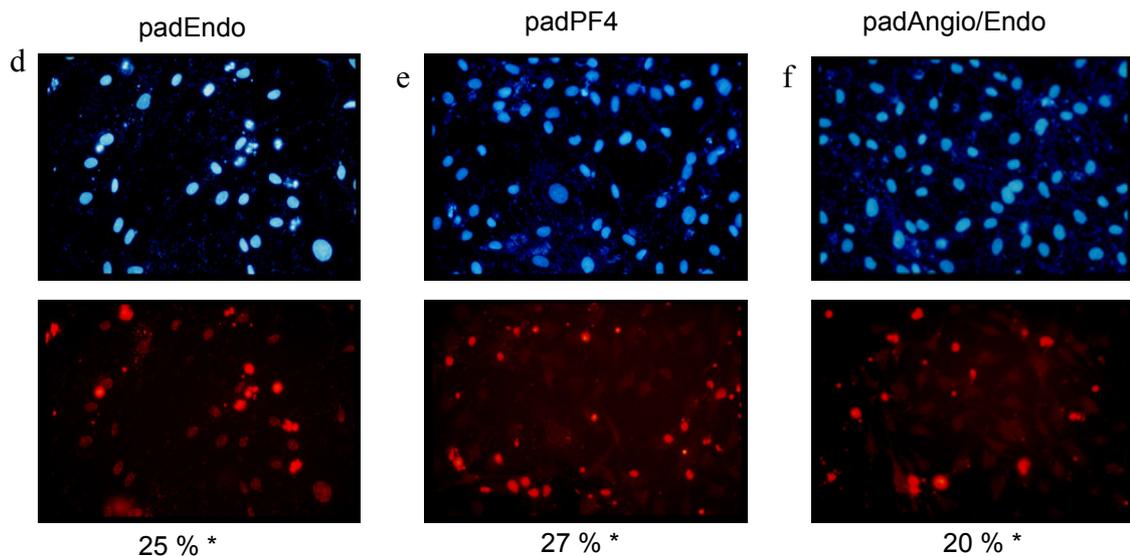
Abb 13 c (siehe unten): Nachweis der apoptoseinduzierenden Wirkung von padAngio (c), padEndo (d), padPF4 (e) und padAngio/Endo (f) auf EC (CPAE Zellen). Mittels ApopTag wurden die intrazellulären DNA Bruchstücke mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff markiert. Im oberen Bild jeder Serie wurden die Zellkerne mit PI (blau, obere Bildreihe) angefärbt, um den Anteil der apoptotischen Zellen (rot, untere Bildreihe) im Vergleich zur Gesamtzellzahl bestimmen zu können. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil an apoptotischen Zellen pro ausgezählten Zellen (control: 57/576; GFP 42/556; Angio 134/543; Endo 143/568; PF4 153/567; A/E: 104/506). Die Zunahme der Apoptose im Vergleich zum Kontrollvektor padGFP war signifikant (*) für alle 4 Vektoren ($p < 0.05$, ANOVA F-Test, 95% Konfidenzintervall)

c.) CPAE Kontrollzellen

padGFP

padAngio





Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir eindeutig die Funktionalität der von den vier konstruierten und klonierten Adenoviren exprimierten Proteine nachweisen konnten und somit den geplanten *in vivo* Versuchen nichts mehr im Wege stand.

3.3 Beeinflussung der VEGF Expression *in vitro* und *in vivo*

Die tumorzellspezifische Sekretion von VEGF/bFGF nach Infektion mit padAngio, padEndo, padPF4 und padAngio/Endo (padGFP als neg. Kontrolle) wurde im Zellkulturüberstand von verschiedenen mit den viralen Vektoren transduzierten und nicht transduzierten Tumorzelllinien (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Glioblastom) bestimmt. Die Ergebnisse der *in vitro* Daten sollten mit VEGF Bestimmungen im Aszites TA3-tumortragender und antiangiogenetisch behandelter Mäuse verglichen werden.

Zunächst wurde über Western Blot Analysen und VEGF Bestimmungen im Zellkulturmedium von diversen Tumorzelllinien der basale Spiegel an sezerniertem VEGF gemessen und drei Tumorzelllinien mit hoher VEGF Expression ausgewählt. Die humane Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 *i.p* (> 10.000 pg/ml), die humane Mammakarzinomzelllinie. MDA-MB 231 (ca. 8000 pg/ml) und die humane Glioblastomzelllinie U87 (> 10.000 pg/ml) erwiesen sich als hochexprimierende Zellen. Die Maustumorzelllinie TA3 wurde trotz der anscheinend niedrigen VEGF Produktion eingesetzt (> 1000 pg/ml), da diese Zelllinie für die Tierversuche ausgewählt worden war (hohe Tumorangehrate

und gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse). Die niedrige VEGF Konzentration im Überstand von TA3 (s. Abb. 14 b) beruhte auf der unterschiedlichen Empfindlichkeit des eingesetzten Maus- und humanen VEGF ELISA's, da im Western Blot unter Einsatz eines kreuzreaktiven (Human- und Mausreaktiv) VEGF Antikörpers für TA3 eine sehr hohe VEGF Produktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 14 a).

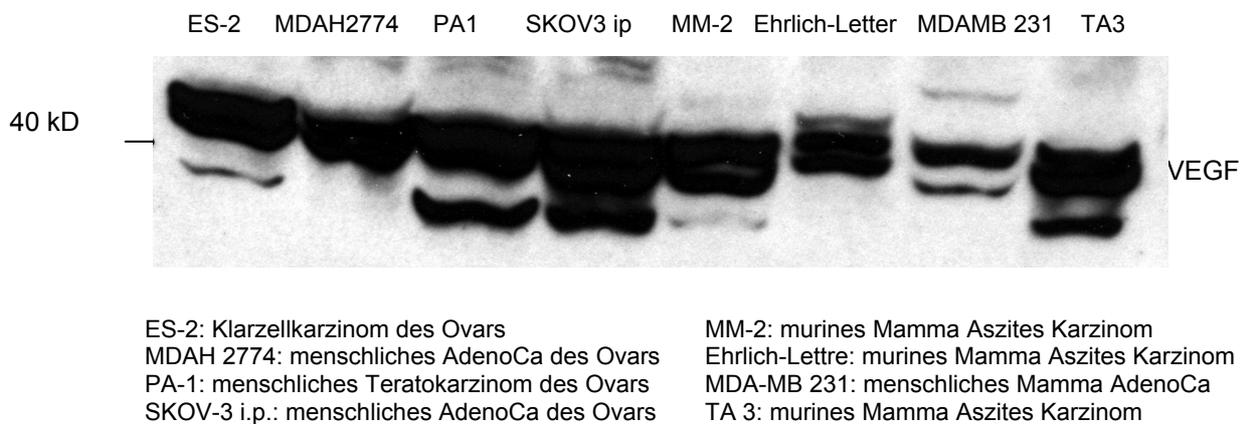


Abb. 14 a: Semi-quantitativer Vergleich der VEGF Expression unterschiedlicher Tumorzelllinien in einer Western Blot Analyse

Obwohl PF4 weder auf die Tumorzellviabilität noch auf deren Proliferation einen Einfluss ausübte (s. Abb. 11 b und Abb. 13 b), führte die Transduktion aller menschlichen und Maustumorzelllinien mit dem padPF4 Adenovirus zu einer VEGF Downregulation im Zellkulturüberstand dieser Zelllinien, während die Infektion mit den drei anderen Adenoviren nur geringen Effekt zeigte. (Abb. 14 b). Die PF4 bedingte Erniedrigung der VEGF Expression erwies sich als statistisch signifikant für alle Zelllinien im nicht-adjustierten Student t-test, wobei jedoch nach Adjustierung wegen multiplen Vergleichen die Ergebnisse nur für U87 und TA3 als signifikant bestätigt wurden.

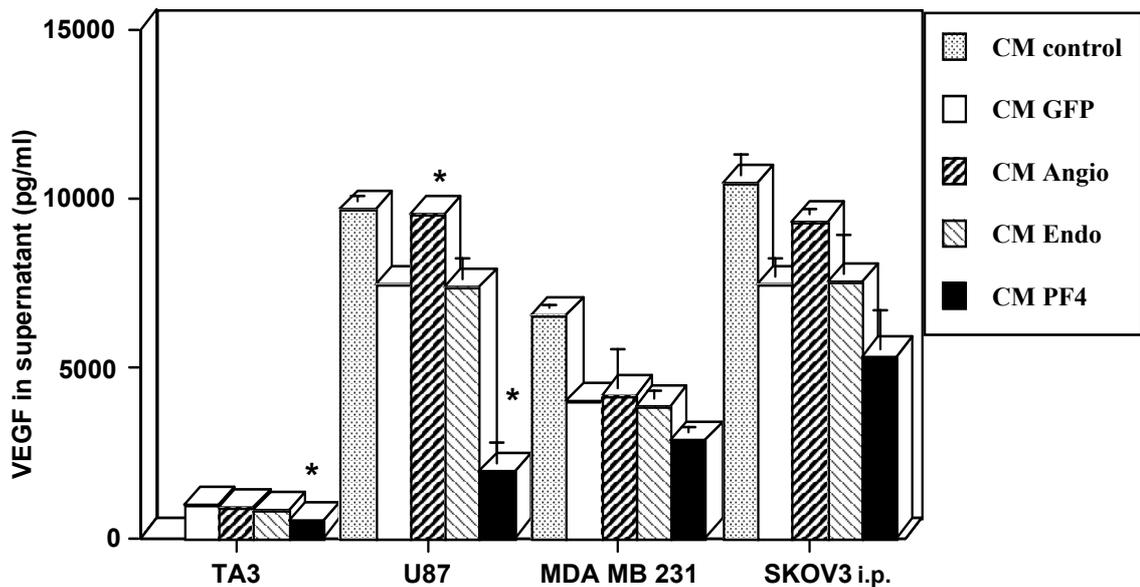


Abb. 14 b: In vitro Daten: VEGF Bestimmung mittels quantitativem ELISA (pg/ml) im Zellkulturüberstand verschiedener humaner und muriner Tumorzelllinien nach Infektion der Zellen mit padAngio (3. Säule), padEndo (4. Säule) oder padPF4. Die Säulen entsprechen dem Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem ANOVA F-Test (behandelte Zellen im Vergleich zu padGFP Kontrollzellen, * 95% Konfidenzintervall, $p < 0.05$).

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde die VEGF Konzentration im Aszites von tumortragenden, mit den antiangiogenetischen Adenoviren behandelten Mäusen bestimmt.

Übereinstimmend mit den in vitro Ergebnissen ließ sich nur in den mit padPF4 bzw. der Kombination von padEndo+padPF4 behandelten Tieren eine signifikante Erniedrigung des VEGF Spiegels im Aszites nachweisen (einseitiger ANOVA, 95% Konfidenzintervall im Vergleich mit padGFP unter Ausschluss von 0 (Abb. 14 c). Die anderen Viren konnten diesen Effekt nicht auslösen.

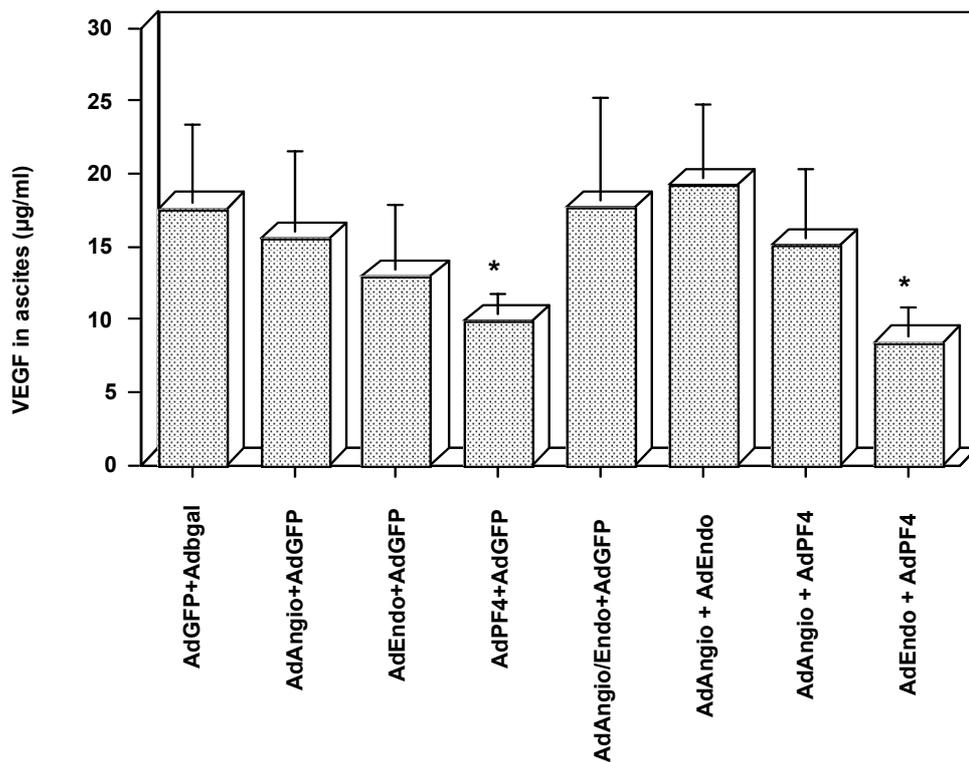


Abb. 14 c: In vivo Ergebnisse: Expression von VEGF in µg/ml im Aszites tumortragender Mäuse nach Behandlung mit padAngio (Säule 2), padEndo (Säule 3), padPF4 (Säule 4), padAngio/Endo (Säule 5) oder der Kombination von zwei Viren (Säule 6, 7, 8). Die Daten entsprechen den Mittelwerten +/- Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen im ELISA. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einseitigem ANOVA F-Test (behandelte Tiere im Vergleich zu padGFP behandelten Kontrollmäusen, * 95% Konfidenzintervall, $p < 0.05$).

Um zu untersuchen, ob der Mechanismus der PF4 induzierten Erniedrigung der VEGF Expression transkriptionell oder posttranskriptionell bedingt war, wurde die VEGF RNA Menge mittels Northern Blot Analyse und semi-quantitativer reverser Transkriptions-PCR untersucht. Es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Menge der VEGF mRNA nach Transduktion von Tumorzellen mit irgendeinem der adenoviralen Vektoren, PF4 eingeschlossen, nachweisen. Dieses negative Ergebnis wurde bestätigt, indem eine mit dem VEGF₁₆₅ Gen stabil transduzierte Tumorzelllinie 24 h später zusätzlich mit padPF4 transduziert wurde. Wie schon beim endogenen Protein konnte auch bei diesem Versuchsansatz die signifikante Erniedrigung von VEGF im Zellkulturüberstand durch PF4 bestätigt werden, die mRNA Spiegel blieben jedoch unverändert (Northern Blot Analyse).

Interessanterweise war die VEGF Konzentration im *Zellysat* von mit padPF4 transduzierten U87, TA3, MDA-MB 231 und SKOV3i.p. Tumorzellen unverändert im Vergleich zu nicht transduzierten Kontrollzellen trotz der Erniedrigung des *sezernierten* VEGF.

Um der Frage nachzugehen, ob dieser Effekt auch nach Inkubation der Zellen mit rekombinantem PF4 Protein auszulösen war, wurde kommerziell erhältliches, rekombinantes PF4 Protein mit TRITC markiert und damit die Zellen "behandelt". Fluoreszenzmikroskopisch konnte zunächst nachgewiesen werden, dass das rekombinante Protein in die Zellen eindringt und in geringem Ausmaß intranukleär lokalisiert war (Abb. 15).

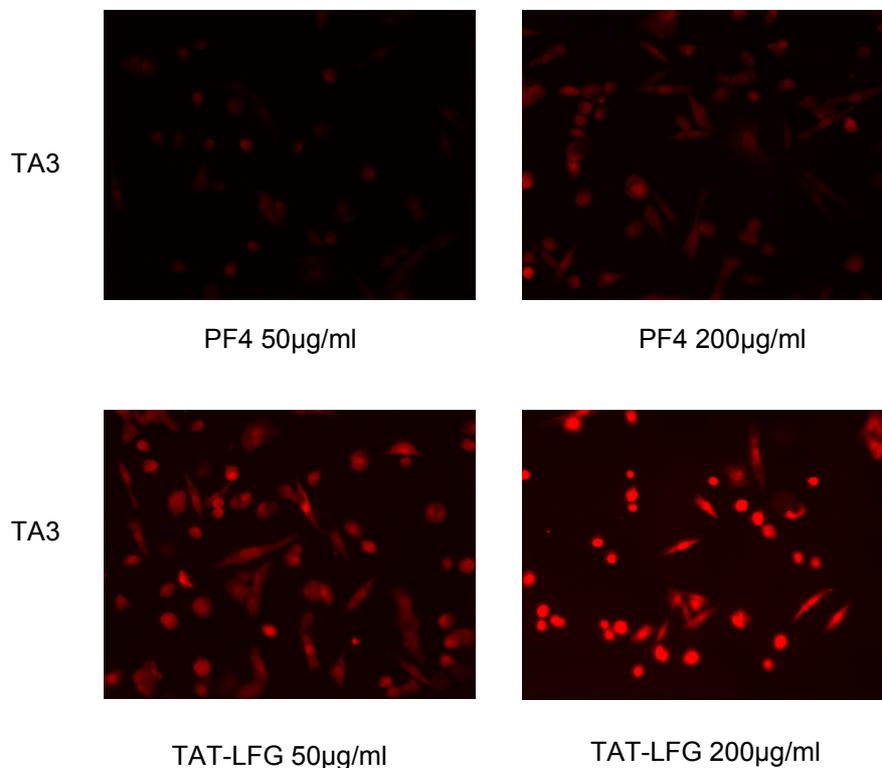


Abb. 15: Nachweis der intranukleären Lokalisation von TRITC markiertem PF4 Protein nach 48 h Inkubation von TA3 Tumorzellen mit dem Protein. Als positiv Kontrolle wurden TA3 Tumorzellen mit TAT-LFG in denselben Konzentrationen (50 und 200 µg/ml) behandelt.

Das rekombinante Protein führte jedoch *nicht* zur Erniedrigung von VEGF im Zellkulturüberstand im Gegensatz zu dem viral exprimierten PF4.

Mit diesen Ergebnissen konnten wir zeigen, dass nur padPF4 einen Einfluss auf die VEGF Expression von Tumorzellen auszuüben scheint und dieser Effekt nicht durch eine Beeinträchtigung der VEGF Transkription intrazellulär zu

erklären war. Der Effekt konnte mit rekombinantem Protein nicht gezeigt werden, obwohl das rekombinante Protein nachweislich in die Zelle und den Zellkern penetrierte. Da die bFGF Konzentration nach Behandlung mit den antiangiogenetischen Viren im Tumorzellüberstand keinerlei Veränderungen aufwies, werden die Daten nicht gezeigt.

3.4 Verteilung, Transduktionseffizienz und Transgenexpression nach intraperitonealer Applikation von Adenoviren

Als Vorversuch für die geplanten Tierversuche wurde zunächst die anatomische Verteilung und Transduktionseffizienz der viralen Vektoren sowie die Transgenexpression nach intraperitonealer Applikation der Adenoviren in Mäuse, die zuvor mit SKOV-3 i.p. Tumorzellen injiziert worden waren, untersucht (Abb. 16).

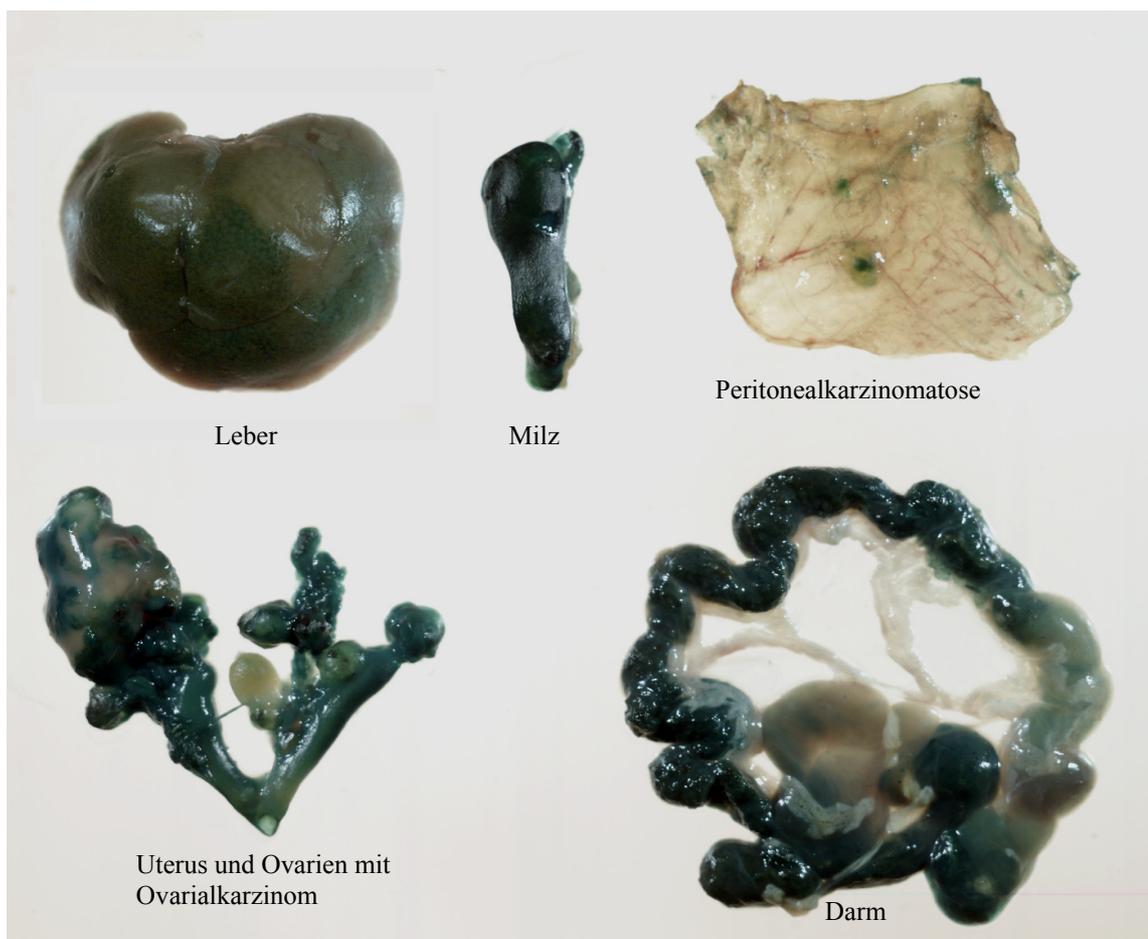


Abb. 16: Verteilung und Transgenexpression 48 h nach i.p. Injektion von 1×10^9 PFU padLacZ in eine SKOV-3 i.p. tumortragende Maus

Für diesen Versuchsansatz wurde ein das Lac-Z Gen tragender Vektor eingesetzt, weil die β -Galactosidaseexpression in vivo leicht nachzuweisen war. Abbildung 16 macht deutlich, dass nach i.p. Applikation von padLacZ eine auf die Peritonealhöhle begrenzte Expression des Transgens mit starker Expression in den Serosaoberflächen aller intraperitoneal gelegener Organe, z.T. des Peritoneums und innerhalb individueller Tumorknoten im Peritoneum und des inneren Genitale nachgewiesen werden konnte. Außerhalb der Peritonealhöhle gelegene Organe (Herz, Lunge, Gehirn) zeigten keine Transgenexpression.

3.5 Adenoviral vermittelte antiangiogenetische Gentherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und malignen Aszites im Tiermodell

3.5.1 Ergebnisse der Langzeitüberlebensstudien

Das Mausmammakarzinomaszitesmodell TA3 und das ES-2 humane Klarzellovarialkarzinommodell erwiesen sich als sehr aggressive, rasch fortschreitende Tumormodelle, so dass in diesen beiden Tierversuchsserien die Therapie frühzeitig, d.h. am Tag 0 bzw. 3 begonnen wurde und diese Versuchsserie als *“Präventionsstudie”* deklariert wurde. TA3 tumortragende Tiere (Abb. 8) erhielten insgesamt 2 Virusinjektionen im Abstand von 5 Tagen, ES-2 Tiere (Abb. 8) erhielten bis zu 6 Injektionen im Abstand von 5 Tagen. In beiden Tumormodellen starben die unbehandelten Kontrolltiere im Median nach 11 (TA3) bzw. 16 Tagen (ES-2), während die mit einem antiangiogenetischen viralen Vektor injizierten Tiere deutlich länger überlebten, wobei die Ergebnisse z.T. statistisch signifikant waren (Monotherapie mit padPF4 im ES-2 Modell und Monotherapie mit padAngio/Endo im TA3 Tumormodell, Abb. 17 a, b)

In beiden Experimenten erwies sich die Kombinationstherapie der Monotherapie überlegen mit einem mittleren Überleben der TA3 Mäuse von 20 Tagen in der Kombinationstherapiegruppe versus 16 Tagen bei Monotherapie und 21 Tagen versus 18 Tagen in der ES-2 Gruppe, in der 4 der 24 behandelten Mäuse noch lebten, als die Studie am Tag 62 geschlossen wurde (markiert mit # = geschätztes Überleben). Die mit einer Kombination von 2 antiangiogenetischen viralen Vektoren behandelten TA3 Aszitestumore tragenden Tiere überlebten in allen 3 Behandlungsgruppen signifikant länger

als die mit dem padGFP Kontrollvektor injizierten Tiere. Auch im ES-2 Tiermodell zeigten sich statistisch signifikante Überlebensvorteile in 2 der 3 Kombinationsbehandlungsgruppen (padAngio+padEndo, padAngio+padPF4).

Abb. 17a.)

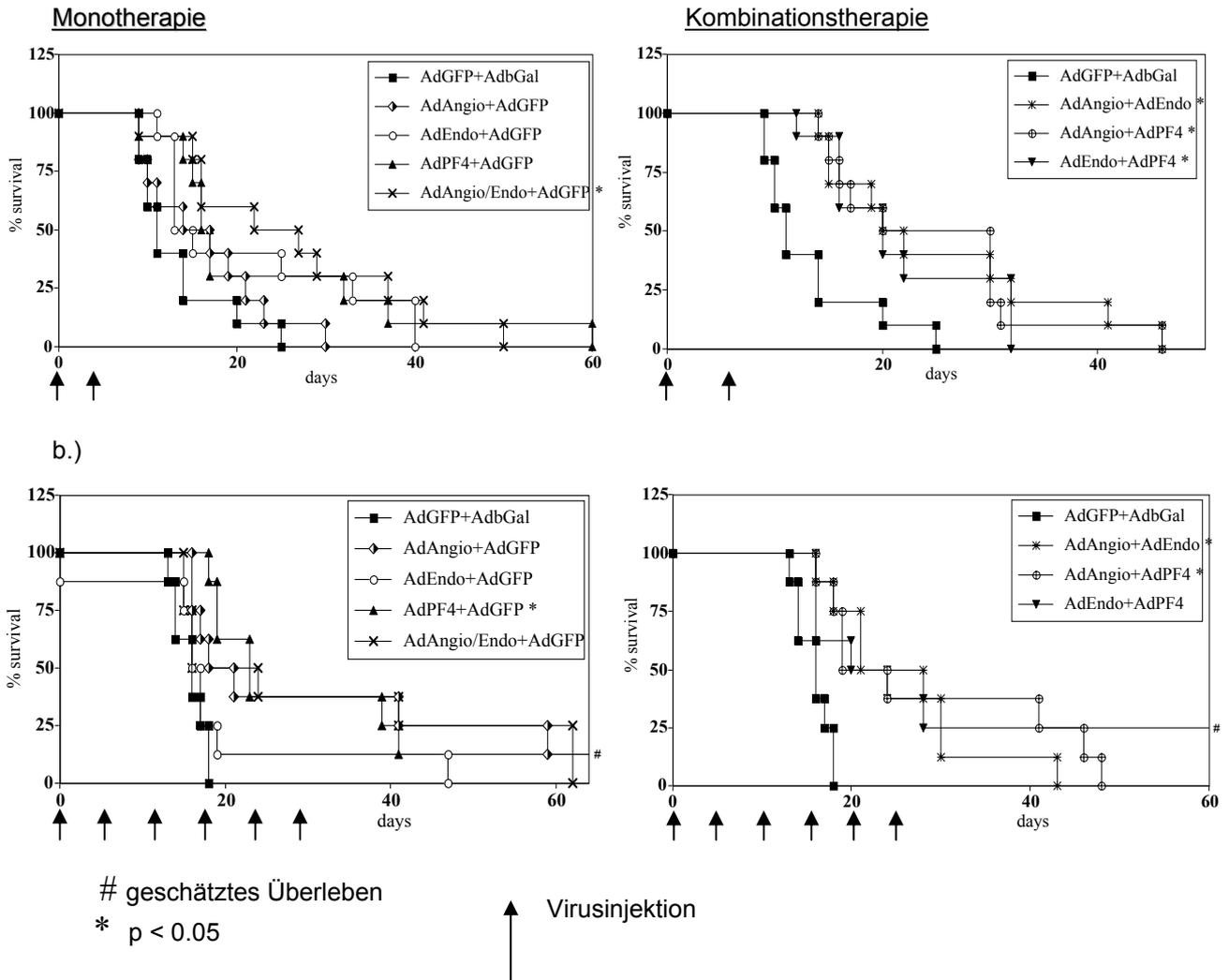


Abb. 17 a: Überlebensdaten der **TA3** tumortragenden Mäuse (n = 10 pro Behandlungsgruppe) in der “Präventionsstudie”: Behandlung mit antiangiogenetische Proteine exprimierenden Adenoviren in Mono- (linke Überlebenskurve) oder Kombinationstherapie (rechte Überlebenskurve) am Tag 0 und 5.

(b): Überlebensdaten der **ES-2** tumortragenden Mäuse (n = 8 pro Behandlungsgruppe) in der “Präventionsstudie”: Behandlung mit antiangiogenetische Proteine exprimierenden Adenoviren am Tag 3, 8, 13, 18, 23 und 28.

Die Berechnung des Überlebensvorteiles der behandelten Mäuse im Vergleich zu mit padGFP injizierten Tieren erfolgte mit der Kaplan-Meier Methode (* Signifikanz für p<0.05).

Ermutigt von diesen positiven Ergebnissen wurde eine dritte Therapiestudie in einem klinisch relevanteren Setting mit dem langsamer wachsenden SKOV-3 i.p. Ovarialkarzinommodell durchgeführt. In dieser Studie (*„Interventionsstudie“*) wurde die Behandlung des Ovarialkarzinoms erst am Tag 8 begonnen, somit zu einem Zeitpunkt an dem die Tiere schon makroskopisch gut sichtbare Tumorknoten am inneren Genitale und Peritoneum aufwiesen und geringe Aszitesmengen nachweisbar waren (Ergebnisse von Vorversuchen zur Dosisfindung an einer Gruppe von 10 Tieren). Entsprechend der bekannten angiostatischen Wirkung der antiangiogenetischen Proteine wurden die Virusinjektionen am Tag 14, 20, 26, 32, 38, 44 bis zu 50 Tagen fortgesetzt. Diese Dauertherapie führte zu einem signifikanten Überlebensvorteil in 6 der 7 entweder mit Mono- oder Kombinationstherapie behandelten Tiergruppen ($p = 0,002$) mit 2 Dauerüberlebenden (Therapie mit padEndo+padPF4 bzw. padAngio+padEndo), die nach Beendigung der Studie getötet werden mussten (Abb. 17 c).

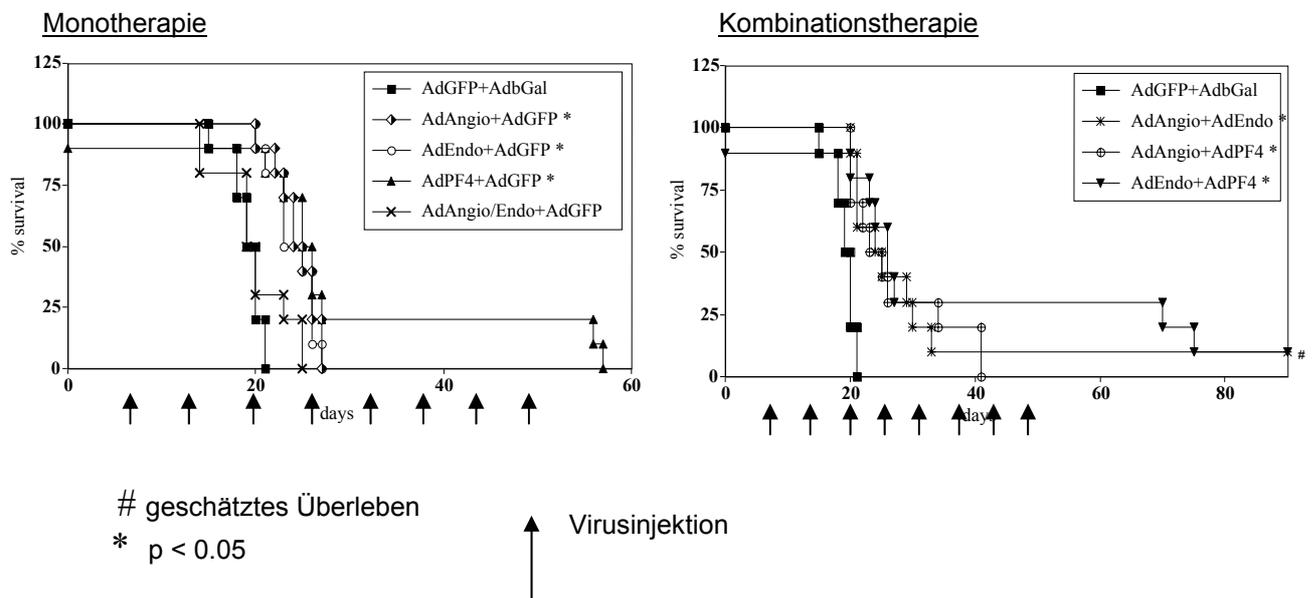


Abb. 17 c: Überlebensdaten der **SKOV3 i.p.** tumortragenden Mäuse ($n = 10$ pro Behandlungsgruppe) in der *„Behandlungsstudie“*: Applikation der antiangiogenetische Proteine exprimierenden Adenoviren in Mono- (linke Überlebenskurve) oder Kombinationstherapie (rechte Überlebenskurve) am Tag 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44 und bis zu Tag 50. Die Berechnung des Überlebensvorteiles der behandelten Mäuse im Vergleich zu mit padGFP injizierten Tieren erfolgte mit der Kaplan-Meier Methode (* Signifikanz für $p < 0.05$).

Auch in dieser Studie konnten wir somit zeigen, dass die antiangiogenetische, regionale Gentherapie die Aszitesproduktion vermindern bzw. verhindern konnte und das Tumorstadium verzögerte oder verhinderte (2 Tiere überlebten ohne jegliche Tumorsezeichen). In keinem der Tiere wurde eine spontane Rückbildung beobachtet.

3.5.2 Klinische Beobachtungen und Ergebnisse der Autopsien

Alle Tiere wurden zum Zeitpunkt des Todes oder Euthanasie autopsiert. Bei der Autopsie wurde auf Menge und Beschaffenheit des Aszites, Tumorstadium, intraperitoneale Tumoraussaat, Beschaffenheit des Darmes (Adhäsionen, Ileuszeichen) und extraperitoneale Tumoraussaat (Einstichstelle, LK Metastasen) geachtet.

Während alle mit padGFP oder PBS (in Vorversuchen) injizierten Kontrolltiere in der TA3 Mammakarzinomaszitesstudie 1-2 Tage nach Beginn der Aszitesbildung im Bild der Anämie und Dyspnoe an ausgeprägtem (bis zu 7-8 ml!), blutigem Aszites verstarben (Abb. 18 a), entwickelten die mit antiangiogenetischen Vektoren behandelten Mäuse später und deutlich weniger oder keinen Aszites: In einem der mit padPF4 durchgeführten Vorversuche fand sich eine mittlere Aszitesmenge von 5,6 ml (+/- 0,875) in der Kontrollgruppe (n=10), während die mit padPF4 behandelten Tiere (n=10) im Durchschnitt 2,3 ml (+/- 1,76), Aszites produzierten, wobei 6 der 10 Tiere eine Aszitesmenge < 1 ml aufwiesen.



Abb. 18 a: TA3 tumortragende Maus am Tag 12, Injektion mit padGFP Kontrollvirus am Tag 0 und 5. Ausgeprägter, blutiger Aszites und Anämie (Hb < 10 g/dl).

Weiterhin fiel auf, dass der Aszites der behandelten Tiere deutlich weniger blutig war oder klar im Vergleich zu dem "dunkelroten" Aszites der Kontrollen (Abb. 18 b).

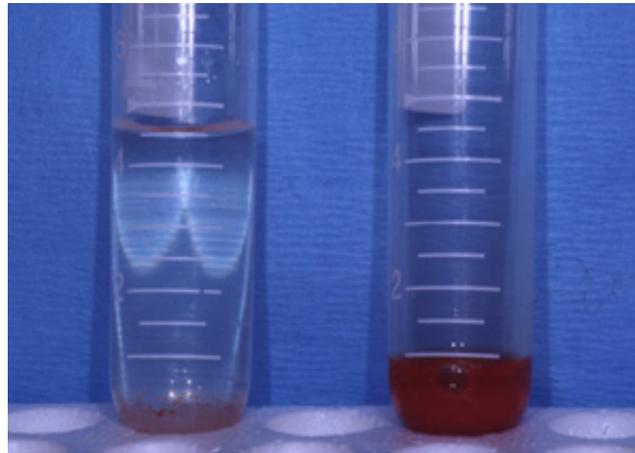


Abb. 18 b: Leicht blutig tingierter Aszites einer am Tag 18 getöteten mit padPF4 behandelten TA3 tumortragenden Maus (linkes Reagenzglas) im Vergleich zum stark blutigen Aszites einer mit padGFP behandelten Kontrollmaus (rechtes Reagenzglas). Der gemessene Blutanteil betrug zwischen 10% und 30%.

Gentherapeutisch, antiangiogenetisch behandelte TA3 Tiere, die keinen Aszites entwickelten, überlebten bis zu 70 Tage. Ein Teil der Langzeitüberleber verstarb an Darmverschlüssen und Anorexie aufgrund intraperitonealer, makroskopisch avaskulärer Tumore oder ohne sichtbare Tumoraussaat, jedoch massiven Verwachsungen zwischen Peritoneum und Darm (Abb. 19 a).



Abb. 19 a: "Verwachsungsbauch" einer TA3 Aszitestumorzellen tragenden Nacktmaus nach i.p. Behandlung mit padPF4+padEndo, verstorben am Tag 32 im Ileus, kein Aszites.

Im Rahmen der Obduktion zeigte sich, dass der Darm aus einem komplett verklebten, tumorartigen, kugeligen Konvolut bestand, so dass die Tiere im Ileus verstarben. Mehrere dieser TA3 Langzeitüberleber mussten wegen großer, sich nach ca. 1 Monat an der Tumorzellinjektionsstelle bildender subkutaner Weichteiltumore euthanasiert werden (Abb. 19 b).



Abb. 19 b: Mit TA3 Tumorzellen injizierte Nacktmaus, Behandlung mit padEndo. Euthanasie am Tag 37 wegen großem, später exulzeriertem Tumor an der Tumorzellinjektionsstelle. Bauch tumorfrei, kein Aszites.

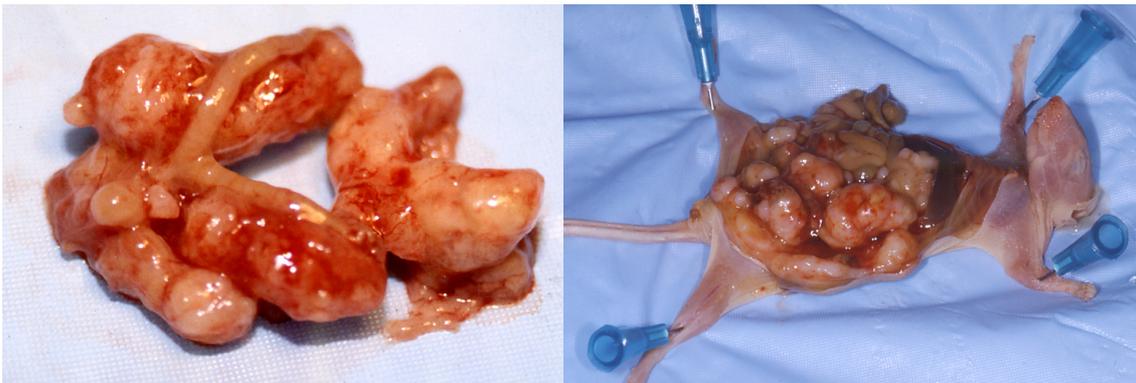
Eines der TA3-tumortragenden Mäuse entwickelte am Tag 71 nach Behandlung mit padEndo eine große Lymphknotenmetastase im Bereich der rechten vorderen Gliedmaße (Abb. 20).



Abb. 20: Lymphknotenmetastase einer mit padEndo behandelten, langzeitüberlebenden TA3 tumortragenden Maus. Euthanasie am Tag 71 wegen Unfähigkeit sich fortzubewegen. Das Abdomen war tumor- und aszitesfrei.

Bei der Autopsie zeigte sich intraperitoneal ein völlig blandes Abdomen ohne Hinweis auf Tumor oder Aszites. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf den "regionalen" Effekt der applizierten antiangiogenetischen, viralen Vektoren innerhalb des behandelten intraperitonealen "Kompartments".

Die Tiere, die mit der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 i.p. injiziert worden waren entwickelten in der Kontrollgruppe zunächst Tumore am Ovar/Uterus (Abb. 21 a), gefolgt von intraperitonealer Tumorausbreitung und Auftreten von Aszites (Abb. 21 b).



a.)

b.)

Abb. 21: (a) Inneres Genitale (Uterus und Ovarien) einer mit der humanen Ovarial-Adenokarzinomzelllinie SKOV 3 i.p. inokulierten Nacktmaus. Die Tiere entwickeln typischerweise Ovarialtumore, Absiedlungen am Uterus und den Tuben, sowie eine ausgedehnte intraperitoneale Tumoraussaat und Aszites (b).

Dieses Tumormodel spiegelt exzellent den klinischen Verlauf eines Ovarialkarzinoms bei der Frau im Stadium III wieder. Unbehandelte Tiere verstarben am Tumorload und Aszites nach ca. 3 Wochen, während auch hier die antiangiogenetische Therapie das Tumorstadium verlangsamte und die Aszitesproduktion verminderte oder aufhielt. Einige der Tiere entwickelten das Bild des Ileus mit massiven intraperitonealen Adhäsionen ohne Aszitesbildung oder sie mussten wegen großer Tumore an der Einstichstelle getötet werden. Zwei der 4 Langzeitüberleber verstarben am Tumorrezidiv 20 bzw. 25 Tage nachdem die Behandlung am Tag 50 beendet worden war, während die zwei anderen Tiere ohne Zeichen von Erkrankung > 100 Tage überlebten!

3.5.3 Einfluss der Aszitesmenge auf das Gesamtüberleben

Aufgrund der Beobachtung, dass die meisten langzeitüberlebenden Tiere minimalen oder keinen Aszites entwickelten, warfen wir die Frage auf ob ein direkter Einfluss der Aszitesmenge auf das Überleben der Tiere bestand. Unter Verwendung von ANCOVA, ließ sich eine eindeutig negative Verbindung zwischen Aszitesmenge und Überleben im TA3 Aszites Model nachweisen (ANCOVA, $p < 0.01$). Damit konnten wir statistisch unsere Beobachtung untermauern, dass die durch die Behandlung mit antiangiogenetischen Vektoren induzierte Abnahme der Aszitesproduktion einen signifikanten Überlebensvorteil der Tiere bedingte unabhängig davon, welcher Vektor eingesetzt wurde (Abb. 22).

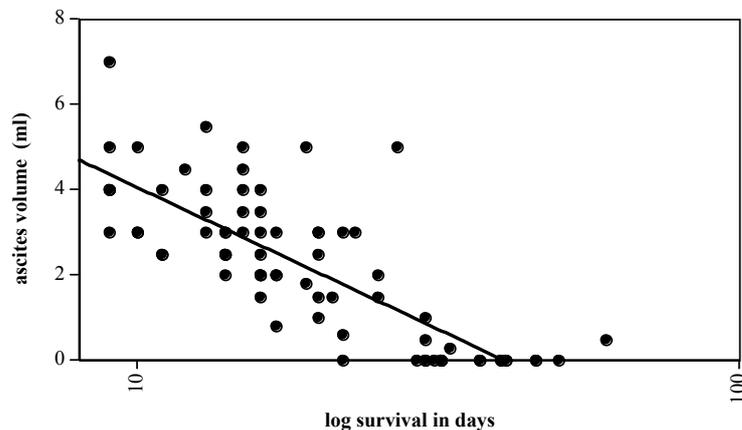


Abb. 22: Einfluss der Aszitesmenge auf das Gesamtüberleben der Tiere. Zur Beantwortung der Frage, ob eine Korrelation zwischen Aszitesmenge und Gesamtüberleben der Tiere besteht, wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt (ANCOVA). Es zeigte sich statistisch eine streng negative Korrelation zwischen Aszitesmenge und Überleben, ohne dass die vier verschiedenen antiangiogenetischen Vektoren oder die Art der Behandlung (Mono/Kombinationstherapie) einen signifikanten Einfluss ausübten (F-Test, $p < 0.001$). Deshalb wurde in der Graphik auf eine Spezifizierung der Vektoren verzichtet.

3.5.4 Vergleich der Effektivität der unterschiedlichen Behandlungsschemata

Weiterhin interessierte uns die Frage, ob eine der sieben Mono- bzw. Vektorkombinationen konsistent in den drei verschiedenen Tumormodellen als die "beste Therapie" identifiziert werden könnte und ob die Kombinationstherapie der Monotherapie überlegen war. Zwar konnten wir in

den meisten der mit antiangiogenetischer Gentherapie behandelten Tiere einen deutlichen Trend zu einem verlängerten Gesamtüberleben gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe nachweisen, jedoch wurden nicht immer statistisch signifikante Ergebnisse erreicht (s. Abb. 17 a - c). Weiterhin erwies sich keiner der antiangiogenetischen Substanzen als statistisch signifikant besser als die anderen, auch wenn aus rein klinischer Beobachtung und auch aufgrund der Ergebnisse in den vielen hier nicht in die Auswertung eingehenden Vorversuche der padPF4 Vektor die konstant besten Ergebnisse erbrachte. Eine mögliche Erklärung für die nicht nachzuweisende statistische Signifikanz trotz eindeutiger Trends war, dass- obwohl insgesamt 224 Tiere im Hauptversuch (ohne die vielen Vorversuche!) behandelt wurden- innerhalb der acht verschiedenen Behandlungsgruppen in 3 Tiermodellen die Fallzahl mit 8-10 Tieren relativ klein war.

Deshalb wurden in einer gesondert durchgeführten statistischen Auswertung die Daten aller Experimente gepoolt, um der Frage nachzugehen, ob die antiangiogenetische Gentherapie als solche gesehen einen signifikanten therapeutischen Effekt bei der Behandlung des malignen Aszites beim Ovarialkarzinom hatte. Wir führten diese Untersuchungen durch, weil trotz der Unterschiede in der Behandlungsdauer und Anzahl der Injektionen insgesamt die 3 Tumormodelle von Seiten der Klinik und des Verlaufes recht ähnlich waren. Um die Vergleichbarkeit der Experimente zu untermauern, wurde zunächst in einem Cox Proportional Hazard-Modell getestet, ob eine Gruppen - Experiment Interaktion bestand und dabei nachgewiesen, dass die Interaktion nicht statistisch signifikant war (Chi^2 test, $p=0.12$). Die daraufhin durchgeführte Analyse der gepoolten Daten zeigte, dass alle Therapiearme ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu der mit dem GFP-Kontrollvektor behandelten Gruppe aufwiesen (A/E vs. GFP: $p=0.0025$; Angio vs. GFP, $p=0.0013$; Angio+PF4 vs. GFP, $p<0.001$; Angio+Endo vs. GFP, $p<0.001$; Endo vs. GFP, $p=0.004$; Endo+PF4 vs. GFP, $p<0.001$; PF4 vs. GFP, $p<0.001$). Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Tatsache untermauert, dass die Tiere in der GFP-Kontrollvektor behandelten Gruppe das kürzeste mediane Überleben aller Gruppen (bis auf eine) in allen Experimenten aufwiesen. Weiterhin konnte in diesem Datensatz ein signifikanter Überlebensvorteil der mit Kombinationstherapie behandelten Mäuse gegenüber der Monotherapie

belegt werden (mittleres Überleben der mit Kombinationstherapie behandelten Tiere 24 Tage gegenüber der Monotherapie mit 20 Tagen, $\chi^2 = 7.81$, $p=0.005$) Zusammenfassend ließen sich anhand der Auswertung der in vivo Versuche an 224 Nacktmäusen zur adenoviral vermittelten antiangiogenetischen Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und malignen Aszites die in 1.6 aufgelisteten Fragestellungen wie folgt beantworten:

Zu Frage 1, 2, 4: Die antiangiogenetische Gentherapie erwies sich als erfolgreiches Behandlungskonzept in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und des malignen Aszites mit deutlicher Aszitesreduktion, z.T. kompletten Verhinderung der Aszitesbildung, Tumorreduktion und einem signifikantem Überlebensvorteil der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe

Zu Frage 3: die Kombinationstherapien waren signifikant besser als die Monotherapien, ohne dass eine der drei Kombinationen signifikant besser war als die anderen.

Zu Frage 5: Der Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes sollte abhängig gemacht werden von der Aggressivität des Tumors, der späte Behandlungsbeginn in dem langsamer fortschreitenden SKOV-3 i.p. Tumormodel war dem frühen Beginn in den aggressiven Tumormodellen TA3 und ES-2 gleichwertig. Nach Absetzen der Therapie kam es zum Tumorrezidiv bei einigen Tieren.

Zu Frage 6: Die Injektion der antiangiogenetischen Viren in der gewählten Dosis von 1×10^9 PFU wurde von den Tieren komplikationslos vertragen ohne Beeinträchtigung des Fressverhaltens und Wohlbefindens der Tiere

3.5.5 Beeinflussung der Blutgefäßdichte und Apoptose *in vivo*

Die bei der Autopsie der Tiere asservierten Tumor- und Peritonealgewebe wurden mikroskopisch nach immunhistochemischer Anfärbung der Endothelzellen mit einem gegen Faktor VIII gerichteten AK auf das Vorliegen von Mikrogefäßen untersucht. Desweiteren erfolgte die Quantifizierung apoptotischer Zellen durch die Darstellung der fragmentierten intranukleären DNA. Die Anzahl der Mikrogefäße in der Peritonealkarzinomatose war bei allen antiangiogenetisch behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (im Durchschnitt um 65%, $p < 0.05$, s. Tab. 10 und Abb. 23).

Weiterhin wurde in der TUNEL Färbung in den Gebieten peritonealer Karzinomatose im TA3 Tumormodel eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen in den mit antiangiogenetische Substanzen exprimierenden adenoviralen Vektoren behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen dokumentiert (Tabelle 10).

| Tabelle 10: Apoptoserate und Mikrogefäßdichte im Peritonealgewebe von antiangiogenetisch behandelten, TA3 tumortragenden Mäusen, die am Tag 13 euthanasiert wurden. | | |
|--|--|---|
| Zellen + Vektor | Apoptotische Zellen/HPF ¹ (400x) | Anzahl der Mikrogefäße/HPF ¹ (200x) |
| TA3 + pAdGFP | 0.60 ± 0.19 | 13.87 ± 0.94 |
| TA3 + pAdAngio | 1.67 ± 0.29* | 4.73 ± 0.40* |
| TA3 + pAdEndo | 3.00 ± 0.37* | 5.40 ± 0.57* |
| TA3 + pAdPF4 | 2.40 ± 0.34* | 5.00 ± 0.44* |
| TA3 + pAdAngio/Endo | 2.53 ± 0.39* | 4.40 ± 0.42* |

¹ Mittelwert+/-Standardabweichung. Die Mittelwerte der behandelten Tiere waren signifikant unterschiedlich in Bezug auf den Vektor (ANOVA, F-Test, $p < 0.001$). HPF=high power field

* 95% Konfidenzintervall im Vergleich zu padGFP ($p < 0.05$)

Abb. 23

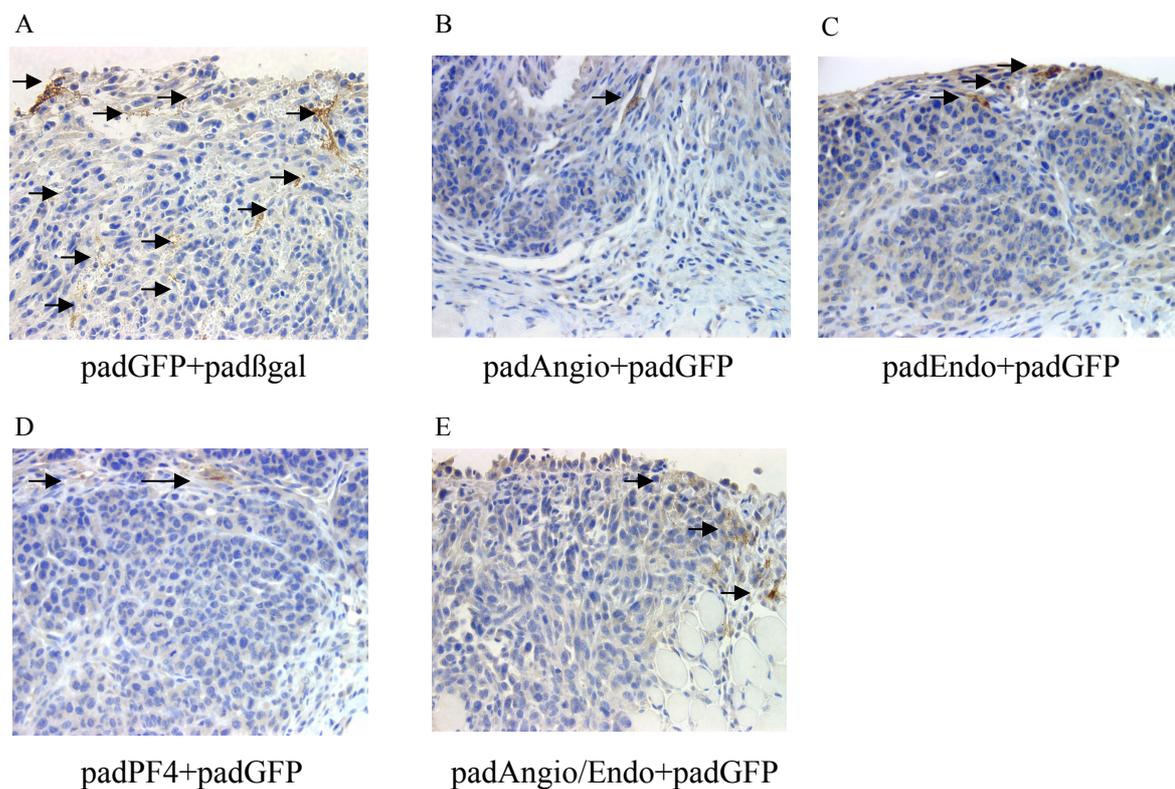


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis (Faktor VIII Färbung) der verringerten Gefäßdichte im Peritonealgewebe tumortragender Mäuse unter Therapie mit padAngio (B), padEndo (C), padPF4 (D) oder padAngio/Endo (E) im Vergleich zu den Kontrolltieren (A). Das Auszählen der Mikrogefäße erfolgte mikroskopisch unter 200x Vergrößerung, pro Tier wurden 5 Gesichtsfelder in Gebieten größter Gefäßdichte ausgezählt. Die Quantifizierung der Gefäße ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Insgesamt sprachen diese Ergebnisse für einen primären antiangiogenetischen Effekt der hier durchgeführten viralen Gentherapie, die wohl sekundär durch die verminderte Durchblutung die Apoptose von Zellen induzierte.

4 DISKUSSION

4.1 Rationale für die Durchführung einer antiangiogenetischen Gentherapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom mit Aszites

Die Behandlung des fortgeschrittenen, intraperitoneal metastasierten Ovarialkarzinoms mit Aszites besteht wegen mangelnder Therapieoptionen in palliativen, rezidivierenden Entlastungspunktionen, (intraperitonealer) Chemotherapie oder Verklebungsversuchen mit Supramycin. Diese Behandlungsformen sind jedoch in der Regel nicht auf Dauer erfolgreich bedingt durch die Chemoresistenz der Ovarialtumore nach Vorbehandlung im Rezidivstadium. Weiterhin besteht das Problem der adäquaten Applikation und Verteilung der Medikamente im Bereich von Tumoren, die als großflächige Schichten oder kleine Tumorknötchen das gesamte Peritoneum der Bauchwand und der Mesenterialoberflächen auskleiden. Die Behandlung des Aszites bleibt somit ein weiterhin ungelöstes Problem und die Entwicklung neuer Therapieformen erscheint vordringlich.

Die Erkenntnis, dass das Wachstum maligner Tumore von der Ausbildung neuer Blutgefäße abhängig ist, hat zur Einführung der Antiangiogenesetherapie und der Initiierung von intensiven Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet geführt (Folkman, 1990). Seit dieser Zeit wurden multiple Substanzen mit antiangiogenetischer Aktivität entdeckt so z.B. anti-VEGF Antikörper, FLK-1 dominant negative Mutanten, MMP Inhibitoren, TNP 470, Thalidomid, Antithrombin III, Pex, Angiostatin, Endostatin, und PF4 und viele mehr (Maione *et al.*, 1990; Moses *et al.*, 1990; Takigawa *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; D'Amato *et al.*, 1994; Millauer *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1994; Borgstrom *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1996; Ke *et al.*, 1996; Millauer *et al.*, 1996; Saleh *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Wojtowicz-Praga *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1998; Cao, 1998; Gervaz *et al.*, 1998; Griscelli *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 1998; Bergers *et al.*, 1999; Im *et al.*, 1999; Meneses *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 2000; Sauter *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2001; Joki *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2001; Regulier *et al.*, 2001; Ciafre *et al.*, 2002; Fukumori *et al.*, 2002; Indraccolo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Shi *et*

al., 2002) und deren tumorinhibierende Wirkung *in vivo* in unterschiedlichen Tumormodellen nachgewiesen.

Das Ovarialkarzinom stellt aus mehreren Gründen eine "ideale" Erkrankung für eine antiangiogenetische Therapie dar:

1. Das Wachstum von malignen Ovarialtumoren ist stark von Angiogenese abhängig. Hinweise darauf geben die ausgeprägte Gefäßversorgung der Ovarialtumore, die positive Korrelation zwischen Gefäßdichte im Tumorgewebe und Überleben (Hollingsworth *et al.*, 1995; Abulafia *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1999), sowie der Expression von proangiogenetischen Molekülen (VEGF, IL8) und Prognose der Patientinnen (Yamamoto *et al.*, 1997; Yoneda *et al.*, 1998). Weiterhin konnten Untersuchungen zeigen, dass KDR, ein endothelzellspezifischer Rezeptor für VEGF (Terman *et al.*, 1992) auch von Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird (Boocock *et al.*, 1995).
2. Eine der Hauptbegleiterscheinungen des Ovarialkarzinoms ist das Auftreten von Aszites. Die starke Expression von VEGF und bFGF durch Ovarialkarzinomtumorzellen und Aszitestumorzellen (Nagy *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Yoneda *et al.*, 1998) scheint sowohl die Angiogenese im Peritonealgewebe, als auch die Hyperpermeabilität der Gefäßwände zu induzieren, beides Ursachen für die Ausbildung von Plasmaextravasaten und Aszites.

Aus diesen Erkenntnissen haben wir die Hypothese abgeleitet, dass eine antiangiogenetische Therapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom, neben der Beeinträchtigung des Tumorwachstums, auch die Aszitesbildung verhindern würde durch eine zusätzliche, direkte Beeinflussung der Gefäßhyperpermeabilität.

Ein Hauptproblem bei der Behandlung des intraperitoneal ausgebreiteten Ovarialkarzinoms stellt jedoch die Applikation und Verteilung der Medikamente an die Orte des Tumorwachstums und der Neoangiogenese dar. Weiterhin sollten zur effizienten Hemmung der tumorassoziierten Neoangiogenese hohe lokale Konzentrationen der Wirkstoffe vor Ort erreicht werden und die Therapie sollte kontinuierlich (Drixler *et al.*, 2000; Kisker *et al.*, 2001) und langandauernd verabreicht werden, da nach Absetzen dieser angiostatisch wirkenden Therapie ein Wiederaufleben des Tumorwachstums beobachtet wurde (O'Reilly *et al.*, 1997, eigene Ergebnisse). Aus diesen Gründen haben wir uns entschlossen,

eine Strategie, die wir als "gezielte Antiangiogenese" bezeichnet haben, als neuartiges Therapieverfahren bei metastasiertem Ovarialkarzinom und malignem Aszites zu etablieren und die therapeutische Effektivität in dieser Arbeit zu evaluieren. Hierbei sollten virale Vektoren zur Applikation von antiangiogenetisch wirkenden Genen zur Anwendung kommen und nicht systemisch, sondern direkt an den Orten des Tumorwachstums eingesetzt werden. Theoretisch bieten diese virale Vektoren den Vorteil einer verlängerten, hohen lokalen Expression der antiangiogenetischen Proteine am Ort des Geschehens. Diese Strategie wurde im Labor von Howard Fine von T. Tanaka initiiert und am Hirntumormodell als ein "abgeschlossenes Kompartiment" im zentralen Nervensystem in vivo mit Erfolg getestet (Tanaka *et al.*, 1998). Da die Bauchhöhle ein weiteres anatomisch abgeschlossenes Kompartiment darstellt, stellten wir die Hypothese auf, dass das fortgeschrittene Ovarialkarzinom ein geeignetes Krankheitsbild zur Evaluierung dieser Therapieoption darstellt. Ein weiterer Baustein in unseren Überlegungen zur Initiierung dieser in vivo Studie war die Tatsache, dass eine der Voraussetzungen zur Durchführung einer Gentherapie beim Menschen ist, dass die Therapie keine direkte Gefahr für den Patienten und die Umgebung in sich birgt. Der einfache, sichere Zugang zur Peritonealhöhle und die Begrenzung des Erkrankungsprozesses (und somit auch der applizierten Viren – Risikominimierung!) auf die Peritonealhöhle begünstigt die Zulassung eines solchen Protokolls in Hinblick auf eine geplante klinische Studie bei positiven Ergebnissen zur Palliativbehandlung des Aszites beim Ovarialkarzinom.

Verschiedene Faktoren haben uns dazu bewogen, einen adenoviralen Vektor für den Gentransfer einzusetzen: Adenoviren können- wenn auch unter hohem Material und Zeitaufwand - jedoch trotzdem relativ sicher in großen Mengen und mit hohem Titer im Labor hergestellt werden. Die hohen Titer sind wichtig für die erforderliche hohe Transduktionseffizienz beim Ovarialkarzinom. Weiterhin konnten erste klinische Studien im Einsatz beim Menschen eine gute Verträglichkeit dieser Vektoren nachweisen. Nachteil ist die relativ kurze Expressionsdauer der Gene und die Immunogenität. Trotzdem haben wir uns zum "proof of principle" zunächst zur Durchführung dieser Arbeit unter Einsatz von Adenoviren entschieden.

4.2 Biologische Aktivität der exprimierten antiangiogenetischen Proteine in vitro

Angiostatin und Endostatin sind beide Spaltprodukte natürlich im Körper vorkommender Proteine (Plasminogen und Kollagen XVIII), wogegen PF4 ein aus 70 Aminosäuren bestehendes in den alpha Granula von Blutplättchen gespeichertes Protein darstellt. Für alle drei Proteine wurde eine potente inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von EC in vitro und eine ausgeprägte tumorhemmende Wirkung in vivo nachgewiesen (Maione *et al.*, 1990; Maione *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1997). Aus diesem Grunde hatten wir uns zur Konstruktion von adenoviralen Vektoren, welche diese Substanzen exprimieren, entschlossen. Die Konstruktion eines Fusionsproteins zwischen Angiostatin und Endostatin erfolgte unter der Hypothese, dass ein solches Konstrukt einen additiven Effekt und somit stärkere antiangiogenetische Wirksamkeit als die Einzelsubstanzen aufweisen würde mit dem Vorteil, dass nur ein Virus verabreicht werden müsste.

Die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass die von uns neu konzipierten und klonierten Adenoviren, padsigEndoHA, padsigHAPF4, padAngioHA und padAngio/EndoHA die Proteine in erwarteter Größe in sezernierter, immunoreaktiver Form exprimieren (Abb. 9). Die Proteine erwiesen sich als biologisch aktiv, was wir durch die Hemmung der mitogen stimulierten EC Proliferation nachweisen konnten (Abb. 11a). Außerdem konnten wir zeigen, dass Angiostatin und Endostatin die Migration von EC hemmten und Apoptose von EC induzierten (Abb. 12), eine Eigenschaft, die bereits zuvor beschrieben worden war (Claesson-Welsh *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1998; Dhanabal *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999). Daten bezüglich PF4 lagen bislang nicht vor. Wir konnten zeigen, dass auch PF4 und das Fusionsprotein zwischen Angiostatin und Endostatin eine solche Aktivität aufwiesen (Abb. 12). Ob die antimigratorische Wirkung und die apoptoseinduzierende Wirkung auf EC eine allgemeine Eigenschaft aller antiangiogenetischen Substanzen darstellt, was für die Proliferationshemmung der Fall zu sein scheint, bleibt abzuwarten.

4.3 Verteilung, Transduktionseffizienz und Transgenexpression nach i.p. Virusinjektion

Mittels i.p. Injektion eines das LacZ Gen exprimierenden Adenovirus in tumortragende Mäuse wurde nachgewiesen, dass sich der Adenovirus im gesamten Bauchraum verteilte, jedoch die Organe außerhalb der Bauchhöhle nicht erreichte und das Transgen von Normalzellen und Tumorgewebe in hoher Dosis exprimiert wurde (Abb. 16), eine Beobachtung, die wir durch eine Endostatinbestimmung im Aszites nach padEndo Injektion verifizieren konnten (Konzentrationen bis 1,5 µg/ml). Diese Ergebnisse unterstützten unsere Hypothese, dass durch den viralen Gentransfer eine hohe Konzentration des Transgens vor Ort erreicht werden konnte und Tumor- und Normalzellen als kontinuierliche Produktionsstätten der antiangiogenetischen Substanzen dienten. In einer anderen Studie mit einem TRAIL exprimierenden Adenovirus konnten wir die Dauer der Expression nach i.p. Gabe von 1×10^9 PFU Virus auf ca. 14 Tage terminieren, so dass wir von der angestrebten kontinuierlichen Expression über verlängerte Zeit ausgehen konnten.

4.4 Effektivität der adenoviral vermittelten Gentherapie bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mit malignem Aszites in Tiermodellen

Die Testung der in vivo Aktivität der Substanzen erfolgte mittels i.p. Injektion in Form von Mono- und auch Kombinationstherapien (Tabelle 9) in zwei verschiedenen Tiermodellen des Ovarialkarzinoms und eines Aszites-tumormodelles (Abb. 8). Der auffälligste erste Therapieerfolg nach Behandlung der Tiere mit den antiangiogenetischen Vektoren war die klinisch offensichtliche und auch messbare Verminderung der Aszitesmenge (Abb. 22) und die verringerte Blutungsneigung in die Bauchhöhle bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 18 b). Auch in den Tieren, die letztendlich am intraabdominellen Tumorwachstum und Peritonealkarzinomatose verstarben, konnten wir bei den antiangiogenetisch behandelten Tieren im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor padGFP behandelten Tieren deutlich verringerte Mengen oder keinen Aszites finden. Zudem war das Gesamtüberleben der behandelten Tiere in allen Behandlungsarmen signifikant verlängert (Abb. 17 a -c). Dieser Überlebensvorteil der antiangiogenetisch

behandelten Tiere ist auf zwei mögliche Mechanismen zurückzuführen. Zum einen schien die Ausbildung von massiv blutigem Aszites in den Tieren mit TA3 Peritonealkarzinose direkt zum Tode der unbehandelten Tiere beizutragen, eine Annahme, die man daraus schließen musste, dass die toten Tiere bei der Autopsie bis auf den stark blutigen Aszites keine größeren Tumormassen intraabdominell aufwiesen, obwohl wir mikroskopisch eindeutig Peritonealkarzinose und z.T. auch kleine vereinzelt, diffus verstreute Tumorherde v.a. im Oberbauch sahen. Dieses Phänomen war v.a. bei den länger überlebenden Tieren zu beobachten. Wahrscheinlich war die klinisch eindeutig diagnostizierbare ausgeprägte Anämie aufgrund des massiven Blutverlustes in den Aszites (Blutanteil zwischen 10-30%) zumindest ein Verursacher des frühen Todes der unbehandelten Tiere in diesem Aszitestumormodell. Durch die antiangiogenetische Behandlung wurde sowohl die Blutung (Abb. 18 b), als auch die Aszitesproduktion vermindert, was das Gesamtüberleben der Tiere signifikant verlängerte. Diese Theorie ließ sich statistisch über eine Korrelation zwischen verminderter Aszitesmenge und verlängertem Gesamtüberleben untermauern (Abb. 22).

Da jedoch im ES-2 und SKOV3 i.p. Tumormodell bei serösem Aszites oder nur geringer Blutung in die Bauchhöhle die antiangiogenetische Gentherapie das Überleben der Tiere auch positiv beeinflussen konnte, müssen zusätzliche Mechanismen, außer der verringerten Blutungsneigung, eine Rolle spielen. Bedingt durch die in den immunhistochemischen Untersuchungen im Peritoneum der Tiere nachgewiesene Reduktion der Gefäßdichte (Abb. 23, Tabelle 10), Induktion von Apoptose im Tumor (Tabelle 10) und klinisch nachgewiesenem geringerem Tumorload, kann man folgern, dass das verlängerte Überleben der Tiere Folge des verlangsamten Tumorwachstums durch einen direkten antiangiogenetischen Effekt darstellte.

Eine äußerst wichtige Beobachtung muss in diesem Zusammenhang betont werden, weil sich dieser profunde biologische Effekt der adenoviral vermittelten antiangiogenetischen Therapie in der Überlebensstatistik nicht widerspiegelte: einige der antiangiogenetisch intraperitoneal behandelten Tiere (v.a. in der TA3 und SKOV3 i.p. Gruppe) starben nach relativ langer Überlebensdauer im Ileus (Abb. 19 a) oder mussten aus ethischen Gründen euthanasiert werden. Sie hatten große subkutane Tumoren an den Einstichstellen am Abdomen

entwickelt (Abb. 19 b), die z.T. exulzeriert waren, die Tiere am Laufen hinderten oder zu Tumorkachezie führten. Ein weiteres, mit Endostatin behandeltes Tier musste wegen großer Lymphknotenmetastase am Vorfuß am Tag 71 getötet werden (TA3 + padEndo, Abb. 20). Bei der Autopsie dieser Tiere zeigte sich, dass intraperitoneal entweder kein Hinweis auf ein Tumorwachstum (z.B. bei TA3 + padEndo) oder nur kleine Tumore ohne Aszites vorhanden waren oder aufgrund der Therapie ein "Verwachsungsbauch" bei avitaler Peritonealkarzinose vorlag. Die Tiere, die wir aufgrund der Aszitesverhinderung und der konsekutiv durch die Peritonealkarzinose sich ausbildenden Adhäsionen verloren haben, müssen genau genommen auch zu den "erfolgreich" behandelten Fällen gezählt werden, weil wir das Primärziel in Form einer Verhinderung der Aszitesbildung erreicht hatten.

Diese Ergebnisse und klinischen Beobachtungen unterstreichen die Effizienz und den Therapieerfolg der gezielten antiangiogenetischen Gentherapie in einem spezifischen anatomischen Kompartiment, aber gleichzeitig weisen sie auch auf die Probleme und Grenzen der Therapie hin mit Auftreten von Tumoren an remoten Stellen, die von den Viren nicht erreicht werden und Folgeerscheinungen wie die Ausbildung von Adhäsionen durch die Downregulierung der Aszitesproduktion.

Insgesamt erwies sich die antiangiogenetische Therapie jedoch als nebenwirkungsfrei und wurde von den Tieren (soweit dies klinisch im Tiermodell beurteilbar war) gut vertragen.

Obwohl bereits die Gabe von Einzelsubstanzen einen deutlichen, wenn auch nicht immer signifikanten Überlebensvorteil der Tiere bewirkt hatte, erreichten wir mit den Kombinationstherapien in vivo unabhängig von der Art der Kombination konstant signifikante Ergebnisse (Abb. 17 a - c). Vor Beginn unserer Studie wurde nur in einer Untersuchung eine Kombination von Angiostatin und Endostatin als Protein getestet und auch dort eine verstärkte Wirkung der Kombination gezeigt (Bergers *et al.*, 1999). Inzwischen erschienen mehrere Untersuchungen mit Kombinationstherapien, die ebenfalls unsere Ergebnisse untermauern (Yokoyama *et al.*, 2000; Scappaticci *et al.*, 2001). Da der Mechanismus (Rezeptor, Signaltransduktionsweg), über den die Proteine Angiostatin, Endostatin und PF4 ihre Wirkung entfalten, nur zum Teil aufgeklärt ist (s. unter 4.5), war eine theoretische Erklärung für den additiven Effekt über

den Mechanismus nur schwer möglich. Weiterhin war in unserem Modell eine genaue Quantifizierung aufgrund der Expression der Substanzen über einen Adenovirus und die starke Variabilität dieses biologischen Systems nur eingeschränkt verwertbar. Dieser Effekt erklärt auch, warum in den vitro Versuchen der additive Effekt bei der Kombination von zwei Vektoren nicht nachweisbar war (s. Abb. 11a, 13a). Wahrscheinlich war bei der hohen MOI von 50-100 der maximale angiogenetische Effekt auf Endothelzellen bereits durch Expression einer antiangiogenetischen Substanz erreicht und durch die Kombination von zwei antiangiogenetischen Faktoren nicht mehr steigerbar.

Um der Frage nachzugehen, ob der Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes, der Abstand der Injektionen und die Dauer der Behandlung einen Einfluss auf den Therapieerfolg hatten, wurden in den drei Tumormodellen gemäß Abb. 8 die Behandlungen variiert. Insgesamt wurde jedoch – ausgehend von den statistischen Berechnungen - kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen im TA3, ES-2 und SKOV-3 i.p. Tumormodell nachgewiesen. Der frühe Behandlungsbeginn im aggressiven Tumormodell TA3 war dem späten Beginn im langsamer wachsenden SKOV3 i.p. Modell gleichwertig.

Aus der Sicht des Klinikers jedoch sind v.a. die Ergebnisse im TA3 und SKOV3 i.p. Modell zu betonen:

- im TA3 Modell war durch nur 2 Injektionen ein Langzeiteffekt erreicht worden, da viele Tiere am Ileus ohne Aszitesmanifestation verstarben oder wegen subkutanen Tumoren/Lymphknotenmetastasen getötet werden mussten (Abb. 19 a, b, 20). Dieses Ergebnis unterstreicht v.a. die Effektivität der **adenoviralen Gentherapie** als Vehikel zur Erzeugung einer „relativen“ Dauertherapie mit einer verlängerten Expression des Transgens.

- Die Ergebnisse im SKOV3 i.p. Modell dagegen, das den Verlauf des Adenokarzinoms des Ovars bei der Frau im Stadium III am besten widerspiegelte, waren als besonders eindrucksvoll zu werten, da die Therapie erst zu einem Zeitpunkt (Tag 8) begonnen wurde, als der Tumor bereits im Abdomen makroskopisch ausgebildet war (Ergebnisse von Vorversuchen), dafür aber „lebenslang“ fortgeführt wurde. Somit hatten wir in dieser Studie komplette Remission erreicht durchgeführt und deutliche Überlebensvorteile mit zwei Langzeitüberlebenden und mehreren Tieren mit nur subkutanen Tumormanifestationen oder Tod durch Ileus erreicht. Dieses Ergebnis

unterstreicht v.a. die Effektivität der **Antiangiogenese** bei der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms mit Aszites.

4.5 Beeinflussung der VEGF Expression durch antiangiogenetische Gentherapie

Die spezifischen Mechanismen, über die die Angiogenese-Inhibitoren Angiostatin, Endostatin und PF4 ihre Wirkung entfalten, sind bis heute nur unzulänglich aufgeklärt. Bis dato wurden weder spezifische Rezeptoren an den Oberflächen der Endothel-effektorzellen identifiziert, noch konnten die intrazellulären Signaltransduktionswege aufgeklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass alle drei Proteine an den Endothelzellen und /oder der angiogenetischen Signaltransduktion in unterschiedlicher Weise angreifen.

Angiostatin ist ein proteolytisches Fragment von Plasminogen, einem Protein, welches im Extrazellulärraum um die Tumorzellen herum reichlich vorhanden ist, und aus dem Angiostatin mittels Proteasen in vivo gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass Angiostatin nicht über den Plasminogenrezeptor an der Oberfläche von EC deren Proliferation und Migration behinderte, sondern dass Angiostatin an einen separaten Rezeptor bindet, den α/β Untereinheiten von ATP Synthase (Moser *et al.*, 1999). Weiterhin hemmt Angiostatin die Matrix verstärkte Plasminogenaktivierung und behindert damit die Invasion der EC (Stack *et al.*, 1999), neben seiner apoptoseinduzierenden Wirkung auf EC über einen RGD unabhängigen, bislang unbekanntem Signaltransduktionsweg (Claesson-Welsh *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1998).

Endostatin dagegen scheint den Plasmaspiegel der antiapoptotischen Proteine zu beeinflussen (Dhanabal *et al.*, 1999), interagiert mit Integrinen (Rehn *et al.*, 2001) und MMP's (Kim *et al.*, 2000), verhindert die Degradierung der extrazellulären Matrix (Chang *et al.*, 1999) und interagiert direkt mit dem VEGF spezifischen FLK-1/KDR Rezeptor (Kim *et al.*, 2002), ohne VEGF zu binden.

PF4 ist ein zur Familie der Chemokine CXC gehörendes Protein, das bFGF bindet und somit dessen mitogene Wirkung behindert. PF4 und auch das aus den Aminosäuren 47-70 bestehendes Peptidfragment von PF4 behinderte die Bindung von VEGF an der Oberfläche von EC und auch an FLK-1

transduzierten chinesischen Hamstereizelle (Gengrinovitch *et al.*, 1995; Jouan *et al.*, 1999).

Da bis zum Zeitpunkt der Planung der hier vorgestellten Untersuchungen nur wenig über die Wirkungsmechanismen von Angiostatin und Endostatin veröffentlicht war, hatten wir die Theorie aufgestellt, dass der VEGF/bFGF Spiegel durch die antiangiogenetische Behandlung verändert werden würde. Um diese Hypothese zu evaluieren, wurden die VEGF und bFGF Konzentration im Zellkulturüberstand und Aszites der Tiere nach antiangiogenetischer Behandlung bestimmt. Während bFGF unverändert blieb, konnte im Zellkulturüberstand und der Aszitesflüssigkeit nach Behandlung mit padPF4 bzw. in vivo auch nach Kombinationsbehandlung mit padPF4+padEndo eine Erniedrigung des VEGF-Spiegels beobachtet werden (Abb. 14 b, c) Die in früheren Untersuchungen beschriebene Fähigkeit von PF4, VEGF zu binden, könnte zu dieser erniedrigten Sekretion von VEGF durch die Tumorzellen beigetragen haben. Trotz Einsatz verschiedenster Untersuchungstechniken (i.p. Western Blots, Gabe von mit TRITC markiertem, rekombinantem PF4 Protein, Northern Blot, RT PCR ect.) gelang es uns nicht, einen endgültigen Beweis für diesen bislang nicht beschriebenen Effekt von PF4 zu erbringen. Es scheint jedoch, dass eine intrazelluläre Komplexbildung zwischen PF4 und VEGF eine Rolle bei der verminderten Sekretion von VEGF durch die Tumorzellen eine Rolle spielt. Die Tatsache, dass dieser Effekt zuvor nicht beobachtet worden war, mag daran liegen, dass durch die adenoviral vermittelte Applikation des PF4 eine so hohe Expression und somit Konzentration von PF4 intrazellulär erzeugt worden war, die nach Exposition mit rekombinantem PF4 intrazellulär nie erreicht wurde. Um dies zu belegen, wurde zum einen TRITC markiertes, rekombinantes PF4 Protein mit den Tumorzellen inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch nach einem bestimmten Zeitpunkt die Intensität der Rotfärbung (entsprach dem intrazellulären PF4) der Zellen bestimmt, die nur gering ausgeprägt erschien, d.h. nur wenig Protein penetrierte in die Zellen und den Zellkern (Abb. 15). Weiterhin wurde unsere Hypothese durch die Tatsache untermauert, dass wir die Downregulation von VEGF im Extrazellulärraum nach Applikation von rekombinantem PF4 Protein nicht nachweisen konnten.

Somit hatten wir zumindestens für das PF4 Protein Daten generiert, die darauf hinwiesen, dass die ausgeprägte antiangiogenetische Wirkung des PF4 nicht

nur über eine direkte Wirkung an den EC Zellen bedingt war, sondern auch durch seine Fähigkeit die Sekretion von VEGF durch Tumorzellen nach Transduktion der Zellen mit einem PF4 exprimierenden Adenovirus downzuregulieren und somit die VEGF induzierte Angiogenese und Gefäßhyperpermeabilität zu vermindern. Mit diesem erstmals für PF4 beschriebenen Wirkungsmechanismus waren auch die von uns beobachteten Ergebnisse der Tierversuche gut vereinbar, da wir den Aszites-vermindernden bzw. -verhindernden Effekt am stärksten ausgeprägt in der PF4 behandelten TA3 Gruppe bzw. einer der Kombinationstherapien mit PF4 beobachten konnten.

Die putativen Wirkungsmechanismen der hier vorgestellten antiangiogenetischen Substanzen Angiostatin, Endostatin und PF4 in der Therapie des Ovarialkarzinoms ist schematisch in Abb. 24 zusammengefasst.

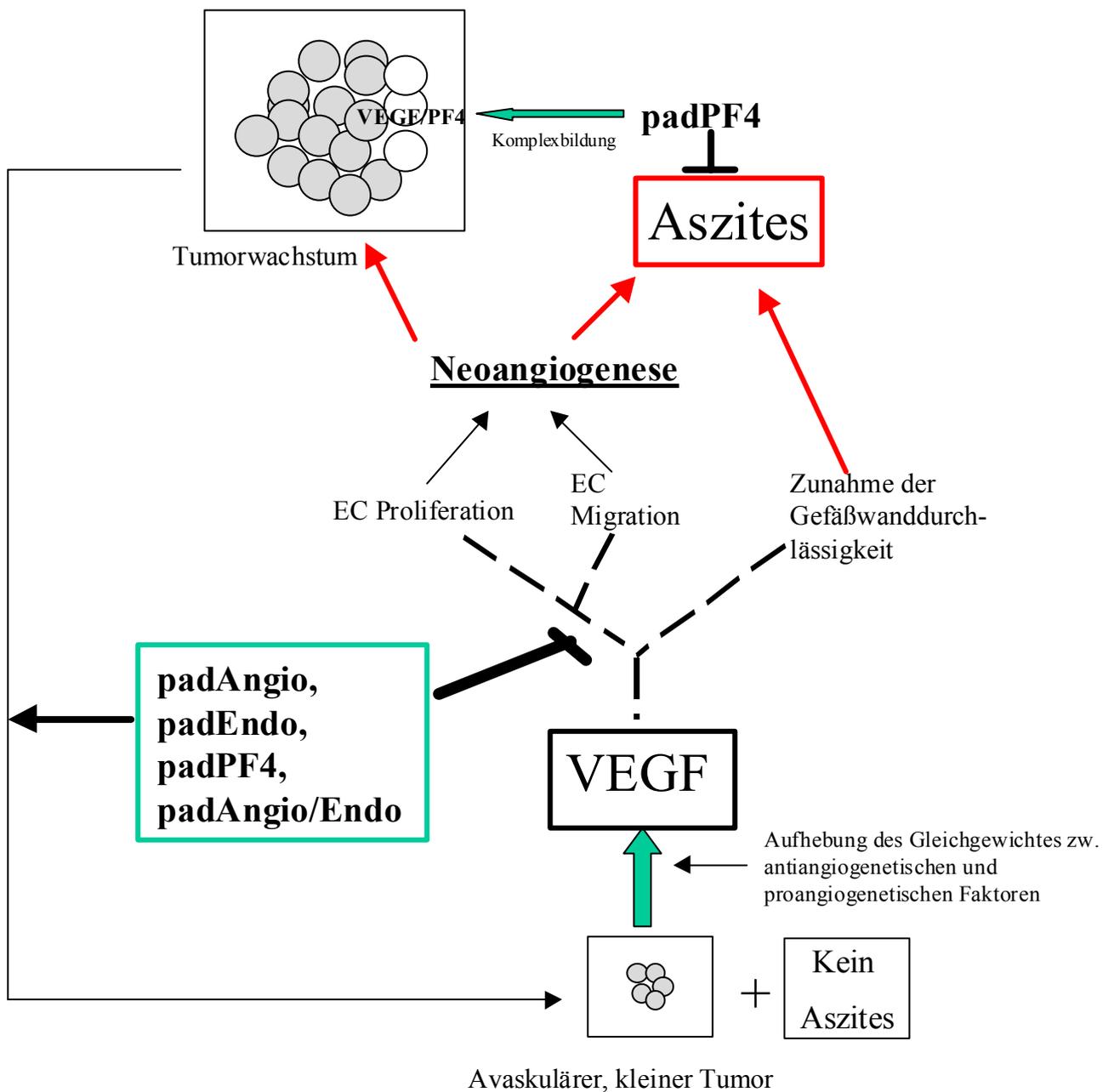


Abb. 24: Wirkungsmechanismus von Angiostatin, Endostatin, PF4 und des Angiostatin-/Endostatin Fusionsproteins in der Behandlung des metastasierten Ovarialkarzinoms mit Aszites. Die antiangiogenetischen Proteine hemmen die Proliferation und Migration von EC, treiben diese Zellen in die Apoptose und Verhindern dadurch die Gefäßneubildung. Insbesondere PF4 hemmt auch direkt über eine Komplexbildung die Wirkung von VEGF und beeinflusst damit zusätzlich die Gefäßwandhyperpermeabilität, die u.a. für die Aszitesbildung verantwortlich ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Evaluierung eines neuen Behandlungskonzeptes zur Palliation bei malignem Aszites im fortgeschrittenen Stadium des Ovarialkarzinoms.

Da sowohl die Neoangiogenese und der endothelzellspezifische Wachstumsfaktor VEGF in der Entstehung und Progredienz des Ovarialkarzinoms und der Genese des malignen Aszites eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass eine antiangiogenetische Therapie sowohl das Wachstum der Ovarialkarzinomzellen als auch die Aszitesproduktion beeinflussen würde. Weiterhin ist das Wachstum des Ovarialkarzinoms in einem Großteil der Patientinnen auf die Peritonealhöhle beschränkt und bietet sich somit idealerweise für eine auf ein abgeschlossenes Kompartiment beschränkte „zielgerichtete“ Therapie in Form einer Gentherapie mit adenoviralen Vektoren an.

Wir haben in vitro und in vivo in insgesamt drei unterschiedlichen Tiermodellen des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms (Zelllinien SKOV-3 i.p. und ES-2) und malignen Aszites (TA3), Mono- und Kombinationstherapien mit vier Angiogenese-Inhibitoren exprimierenden Adenoviren padAngio, padEndo, padPF4 und padAngio/Endo durchgeführt und den klinischen Verlauf, die Aszitesproduktion und das Gesamtüberleben der Tiere evaluiert. Besonderes Augenmerk wurde auf die Veränderungen in der bFGF und VEGF Produktion in vitro und in vivo unter einer antiangiogenetischen Gentherapie gerichtet, sowie auf das Ausmaß der Apoptoseinduktion und Gefäßdichte im Gewebe der behandelten Tiere.

Wir konnten einen ausgeprägten Effekt für die Monotherapien, sowie einen signifikanten therapeutischen Erfolg der Kombinationstherapien in Hinblick auf das Gesamtüberleben der antiangiogenetisch, gentherapeutisch behandelten Tiere im Vergleich zu den mit einem Kontrollvirus injizierten Tiere nachweisen. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Aszitesmenge und Gesamtüberleben, desto geringer die Aszitesproduktion desto länger das Überleben der Tiere. Die langzeitüberlebenden Tiere waren im behandelten „Kompartiment“ tumorfrei und mussten wegen der mit der Gentherapie nicht zu erreichenden Fernmetastasen letztendlich getötet werden oder verstarben am

Adhäsionsileus. Wir konnten eine signifikante Erniedrigung der VEGF Sekretion in den mit padPF4 behandelten Tumorzellen und im Aszites der mit padPF4 injizierten tumortragenden Mäuse nachweisen. Diese VEGF Erniedrigung war nicht transkriptional, sondern putativ durch eine intrazelluläre Komplexbildung zwischen VEGF und PF4 bedingt und erklärte die ausgeprägte antiangiogenetische Wirkung des PF4 Adenovirus. Weiterhin war in allen antiangiogenetisch behandelten Tiere eine verringerte Gefäßdichte im Peritonealkarzinose tragenden Peritoneum, sowie eine Zunahme der Apoptoserate in den Zellen in vitro und in vivo als Folge des therapeutischen Effektes der eingesetzten Viren nachweisbar.

Die antiangiogenetische Therapie erwies sich als nebenwirkungsarmes, effizientes Therapiekonzept in Hinblick auf die angestrebte Verringerung bzw. Verhinderung der Aszitesproduktion beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom und erlaubte eine deutliche Verlängerung des Gesamtüberleben der Tiere. Die Gentherapie erwies sich als geeignetes Medium zur Langzeittherapie im abgeschlossenen Kompartiment der Bauchhöhle, erlaubte jedoch keine Behandlung des Tumorwachstums an remoten Stellen (z.B. Lymphknotenmetastasen oder Tumorbildung an der Einstichstelle).

Zusammenfassend konnten die hier vorgelegten Ergebnisse die therapeutische Effizienz einer antiangiogenetischen Gentherapie in der palliativen Behandlung beim metastasierten Ovarialkarzinom mit malignen Aszites zeigen. Der Einsatz eines adenoviralen Vektors wurde zum „proof of principle“ gewählt und muss vor der Initiierung einer klinischen Studie wegen der immunogenen Wirkung eines Adenovirus beim Menschen kritisch überdacht werden. Weiterhin wäre der Einsatz eines Vektors, der durch eine Integration ins Wirtsgenom eine Dauerexpression des Transgens erlaubt, erstrebenswert.

Ausblick:

Adenovirale Vektoren gehören zu den am besten untersuchten und derzeit effektivsten Vektoren für den Gentransfer beim Menschen. Der Nachteil dieser Vektoren besteht jedoch in der Auslösung einer Immunreaktion und der fehlenden Integration ins Genom mit konsekutiv relativ kurzer Genexpression. Weiterhin dringt der Virus über seinen natürlichen Rezeptor (CAR = coxsackie adenoviral receptor) in die Wirtszellen ein, dessen Expression an vielen

Tumorzellen vermindert ist. Die derzeitige Forschung auf dem Gebiet der Gentherapie und Vektorentwicklung ist auf Lösungen dieser Probleme ausgerichtet. Der Einsatz eines AA-Vektors oder eines Lentivirus hätte den Vorteil einer Dauerexpression des Transgens bei stabiler Integration der Virus DNA in das Wirtsgenom. Lentiviren beinhalten jedoch die Gefahr einer Übertragung vom HIV abstammender viraler Gene in sich und sind derzeit nicht für einen Einsatz am Menschen zugelassen. Ein AAV hätte zudem den Vorteil, dass er im Vergleich zum Adenovirus wenig immunogen ist. Durch Deletion aller viralen kodierenden Sequenzen kann die Immunogenität der Adenoviren deutlich reduziert werden. Diese sog. „gutless“ oder „high capacity“ adenoviralen Vektoren der 3. Generation bieten zusätzlich den Vorteil einer hohen Transgenkapazität, sind jedoch aufwendig in der Herstellung (Helfervirus abhängig, geringerer Titer) (s. Übersichtsartikel von Kochanek *et al.*, 2001). Eine genetische Modifikation des für die immunogene Wirkung der Adenoviren hauptverantwortlichen Hexon Kapsid Proteins stellt einen weiteren Ansatzpunkt zur Verringerung der Immunantwort im menschlichen Organismus dar (Wu *et al.*, 2002). Die Arbeitsgruppe um D.T. Curiel aus Alabama hat in einer ihrer Arbeiten beschrieben, dass in der Aszitesflüssigkeit von Ovarialkarzinompatientinnen Antikörper enthalten sind, die das Eindringen der adenoviralen Gentherapievektoren in die Zellen durch Blockierung der Coxsackie adenoviralen Rezeptoren behindern und somit die Effektivität einer intraperitonealen Gentherapie beeinflussen (Blackwell *et al.*, 2000; Hemminki *et al.*, 2002). Diese Gruppe hat einen Adenovirus entwickelt, in dessen Kapsidprotein ein Integrin-bindendes Motif (RGD) integriert wurde. Dieser Adenovirus besitzt nunmehr die Fähigkeit, CAR unabhängig über Bindung an das ubiquitär an den Tumorzelloberflächen exprimierte Integrin in die Zelle einzudringen (Dmitriev *et al.*, 1998). Mit diesen RGD Vektoren könnte die Gentransfereffektivität bei Erkrankungen, die mit Aszites einhergehen, verbessert werden (Blackwell *et al.*, 2000; Hemminki *et al.*, 2002). Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Gentransferrate stellt die Induktion der CAR Expression an der Oberfläche von Tumorzellen dar unter Einsatz von Chemotherapeutika, Wachstumsfaktoren und Cytokinen/Interleukinen (Hemminki *et al.*, 2002).

Neben der Optimierung der Gentransfereffektivität und der Vektoren, stellt die Kombination einer antiangiogenetischen Therapie, die zytostatisch wirkt, mit einem zytotoxischen Agens einen erfolgversprechenden Therapieansatz dar. Der additive Einsatz einer Bestrahlung oder die Kombination von Antiangiogenese und Chemotherapie bzw. eines zytotoxisch wirkenden conditionally replicating adenovirus (CRAds), der spezifisch Tumorzellen infiziert und lysiert (Bauerschmitz *et al.*, 2002; Kruyt *et al.*, 2002), soll in weiteren geplanten Untersuchungen in Bezug auf eine lebensverlängernde und aszitesverhindernde Wirkung beim metastasierten Ovarialkarzinom untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abulafia, O., Triest, W.E., and Sherer, D.M. (1997). Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **177**, 541-547.

Alvarez, A.A., Krigman, H.R., Whitaker, R.S., Dodge, R.K., and Rodriguez, G.C. (1999). The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma [In Process Citation]. *Clin. Cancer Res.* **5**, 587-591.

Bauerschmitz, G.J., Lam, J.T., Kanerva, A., Suzuki, K., Nettelbeck, D.M., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Mikheeva, G.V., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Dall, P., Alemany, R., Curiel, D.T., and Hemminki, A. (2002). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* **62**, 1266-1270.

Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1999). Effects of Angiogenesis Inhibitors on Multistage Carcinogenesis in Mice. *Science* **284**, 808-812.

Blackwell, J.L., Li, H., Gomez-Navarro, J., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Richter, C.A., Shaw, D.R., Alvarez, R.D., Curiel, D.T., and Strong, T.V. (2000). Using a tropism-modified adenoviral vector to circumvent inhibitory factors in ascites fluid. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1657-1669.

Boocock, C.A., Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., McLaren, J., Barker, P.J., Wright, K.A., Twentyman, P.R., and Smith, S.K. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 506-516.

Borgstrom, P., Hillan, K.J., Sriramarao, P., and Ferrara, N. (1996). Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular

endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* **56**, 4032-4039.

Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M., and Cheresch, D.A. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **92**, 391-400.

Cao, Y. (1998). Endogenous angiogenesis inhibitors: angiostatin, endostatin, and other proteolytic fragments. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **20**, 161-176.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**, 389-395.

Chang, Z., Choon, A., and Friedl, A. (1999). Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding. *Am. J. Pathol.* **155**, 71-76.

Cheng, S.Y., Huang, H.J., Nagane, M., Ji, X.D., Wang, D., Shih, C.C., Arap, W., Huang, C.M., and Cavenee, W.K. (1996). Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8502-8507.

Ciafre, S.A., Barillari, G., Bongiorno-Borbone, L., Wannenes, F., Izquierdo, M., and Farace, M.G. (2002). A tricistronic retroviral vector expressing natural antiangiogenic factors inhibits angiogenesis in vitro, but is not able to block tumor progression in vivo. *Gene Ther.* **9**, 297-302.

Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M., and Folkman, J. (1998). Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5579-5583.

Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Feder, J. (1989). Tumor

vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **84**, 1470-1478.

D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4082-4085.

Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M.J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V.P. (1999). Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11721-11726.

Ding, I., Sun, J.Z., Fenton, B., Liu, W.M., Kimsely, P., Okunieff, P., and Min, W. (2001). Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. *Cancer Res.* **61**, 526-531.

Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C.R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., and Curiel, D.T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* **72**, 9706-9713.

Drixler, T.A., Rinkes, I.H., Ritchie, E.D., van Vroonhoven, T.J., Gebbink, M.F., and Voest, E.E. (2000). Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res.* **60**, 1761-1765.

Dumont, D.J., Gradwohl, G.J., Fong, G.H., Auerbach, R., and Breitman, M.L. (1993). The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors. *Oncogene* **8**, 1293-1301.

Eatock, M.M., Schatzlein, A., and Kaye, S.B. (2000). Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **26**, 191-204.

Ettinghausen, S.E., Puri, R.K., and Rosenberg, S.A. (1988). Increased vascular permeability in organs mediated by the systemic administration of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 177-188.

Feldman, A.L., Alexander, H.R., Hewitt, S.M., Lorang, D., Thiruvathukal, C.E., Turner, E.M., and Libutti, S.K. (2001). Effect of retroviral endostatin gene transfer on subcutaneous and intraperitoneal growth of murine tumors. *J Natl Cancer Inst.* **93**, 1014-1020.

Feldman, A.L., and Libutti, S.K. (2000). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* **89**, 1181-1194.

Feldman, A.L., Restifo, N.P., Alexander, H.R., Bartlett, D.L., Hwu, P., Seth, P., and Libutti, S.K. (2000). Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res.* **60**, 1503-1506.

Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851-858.

Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., and Leung, D.W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**, 18-32.

Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry (Mosc).* **24**, 5480-5486.

Fleiss, J.L., *The Design and Analysis of Clinical Experiments*, Wiley and Sons, New York (1986).

Folkman, J. (1990). Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* **9**, 171-174.

Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., and McMahon, G. (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **59**, 99-106.

Fukumori, T., Nishitani, M., Naroda, T., Onishi, T., Oka, N., Kanayama, H., and Kagawa, S. (2002). Expression of angiostatin cDNA in a murine renal cell carcinoma suppresses tumor growth in vivo. *Urology* **59**, 973-977.

Garrison, R.N., Galloway, R.H., and Heuser, L.S. (1987). Mechanisms of malignant ascites production. *J. Surg. Res.* **42**, 126-132.

Garrison, R.N., Kaelin, L.D., Galloway, R.H., and Heuser, L.S. (1986). Malignant ascites. Clinical and experimental observations. *Ann. Surg.* **203**, 644-651.

Gengrinovitch, S., Greenberg, S.M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T.E., Levi, B.Z., and Neufeld, G. (1995). Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 15059-15065.

Gervaz, P., and Fontollet, C. (1998). Therapeutic potential of the anti-angiogenesis drug TNP-470. *Int. J. Exp. Pathol.* **79**, 359-362.

Goldman, C.K., Kendall, R.L., Cabrera, G., Soroceanu, L., Heike, Y., Gillespie, G.Y., Siegal, G.P., Mao, X., Bett, A.J., Huckle, W.R., Thomas, K.A., and Curiel, D.T. (1998). Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8795-8800.

Greenbaum, L.M., Grebow, P., Johnston, M., Prakash, A., and Semente, G. (1975). Pepstatin, an inhibitor of leukokinin formation and ascitic fluid accumulation. *Cancer Res.* **35**, 706-710.

Griscelli, F., Li, H., Bennaceur-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P., and Lu, H. (1998). Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6367-6372.

Guo, Y., Higazi, A.A., Arakelian, A., Sachais, B.S., Cines, D., Goldfarb, R.H., Jones, T.R., Kwaan, H., Mazar, A.P., and Rabbani, S.A. (2000). A peptide derived from the nonreceptor binding region of urokinase plasminogen activator (uPA) inhibits tumor progression and angiogenesis and induces tumor cell death in vivo. *FASEB J.* **14**, 1400-1410.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2509-2514.

Hemminki, A., Liu, B., Kanerva, A., and Curiel, D.T. (2002). Expression of the coxsackie-adenovirus receptor can be induced for improved gene transfer. *Molecular Therapie* **5**, S133 (405).

Hemminki, A., Wang, M., Desmond, R.A., Strong, T.V., Alvarez, R.D., and Curiel, D.T. (2002). Serum and Ascites Neutralizing Antibodies in Ovarian Cancer Patients Treated with Intraperitoneal Adenoviral Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1505-1514.

Heuser, L.S., Taylor, S.H., and Folkman, J. (1984). Prevention of carcinomatosis and bloody malignant ascites in the rat by an inhibitor of angiogenesis. *J. Surg. Res.* **36**, 244-250.

Hirabayashi, K., and Graham, J. (1970). Genesis of ascites in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **106**, 492-497.

Hollingsworth, H.C., Kohn, E.C., Steinberg, S.M., Rothenberg, M.L., and Merino, M.J. (1995). Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am. J. Pathol.* **147**, 33-41.

Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T., and Kozai, Y. (1991). Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* **51**, 6180-6184.

Im, S.A., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Liu, T.J., Ke, L.D., Kim, J.S., Lee, H.Y., Steck, P.A., Kyritsis, A.P., and Yung, W.K. (1999). Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.* **59**, 895-900.

Indraccolo, S., Gola, E., Rosato, A., Minuzzo, S., Habeler, W., Tisato, V., Roni, V., Esposito, G., Morini, M., Albin, A., Noonan, D.M., Ferrantini, M., Amadori, A., and Chieco-Bianchi, L. (2002). Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther.* **9**, 867-878.

Iwama, A., Hamaguchi, I., Hashiyama, M., Murayama, Y., Yasunaga, K., and Suda, T. (1993). Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 301-309.

Joki, T., Machluf, M., Atala, A., Zhu, J., Seyfried, N.T., Dunn, I.F., Abe, T., Carroll, R.S., and Black, P.M. (2001). Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotechnol.* **19**, 35-39.

Jouan, V., Canron, X., Alemany, M., Caen, J.P., Quentin, G., Plouet, J., and Bikfalvi, A. (1999). Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* **94**, 984-993.

Ke, L., Qu, H., Nagy, J.A., Eckelhoefer, I.A., Masse, E.M., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (1996). Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Cancer* **32A**, 2467-2473.

Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.

Kim, J.M., Ho, S.H., Park, E.J., Hahn, W., Cho, H., Jeong, J.G., Lee, Y.W., and Kim, S. (2002). Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 793-801.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844.

Kim, Y.M., Hwang, S., Pyun, B.J., Kim, T.Y., Lee, S.T., Gho, Y.S., and Kwon, Y.G. (2002). Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Fik-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 27872-27879.

Kim, Y.M., Jang, J.W., Lee, O.H., Yeon, J., Choi, E.Y., Kim, K.W., Lee, S.T., and Kwon, Y.G. (2000). Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* **60**, 5410-5413.

Kirsch, M., Strasser, J., Allende, R., Bello, L., Zhang, J., and Black, P.M. (1998). Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo. *Cancer Res.* **58**, 4654-4659.

Kisker, O., Becker, C.M., Prox, D., Fannon, M., D'Amato, R., Flynn, E., Fogler, W.E., Sim, B.K., Allred, E.N., Pirie-Shepherd, S.R., and Folkman, J. (2001).

Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res.* **61**, 7669-7674.

Kochanek, S., Schiedner, G., and Volpers, C. (2001). High-capacity "gutless" adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* **3**, 454-463.

Kong, H.L., Hecht, D., Song, W., Kovesdi, I., Hackett, N.R., Yayon, A., and Crystal, R.G. (1998). Regional suppression of tumor growth by in vivo transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum. Gene Ther.* **9**, 823-833.

Kruyt, F.A., and Curiel, D.T. (2002). Toward a new generation of conditionally replicating adenoviruses: pairing tumor selectivity with maximal oncolysis. *Hum. Gene Ther.* **13**, 485-495.

Kuo, C.J., Farnebo, F., Yu, E.Y., Christofferson, R., Swearingen, R.A., Carter, R., von Recum, H.A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D'Amato, R., Folkman, J., and Mulligan, R.C. (2001). Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4605-4610.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.

Li, H., Griscelli, F., Lindenmeyer, F., Opolon, P., Sun, L.Q., Connault, E., Soria, J., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P., and Lu, H. (1999). Systemic delivery of antiangiogenic adenovirus AdmATF induces liver resistance to metastasis and prolongs survival of mice. *Hum. Gene Ther.* **10**, 3045-3053.

Li, H., Lu, H., Griscelli, F., Opolon, P., Sun, L.Q., Ragot, T., Legrand, Y., Belin, D., Soria, J., Soria, C., Perricaudet, M., and Yeh, P. (1998). Adenovirus-

mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther.* **5**, 1105-1113.

Lin, P., Buxton, J.A., Acheson, A., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., Channon, K.M., Hale, L.P., Dewhirst, M.W., George, S.E., and Peters, K.G. (1998). Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8829-8834.

Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jimenez, B., Mandriota, S.J., Borlat, F., Sim, B.K., Wu, Z., Grau, G.E., Shing, Y., Soff, G.A., Bouck, N., and Pepper, M.S. (1998). Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* **92**, 4730-4741.

Luo, J.C., Toyoda, M., and Shibuya, M. (1998). Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. *Cancer Res.* **58**, 2594-2600.

Luo, J.C., Yamaguchi, S., Shinkai, A., Shitara, K., and Shibuya, M. (1998). Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res.* **58**, 2652-2660.

Ma, H.I., Guo, P., Li, J., Lin, S.Z., Chiang, Y.H., Xiao, X., and Cheng, S.Y. (2002). Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin. *Cancer Res.* **62**, 756-763.

Ma, H.I., Lin, S.Z., Chiang, Y.H., Li, J., Chen, S.L., Tsao, Y.P., and Xiao, X. (2002). Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther.* **9**, 2-11.

Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R., and Schreiber, A.B. (1984). Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science* **225**, 932-935.

Maeda, H., Matsumura, Y., and Kato, H. (1988). Purification and identification of [hydroxyprolyl³]bradykinin in ascitic fluid from a patient with gastric cancer. *J. Biol. Chem.* **263**, 16051-16054.

Maione, T.E., Gray, G.S., Hunt, A.J., and Sharpe, R.J. (1991). Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* **51**, 2077-2083.

Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* **247**, 77-79.

Matthews, W., Jordan, C.T., Gavin, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Lemischka, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9026-9030.

Meneses, P.I., Abrey, L.E., Hajjar, K.A., Gultekin, S.H., Duvoisin, R.M., Berns, K.I., and Rosenfeld, M.R. (1999). Simplified production of a recombinant human angiostatin derivative that suppresses intracerebral glial tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **5**, 3689-3694.

Mesiano, S., Ferrara, N., and Jaffe, R.B. (1998). Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am. J. Pathol.* **153**, 1249-1256.

Millauer, B., Longhi, M.P., Plate, K.H., Shawver, L.K., Risau, W., Ullrich, A., and Strawn, L.M. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* **56**, 1615-1620.

Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W., and Ullrich, A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* **367**, 576-579.

Moser, T.L., Stack, M.S., Asplin, I., Enghild, J.J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H.W., and Pizzo, S.V. (1999). Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2811-2816.

Moses, M.A., Sudhalter, J., and Langer, R. (1990). Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**, 1408-1410.

Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* **18**, 119-128.

Nagy, J.A., Masse, E.M., Herzberg, K.T., Meyers, M.S., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Sioussat, T.M., and Dvorak, H.F. (1995). Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res.* **55**, 360-368.

Ohmura, E., Tsushima, T., Kamiya, Y., Okada, M., Onoda, N., Shizume, K., and Demura, H. (1990). Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha induce ascitic fluid in mice. *Cancer Res.* **50**, 4915-4917.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285.

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]. *Cell* **79**, 315-328.

O'Reilly, M.S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W.S., and Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* **285**, 1926-1928.

Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L., Bohlen, P., and Hicklin, D.J. (1999). Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res.* **59**, 5209-5218.

Rastinejad, F., Polverini, P.J., and Bouck, N.P. (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* **56**, 345-355.

Regulier, E., Paul, S., Marigliano, M., Kintz, J., Poitevin, Y., Ledoux, C., Roecklin, D., Cauet, G., Calenda, V., and Homann, H.E. (2001). Adenovirus-mediated delivery of antiangiogenic genes as an antitumor approach. *Cancer Gene Ther.* **8**, 45-54.

Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-Valdre, E., Nakamura, H., Ilmonen, M., Lombardo, C.R., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K., and Vuori, K. (2001). Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1024-1029.

Saleh, M., Stacker, S.A., and Wilks, A.F. (1996). Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res.* **56**, 393-401.

Sauter, B.V., Martinet, O., Zhang, W.J., Mandeli, J., and Woo, S.L. (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4802-4807.

Scappaticci, F.A., Smith, R., Pathak, A., Schloss, D., Lum, B., Cao, Y., Johnson, F., Engleman, E.G., and Nolan, G.P. (2001). Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol. Ther.* **3**, 186-196.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985.

Shi, W., Teschendorf, C., Muzyczka, N., and Siemann, D.W. (2002). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of endostatin inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther.* **9**, 513-521.

Shibuya, M., Luo, J.C., Toyoda, M., and Yamaguchi, S. (1999). Involvement of VEGF and its receptors in ascites tumor formation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43**, S72-77.

Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **5**, 519-524.

Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**, 1296-1299.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**, 32678-32684.

Sidky, Y.A., and Borden, E.C. (1987). Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.* **47**, 5155-5161.

Stack, M.S., Gately, S., Bafetti, L.M., Enghild, J.J., and Soff, G.A. (1999). Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem. J.* **340**, 77-84.

Sykes, A.C. (1970). Pharmacologically active substances in malignant ascites fluid. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 595P-596P.

Takayama, K., Ueno, H., Nakanishi, Y., Sakamoto, T., Inoue, K., Shimizu, K., Oohashi, H., and Hara, N. (2000). Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ. *Cancer Res.* **60**, 2169-2177.

Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1264-1271.

Talks, K.L., and Harris, A.L. (2000). Current status of antiangiogenic factors. *Br. J. Haematol.* **109**, 477-489.

Tanaka, T., Cao, Y., Folkman, J., and Fine, H.A. (1998). Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* **58**, 3362-3369.

Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., and Fine, H.A. (1997). Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.* **3**, 437-442.

Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1579-1586.

Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W.G., and Albini, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer* **75**, 246-253.

Vitaliti, A., Wittmer, M., Steiner, R., Wyder, L., Neri, D., and Klemenz, R. (2000). Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **60**, 4311-4314.

White, M.J., Miller, F.N., Heuser, L.S., and Pietsch, C.G. (1988). Human malignant ascites and histamine-induced protein leakage from the normal microcirculation. *Microvasc. Res.* **35**, 63-72.

Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B., and Hawkins, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest. New Drugs* **15**, 61-75.

Wu, H., Dmitriev, I., Seki, T., Kashentseva, E., Wang, M., and Curiel, D.T. (2002). Encapsidation of adenovirus type 5 genome by type 3 hexon. *Molecular Therapy* **5**, S65 (193).

Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R., and Olsen, B.R. (1999). Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding [In Process Citation]. *EMBO J.* **18**, 4414-4423.

Yamamoto, S., Konishi, I., Mandai, M., Kuroda, H., Komatsu, T., Nanbu, K., Sakahara, H., and Mori, T. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br. J. Cancer* **76**, 1221-1227.

Yokoyama, Y., Dhanabal, M., Griffioen, A.W., Sukhatme, V.P., and Ramakrishnan, S. (2000). Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res.* **60**, 2190-2196.

Yoneda, J., Kuniyasu, H., Crispens, M.A., Price, J.E., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1998). Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 447-454.

7 DANKSAGUNGEN

Herrn Professor Dr. Hans Georg Bender, Direktor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf, danke ich vielmals für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit in der Fakultät zu vertreten und seine stetige und tatkräftige Unterstützung und Hilfe, die er mir bei allen Frage und Problemen gewährt hat.

Dr. Howard Fine, Leiter des Labors des National Cancer Institutes, National Institute of Neurologic Disorder and Stroke, National Institutes of Health (NIH) Bethesda, MD, USA danke ich für seine Bereitschaft mich in seinem Labor aufzunehmen und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit anzufertigen. Besonders hervorheben möchte ich Doktor Fine's stets uneingeschränkte Unterstützung in der Entwicklung von wissenschaftlichen Fragestellungen, seine kritische Analyse der erhobenen Daten und seine fachkundige und uneingeschränkte Hilfe bei der Veröffentlichung der erarbeiteten Ergebnisse.

Besonderen Dank gebührt weiterhin Herrn Dr. Jeongwu Lee, Dr. Mike Parr und Dr. Nicolay Ferrari für die exzellente wissenschaftliche Ausbildung in molekularbiologischen Techniken und ihre fundierte Beratung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche. Sie haben mich freundschaftlich in die Laborgemeinschaft der Neurooncology Branch des Dana Faber Cancer Institutes, Boston USA aufgenommen und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Dr. Toshi Tanaka, Department of Neurosurgery, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan danke ich für die Überlassung des padAngiostatin und padPF4 Vektors und die stets freundschaftliche Unterstützung bei technischen Fragen. Robin Rosenbleeth danke ich für seine zuverlässige technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente. Luan Lee als Labormanagerin danke ich für die unermüdliche Hilfe bei technischen Fragen und Bestellungen der benötigten Labormaterialien und Versuchstiere. Den Angestellten und Tierpflegern der Tierversuchsräume am Dana Faber Cancer Institute und am NIH möchte ich großes Lob für die aufopfernde Pflege meiner Versuchstiere aussprechen.

Dank aussprechen möchte ich vielen weiteren Mitarbeitern in den zahlreichen Laboratorien des Dana Faber Cancer Institutes, Boston und am NIH, Bethesda,

USA, die durch ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft diesen Forschungsaufenthalt zu einer einmaligen Erfahrung sowohl in wissenschaftlicher wie auch zwischenmenschlicher Hinsicht werden ließen.

Die experimentellen Arbeiten wurden durch das Stipendienprogramm der Dr. Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung (D/98/02284) gefördert.

Ganz besonders danken möchte ich meinem geliebten Vater, der leider kurz vor der Beendigung dieser Arbeit verstorben ist, meiner Mutter, sowie meinen Schwiegereltern, ohne deren spontane Bereitschaft meinen kleinen Sohn in Amerika zu betreuen, ich nicht in der Lage gewesen wäre, die Versuche zu beenden.

Ganz besonders aber danke ich meinem Mann, der mich in allen wissenschaftlichen Fragen immer aufopfernd beraten und unterstützt hat und ohne dessen Hilfe und Verständnis die Erstellung der vorliegenden Habilitationsschrift nicht möglich gewesen wäre.