

Optimierung konditional replikativer Adenoviren für die Virotherapie von gynäkologischen Tumoren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Isabell Herrmann

aus Düsseldorf

März 2006

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik

Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. Peter Dall

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 09 Juni 2006

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Gynäkologische Malignome	1
1.2	Alternative Therapien	2
1.3	Gentherapie - Chancen & Risiken	4
1.3.1	Übersicht Gentherapie-Studien.....	6
1.4	Adenovirale Gentherapie.....	8
1.4.1	Morphologie	10
1.4.2	Zelladsorption und Zelleintritt.....	10
1.4.3	Adenoviraler Replikationszyklus	11
1.4.4	Adenovirale Vektorsysteme	12
1.4.4.1	Transduktionelles Targeting	12
1.4.4.2	Transkriptionelles Targeting	14
1.4.5	Herausforderungen für die Gentherapie.....	16
1.4.6	Konditional replikative Adenoviren (CRAds).....	17
1.4.7	Virotherapie für fortgeschrittene gynäkologische Malignome.....	23
1.4.7.1	Gewebespezifischer Promotor: Humanes α -Lactalbumin.....	23
1.4.7.2	Induzierbarer Promotor: multiple drug resistance gene 1	24
1.5	Ziele der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden	22
2.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	22
2.2	Zellkultur	23
2.2.1	Zelllinien.....	23
2.2.2	Kultivierung der Zellen.....	24
2.2.3	Isolierung und Kultur primärer humaner Zellen aus Patientenmaterial	24
2.2.3.1	Isolierung humaner Mammaepithelzellen (HMEC) und Fibroblasten	24
2.2.4	Isolation von Tumorzellen aus Aszites und Pleuraerguss	26
2.2.5	Subkultivierung.....	26
2.2.6	Kryokonservierung.....	26
2.2.7	Induktion der MDR1-Genexpression	26
2.3	RNA-/DNA-Analytik.....	27
2.3.1	RNA-Isolation aus Zellkulturen.....	27
2.3.2	cDNA-Synthese.....	27
2.3.3	DNA-Isolation aus Geweben und Zelllinien	28

2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.3.4.1	Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese.....	29
2.3.5	Amplifikation der Promotoren.....	29
2.3.6	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der MDR1-mRNA-Expression	31
2.3.7	Quantitative PCR zur Bestimmung der MDR1-Genamplifikation.....	32
2.3.8	PCR-Kontrolle der adenoviralen Konstrukte.....	33
2.3.9	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	33
2.3.10	Sequenzierung	34
2.4	Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten	34
2.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.5	Mikrobiologische Methoden.....	35
2.5.1	Bakterienstämme	35
2.5.2	Medien und Aufzucht von <i>E. coli</i>	35
2.5.3	Plasmide	36
2.5.4	Adenoviren.....	36
2.6	Klonierung	37
2.6.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.6.2	Restriktionen	37
2.6.3	Ligationen	37
2.6.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	37
2.6.5	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	38
2.6.6	Plasmidisolation	38
2.6.7	Phenolextraktion von DNA-Lösungen	39
2.6.8	Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden	39
2.7	Herstellung rekombinanter Adenoviren.....	39
2.7.1	Klonierung adenoviraler Luziferase-Expressionsvektoren	40
2.7.1.1	Klonierung von pShuttle-Vektoren mit Luziferase-Expressionskassette.....	40
2.7.1.2	Klonierung rekombinanter adenoviraler Luziferase-Expressionsvektoren...	41
2.7.2	Klonierung konditional replikativer Adenoviren (CRAds).....	41
2.7.2.1	Klonierung der Promotoren in pSE1 und pSE1Δ24.....	41
2.7.2.2	Klonierung Fiber-pseudotypisierter CRAds	42
2.7.3	Transfektion rekombinanter adenoviraler DNA in Säugerzellen.....	42
2.7.4	Produktion von adenoviralen Partikeln	43
2.7.5	Freisetzung adenoviraler Partikel.....	44
2.7.6	Aufreinigung und Dialyse.....	44
2.7.7	Titerbestimmung.....	44
2.7.7.1	Physikalische Titerbestimmung	45

2.7.7.2	Biologische Titerbestimmung.....	45
2.7.7.3	Qualität der Viruspartikel	46
2.8	Luziferase-Reportergen-Assay	46
2.9	Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Assays	47
2.9.1	Proliferations-Assay.....	48
2.9.2	Zytotoxizitäts-Assay.....	48
2.9.3	ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA)	48
2.10	Crystal-Violet-Assay	49
2.11	Statistische Analyse	50
2.12	Proteinbiochemie	51
2.12.1	Proteinextraktion aus Zelllinien	51
2.12.2	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	51
2.12.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.12.4	Western-Blot	52
2.12.5	Immunohistochemische Methoden	53
2.12.5.1	Anzucht von Zelllinien auf Objektträgern.....	53
2.12.5.2	Anzucht von Kokulturen auf Objektträgern.....	54
2.12.5.3	Immunohistochemische Färbung nach der ABC-Methode.....	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Transkriptionelles Targeting: Charakterisierung der Kandidatenpromotoren für die CRAd-Konstruktion.....	57
3.1.1	Analyse der Genexpression potentieller Kandidatenpromotoren.....	57
3.1.1.1	Expressionsanalyse des humanen α -Lactalbumin	57
3.1.1.2	Analyse der basalen MDR1-Genexpression	59
3.1.1.3	MDR-Geninduktion in Doxorubicin-Resistenzlinien	60
3.1.1.3.1	Selektionierung der Doxo-Resistenzlinien	60
3.1.1.3.2	Charakterisierung der Doxo-Resistenzlinien	60
3.1.1.3.3	Analyse der Chemoresistenz.....	61
3.1.1.3.4	MDR1-Geninduktion in Doxo-Resistenzlinien	62
3.1.1.3.5	MDR-Genamplifikation nach Doxorubicin-Behandlung.....	63
3.1.1.3.6	P-Glykoprotein-Induktion in Doxo-Resistenzlinien.....	65
3.1.2	Charakterisierung der Promotoren im Luziferase-Reportergen-Assay	66
3.1.2.1	Klonierung der adenoviralen Luziferase-Expressionsvektoren	66
3.1.2.2	Analyse der Promotoraktivitäten im Luziferase-Assay	68
3.1.2.3	Ad5ALALuc-vermittelte Luziferase-Expression	68
3.1.2.4	Ad5MDRLuc-vermittelte Luziferase-Expression	69
3.2	Transduktionelles Targeting: Verbesserung der adenoviralen Infektionsrate	72
3.2.1	Erhöhung der Infektionsrate durch genetische Fibermodifikationen	72
3.2.2	Modulation der Infektionsrate in Doxorubicin-resistenten OvCa-Zellen	75

3.3	Entwicklung und Charakterisierung Fiber-chimärisierter CRAds.....	77
3.3.1	Klonierung der CRAd-Vektoren.....	78
3.3.2	Charakterisierung einer adenoviralen Virotherapie für das MaCa	78
3.3.2.1	ALA-Promotor regulierte E1A-Expression.....	78
3.3.2.2	Zytotoxizitätsprofil von Ad5/3ALAΔ24 in MaCa-Zellen.....	80
3.3.2.3	Zytotoxizitätsprofil von Ad5/3ALAΔ24 in Normalgewebe	82
3.3.2.4	Analyse der spezifischen Replikation von Ad5/3ALAΔ24	82
3.3.2.5	Analyse der Tumorspezifität von Ad5/3ALAΔ24.....	83
3.3.3	Charakterisierung einer CRAd-Virotherapie für fortgeschrittene Karzinome	85
3.3.3.1	Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in OvCa-Zellen	85
3.3.3.2	Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in Normalgewebe	86
3.3.3.3	Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in chemoresistenten OvCa-Zellen.....	86
3.3.3.4	Analyse der Replikationseffizienz der MDR-CRAds	88
3.3.3.5	Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in chemoresistenten Primärtumoren ..	90
4	Diskussion.....	92
4.1	Transduktionelles Targeting	93
4.2	Transkriptionelles Targeting	96
4.3	Mammakarzinom-spezifische Virotherapie	97
4.4	Virotherapie für chemoresistente Tumore.....	100
5	Zusammenfassung	106
6	Literatur.....	108
7	Abkürzungen	122
8	Anhang.....	125
8.1	Promotorsequenzen.....	125
8.2	Primersequenzen.....	126
8.3	Glossar Adenoviren.....	127
8.4	Adenovirale Titer.....	128
8.5	Plasmidkarten.....	129
9	Danksagung	136
10	Erklärung.....	137

1 Einleitung

1.1 Gynäkologische Malignome

Gynäkologische Malignome (bösartige Tumore) stellen für Frauen unter 50 Jahren in westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache dar. Das Mamma- sowie das Ovarialkarzinom zählen zu den gynäkologischen Krebserkrankungen, die die Lebenserwartung der Frau in Deutschland entscheidend beeinflussen.

Brustkrebs ist in westlichen Industrienationen das häufigste Malignom bei Frauen und die häufigste Todesursache für Frauen zwischen 35 und 55 Jahren (s. Tabelle 1). Aufgrund stetig steigender Inzidenz wird eine Erkrankung jeder 7. Frau am Mammakarzinom angenommen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2005). Die Diagnose Brustkrebs bei Männern ist zwar seltener (ca. 400 Fälle p.a.), jedoch fällt die Prognose aufgrund des oft fortgeschrittenen Tumorstadiums meist ungünstiger als bei der Frau aus. Die überwiegende Mehrheit der Mammakarzinom-Patientinnen erkrankt spontan. Nur fünf bis zehn Prozent aller Fälle des Mammakarzinoms sind erblich bedingt (Tumorzentrum München, 2005). Zu den bekannten Risikofaktoren zählen zunehmendes Lebensalter, Übergewicht, Rauchen, späte oder keine Schwangerschaft, eine frühe erste sowie späte letzte Menstruation oder die Einnahme von Östrogenen (Hormonersatztherapie während der Wechseljahre) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2005; Onmeda, 2005).

Mammakarzinome verursachen im Frühstadium keine Symptome oder Beschwerden, so dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufig die Verbreitung von Mikrometastasen durch den Primärtumor erfolgte. Daher wird der operative Eingriff häufig mit anderen anti-tumoralen Therapiemodalitäten wie Bestrahlung oder einer adjuvanten bzw. neoadjuvanten systemischen Therapie (Chemotherapie, Hormontherapie, Therapie mit monoklonalen Antikörpern) kombiniert (Onmeda, 2005).

Unter den Eierstocktumoren, die sowohl benigne als auch maligne Tumore umfassen, zählt der Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) zu den führenden Krebstodesursachen der Frau (s. Tabelle 1). Das Ovarialkarzinom hat die schlechteste Prognose aller gynäkologischen Krebserkrankungen und tritt bevorzugt bei postmenopausalen Frauen ab dem 60. Lebensjahr auf (Deutsche Krebsgesellschaft, 2006). In Deutschland erkrankt etwa jede 66. Frau. Die meisten Ovarialkarzinome gehen in der Regel ohne das Auftreten von Frühsymptomen zu Beginn der Erkrankung einher, so dass bei 2/3 der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein fortgeschrittener Tumor mit Peritoneal- bzw.

Lymphknotenmetastasen (FIGO-Stadium III) oder Fernmetastasen (FIGO-Stadium IV) nachweisbar ist. Das Tumorwachstum wird häufig durch die Bildung von Flüssigkeit (Aszites) begleitet. 5-10% der Ovarialkarzinome sind hederitär bedingt, die genauen Ursachen sind unbekannt.

Tabelle 1: Epidemiologie (Tumorzentrum München, 2005; Tumorzentrum München, 2004)

	Mammakarzinom	Ovarialkarzinom
5-Jahres-Überlebensrate (Gesamtüberleben)	77% (ab 1994)	45% (ab 1978)
10-Jahres-Überlebensrate (Gesamtüberleben)	61% (ab 1994)	35% (ab 1978)
Sterbefälle p.a.	17.814 Frauen	5847 Frauen
Neuerkrankungen p.a. (absolut)	47.517 (2000)	7437 (1998)
Anteil an Krebsneuerkrankungen	24,4% (2000)	4,2% (1998)
Anteil an krebsbedingten Sterbefällen	17,8% (2000)	5,7% (1998)

Die heutige Therapie des Ovarialkarzinoms besteht aus einer operativen Eliminierung des Tumors, die von einer adjuvanten Chemotherapie begleitet wird. Wirksame Zytostatika sind platinhaltige Substanzen (Carboplatin, Cisplatin) in Kombination mit Taxanen (Paclitaxel) oder Anthrazyklinen (Doxorubicin). Trotz verbesserter Therapieergebnisse bei der Primärbehandlung des Ovarialkarzinoms liegt die Wahrscheinlichkeit einer Rezidivierung bei 50% (Tumorzentrum München, 2004).

Bei vielen Patientinnen treten nach Chemotherapie Resistenzen gegenüber zytostatischen Wirkstoffen auf, wodurch die Rezidivbildung erleichtert wird. Für die Rezidivsituation existiert keine kurative Therapie, so dass für die Patientin eine sehr schlechte Prognose resultiert. Die Remissionsraten von rezidierten Ovarialtumoren liegen nach sekundärer Chemotherapie bei etwa 20%. (Deutsche Krebsgesellschaft, 2002). Insgesamt ist die Therapiesituation für fortgeschrittene Ovarialkarzinome als suboptimal zu bewerten, da der lebensverlängernde Effekt gering ist und Nebenwirkungen zudem die Lebensqualität einschränken.

1.2 Alternative Therapien

Die klassischen Therapieansätze aus operativer Entfernung des Tumors und nachfolgender Chemotherapie oder Bestrahlung können die Tumorlast zwar reduzieren, jedoch führen unerkannte Tumorreste zu einer Rezidivbildung. Diese Gefahr einer Rezidivierung geht insbesondere durch die Absiedelung von Mikrometastasen aus, die bereits in größerer Entfernung des Primärtumors vorliegen und durch eine Operation ohnehin nicht erreicht werden. Zudem wird durch die Anhäufung genetischer Mutationen während der Karzinogenese die Resistenz maligner Zellen gegenüber konventionellen Therapien hervorgerufen (Fojo and Bates, 2003). Darüber hinaus ist die Selektivität konventioneller Therapien gering, so dass Chemo- oder Strahlentherapie mit gravierenden Nebenwirkungen und einem verringerten Therapieansprechen einhergehen.

Moderne Therapiestrategien richten sich vornehmlich gegen molekulare Angriffspunkte (Targets) und eignen sich vorzugsweise für die Therapie minimal-residualer Erkrankungen. Neben der guten Verträglichkeit erzielten molekulare Therapien in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapien meist synergistische Effekte in klinischen Phase I/II-Studien.

Innovative Targets sind beispielsweise Wachstumsfaktoren, die neben ihrer physiologischen Rolle bei der Auslösung von Signaltransduktionskaskaden eine maßgebliche Rolle während der Tumorigenese spielen. Die Hemmung der Tyrosin-Kinase-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) über die Substanz Erlotinib erzielte in einer Phase II-Studie eine Ansprechrate von 62% bei Ovarialkarzinom-Patientinnen (Gordon et al., 2005).

Ferner werden Angiogenese-Inhibitoren (Thalidomid), Protease-Inhibitoren (WX-UK1), Inhibitoren von Matrix-Metallo-Proteinasen oder Bortezomib als Vertreter der neuen Substanzklasse der Proteasom-Inhibitoren in klinischen Studien untersucht, ob sie das Invasions- und Metastasierungspotential von Ovarialkarzinomen hemmen (Aghajanian et al., 2002).

Eine wichtige Perspektive für die Bekämpfung der minimalen Resttumor Erkrankung stellt die Aktivierung immunologischer Abwehrmechanismen dar. Im Verlauf der Tumorigenese werden immunologische Reaktionen im Tumorgewebe zunehmend supprimiert, die sich im frühen Tumorstadium durch eine Resistenz maligner Zellen gegenüber der natürlichen Immunität ausdrückt. Während des progressiven Tumorwachstums wird die adoptive Immunität zunehmend unterdrückt, indem Reifung und Funktion Antigen-präsentierender Zellen blockiert und Alterationen in die T-Zell-Signaltransduktion und -funktion inseriert werden (Seliger et al., 2006; Whiteside, 2004). So sind trotz der Präsenz zytotoxischer T-Lymphozyten im Tumorgewebe Tumorwachstum und –progression möglich.

Im Bereich der Immunmodulatoren wurde Interferon- γ (IFN) erfolgreich für die Primärtherapie des Ovarialkarzinoms getestet. In einer Phase III-Studie erzielte die IFN-Cisplatin-Kombination einen Therapievorteil gegenüber der Platin-Monotherapie (Windbichler et al., 2000).

Monoklonale Antikörper, die gegen tumorspezifische Antigene gerichtet sind, können durch die Blockade von Rezeptoren die Signaltransduktion von Wachstumssignalen im Tumorgewebe inhibieren. Monoklonale Anti-EGFR- und Anti-VEGF-Antikörper konnten in klinischen Studien der Phasen II/III ihre klinische Wirksamkeit sowohl in der Mono- als auch der Kombinationstherapie belegen (Harding and Burtneß, 2005; Iqbal and Lenz, 2004). Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab eignet sich für die Immuntherapie des Mammakarzinoms. HER2/neu-positive Tumore, die etwa 25% aller Mammakarzinome ausmachen, sprechen sehr gut auf eine palliative Trastuzumab-Mono- oder Kombitherapie an, wohingegen das Therapieansprechen von Ovarialkarzinomen auf diese Therapieoption eher gering ist (Bookman et al., 2003).

1.3 Gentherapie - Chancen & Risiken

Die Gentherapie ist die jüngste unter den innovativen Krebstherapien und basiert auf dem zunehmenden Verständnis der molekularen Tumorbilogie. Das Prinzip der Gentherapie beruht auf der Einschleusung eines therapeutischen Gens in die Zielzelle, dessen Genprodukt den Krankheitsverlauf aufheben oder verlangsamen soll (Mountain, 2000). Die therapeutischen Gene werden mittels Elektroporation, der Genkanone, kationischen Lipiden bzw. Polymeren (Li and Huang, 2000) oder viralen Vektoren (Somia and Verma, 2000) in die Zellen transfiziert. Der revolutionäre Gedanke der Gentherapie ist in der gezielten Wirkung am Ursprungsort der Krankheit begründet, wohingegen viele konventionelle Therapien eher palliativ wirken.

1990 wurde die erste gentherapeutische Phase I-Studie zur Behandlung der Adenosindesaminase (ADA)-Defizienz durchgeführt (Anderson, 1990). Die ersten Erfolge wurden zehn Jahre später erzielt, als erstmals durch die retrovirale Transfektion von Knochenmarkszellen die dauerhafte ADA-Expression bei zwei Kindern nachgewiesen wurde (Aiuti et al., 2002).

Gerade der Tod des 18-jährigen Jesse Gelsinger im Jahr 1999 bedeutete einen Rückschlag für die Gentherapie. Gelsinger litt an einer milden, medikamentös therapierbaren Form der Ornithin-Transcarbamylase (OTC)-Defizienz und nahm als freiwilliger Teilnehmer an einer Gentherapie-Studie teil. Multiple Faktoren, zu denen die Vektoradministration über die Leber-Pfortader und die hohe Virusdosis zählten, führten zu der Induktion einer systemischen Immunreaktion. In der Folge starb Gelsinger an einem septischen Schock mit einhergehendem Multiorganversagen. Einen weiteren Rückschlag verzeichnete die Gentherapie, als bei behandelten Kindern mit X-chromosomaler SCID-Immundefizienz nach retroviraler Transfektion eine Leukämie induziert wurde (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen strebt die heutige Gentherapie-Forschung immer höhere Sicherheitsstandards an. Seit 1990 wurden etwa 990 klinische Studien durchgeführt, davon 97% Phase I/II-Studien (s. Abb. 1). Mit einem Anteil von 66% sind überwiegend Krebserkrankungen Ziel heutiger Gentherapieansätze (The Journal of Gene Medicine, 2005).

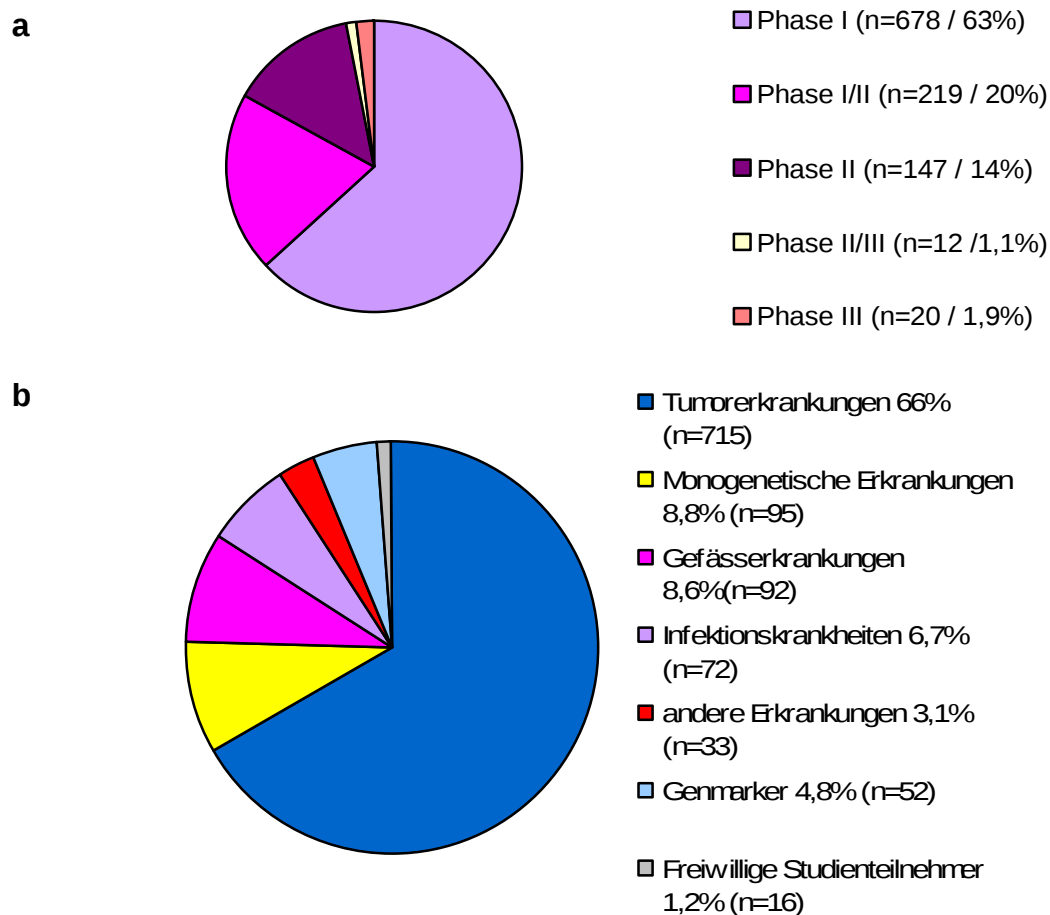


Abb. 1 Zusammenfassung klinischer Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2005)
a) Verteilung der Studien bzgl. der jeweiligen Entwicklungsphase b) Indikationen

1.3.1 Übersicht Gentherapie-Studien

Das Spektrum gentherapeutischer Ansätze für die Krebstherapie ist weit (s. Tabelle 2). Obwohl das neoplastische Wachstum durch multiple genetische Faktoren bestimmt wird, konnten die Inhibition eines singulären Onkogens bzw. die Substitution eines singulären Tumorsuppressorgens (TSG) das Tumorwachstum signifikant hemmen. Im Tiermodell induzierte die Inhibition des onkogenen HRAS eine deutliche Tumorregression (Barrington et al., 1998). Die Substitution des p53 TSG konnte bei Lungenkarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren das Tumorwachstum unterdrücken (Clayman et al., 1999). Die intratumorale Injektion nicht-replikativer Adenoviren, die eine intakte Kopie des p53 TSG tragen (Ad-p53), führte in klinischen Studien zu einer Tumorregression und einem Wachstumsstop, wenn Ad-p53 als Monotherapie appliziert wurden (Roth, 2006).

Das therapeutische Potential der RNA-Interferenz (RNAi) Technologie, das die Stilllegung von pathophysiologischer Genfunktionen umfasst, wurde bereits in einer Phase I-Studien belegt (Dyckhoorn et al., 2006; Wall and Shi, 2003). Ferner repräsentiert die RNAi-Technologie eine neue Option für die anti-virale HIV-Therapie sowie die Überwindung der Multidrugresistenz von Tumoren (Labialle et al., 2005).

Andere Gentherapieansätze verfolgen die Insertion therapeutischer Gene in Tumorzellen. Die Gruppe der therapeutisch-wirksamen Gene umfasst immuntherapeutische, anti-angiogenetische, chemoprotektive oder Suizidgene.

Tabelle 2: Klinische Gentherapiestudien

	Therapieansatz	Genvehikel	Phase	Referenz
Hirntumore	HSVtk-Suizidgen	Ad	I	(Smitt et al., 2003)
	Immuntherapie/IFN- β	Ad	I	(Eck et al., 2001)
	p53-Gensubstitution	Ad	I	(Lang et al., 2003)
Lungenkrebs	p53-Gensubstitution	Ad	I	(Roth et al., 1998), (Schuler et al., 1998)
Melanom	HSVtk-Suizidgen	Ad	I	(Morris et al., 2000)
	Immuntherapie/IL-2	Ad	I	(Stewart et al., 1999)
	p53-Gensubstitution	Ad	I	(Dummer et al., 2000)
Ovarialkarzinom	HSVtk-Suizidgen	Ad	I, I/II	(Alvarez et al., 2000a)
	Immuntherapie/BRCA-1	Retrovirus	I, II	(Tait et al., 1997; Tait et al., 1999)
	p53-Gensubstitution	Ad	I/II	(Buller et al., 2002b)
Prostatakarzinom	HSVtk-Suizidgen	Ad	I, I/II	(Miles et al., 2001)
	Immuntherapie/IL-2	Lipofektion, Ad	I	(Beldegrun et al., 2001) 2003

Die retrovirale Insertion von immunstimulatorischen Genen wie Zytokinen (Interleukin-2, γ -Interferon) konnte eine körpereigene Immunantwort gegen den Tumor induzieren, wodurch eine Tumorregression bei Patienten mit malignem Melanom erzielt wurde (Stingl et al., 1996; Nemunaitis et al., 1999). Indem zytotoxische T-Lymphozyten mit Antigen-spezifischen Rezeptorgen retroviral transfiziert wurden, konnten Tumor-reaktive T-Lymphozyten hergestellt werden, die *in-vivo* eine effektive Immunantwort gegen Zervixkarzinome vermittelten (Dall et al., 2005). Die *ex-vivo* Insertion spezifischer Tumorantigene in autologe Antigen-präsentierende dendritische Zellen bewirkte nach Reinjektion die Induktion einer anti-tumoralen Immunantwort *in-vivo* (z.B. Monahan et al., 1999; Brossart et al., 2000; Simons et al., 1999).

Suizidgene kodieren für Enzyme, die eine nicht-toxische und separat verabreichte Substanz (Prodrug) in ein Toxin konvertieren (McCormick, 2001). Die prominenteste Enzym-Prodrug-Kombination wird durch die Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase (HSVtk) und Ganciclovir (GCV) repräsentiert. HSVtk katalysiert unter Beteiligung zellulärer Kinasen die Umwandlung von GCV-Monophosphat in

ein Triphosphat. Dieses Nukleotidanalogen wird während der Mitose in die DNA eingebaut und inhibiert die DNA-Synthese sowie die RNA-Polymerase-Aktivität, so dass der Zelltod induziert wird (Furman et al., 1980; Moolten, 1986). Der Einsatz des HSVtk/GCV-Systems bei Patienten mit malignem Melanom bzw. malignem Gliom konnte in Relation zu der konventionell behandelten Kontrollgruppe das Überleben um 81% verlängern (Immonen et al., 2004; Sandmair et al., 2000). Für den effizienten Transfer des Suizidgens haben sich insbesondere adenovirale Vektoren als Genvehikel bewährt.

1.4 Adenovirale Gentherapie

Die erfolgreiche Gentherapie wird maßgeblich von zwei Faktoren bestimmt: (i) dem effizienten Gentransfer in die Zielzellen und (ii) der spezifischen Transgenexpression. Um die Voraussetzung des erfolgreichen Gentransfers zu erfüllen, hat sich die Verwendung von Viren als Genvehikel etabliert (s. Abb. 2). Gängige virale Vektorsysteme für klinische Studien basieren meist auf Adeno- oder Retroviren, weniger oft werden auch Adeno-assoziierten Viren (AAV) oder Herpes-Simplex-Viren eingesetzt (The Journal of Gene Medicine, 2005).

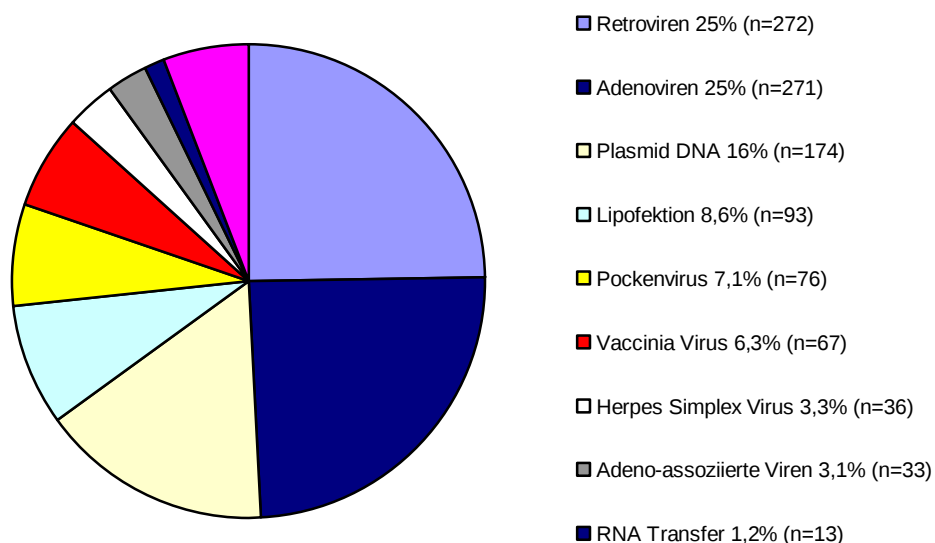


Abb. 2 Vektoren in klinischen Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2005)

Adenoviren verfügen für die gentherapeutische Anwendung über diverse Vorteile (Danthinne and Imperiale, 2000). Die adenovirale Biologie ist gut charakterisiert und die Pathogenität für Menschen gering. Sie infizieren ruhende sowie mitotisch aktive Zellen und verfügen über ein breites Wirtsspektrum. Insbesondere epitheliale Gewebe werden effizient von Adenoviren infiziert. Adenoviren integrieren nicht in das Wirtsgenom und verbleiben nach erfolgter Infektion extrachromosomal. Ferner zeichnen sich adenovirale Vektoren über eine hohe DNA-

Aufnahmekapazität aus und können leicht unter GMP (Good Manufacturing Practice quality)-Standards in therapeutisch wirksamen Dosen produziert werden.

Nachteilig für die gentherapeutische Anwendung ist die Akkumulation von Adenoviren in der Leber, die zu einer Hepatotoxizität führen kann. Einen Lösungsansatz bieten Ansätze zum transduktionellen Targeting (s. 1.4.4.2), die die gezielte Infektion von Tumorzellen anstreben. Darüber hinaus verfügen Adenoviren über eine hohe Immunogenität, insbesondere die adenoviralen Strukturproteine lösen Immunantworten aus. Für die klinische Anwendung bedeutet dies eine Untersagung der wiederholten Administration des Vektors (Somia and Verma, 2000). Neuere Studien untersuchen das Potential alternativer adenoviraler Serotypen oder tierischer Adenoviren für die Readministration (Barouch et al., 2004; Seshidhar et al., 2003).

Mehr als 50 humane Serotypen sind bekannt (Subgruppen A-F), die beim Menschen Erkrankungen des Respirationstraktes hervorrufen. Gängige adenovirale Vektorsysteme beruhen meist auf dem Adenovirus Serotyp 5 (Ad5).

1.4.1 Morphologie

Bei Adenoviren handelt es sich um nicht-gehüllte doppelsträngige DNA-Viren von ikosaedrischer Symmetrie mit einer Größe von 80-100nm. Das lineare Genom mit einer Größe zwischen 30 und 40 kb je nach Serotyp kodiert für die Gene E1A (*immediate early gene*), E1B-E4 (*early genes*) sowie L1-L5 (*intermediate und late genes*) (s. Abb. 3).

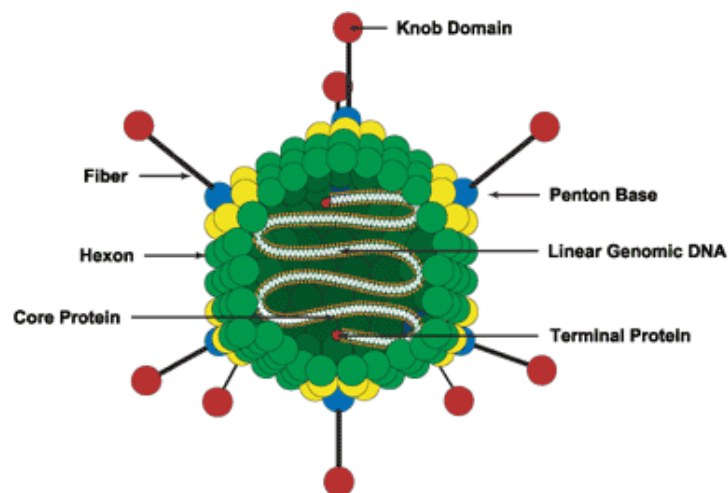


Abb. 3 Schematischer Aufbau eines Adenovirus (aus AdEasy Vector System Application Manual, 2002)

Die frühen Genprodukte dienen als transkriptionelle Aktivatoren für die späten Gene, die für Strukturproteine des viralen Capsids kodieren. Die kovalente Bindung des terminalen Proteins (TP) an die 5' DNA-Enden hält das lineare adenovirale Genom in einer pseudo-zirkulären Form. An den Enden des Ad Genoms befinden sich invertierte terminale Sequenzwiederholungen (ITR) mit einer Länge

von 50 bis 200bp, die als Primer der DNA-Replikation dienen. Relevante Proteine für den Gentransfer sind die Capsid-Proteine, zu denen das Hexon-, Pentonbasen- und das Fiberknob-Protein zählen.

1.4.2 Zelladsorption und Zelleintritt

Die adenovirale Infektion erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt bindet das Adenovirus über die knob-Domäne des Fiberproteins an den hoch-affinen Primärrezeptor. Das Ad5 Virus bindet zunächst an den Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR). Erst nach der primären Rezeptorbindung kommt es im zweiten Schritt zu einer Interaktion zwischen Pentonbasen-Protein und α_v Integrinen auf der Zelloberfläche (s. Abb. 4), worauf die Internalisierung des Virus über Endozytose folgt (McDonald et al., 1999; Wickham et al., 1993).

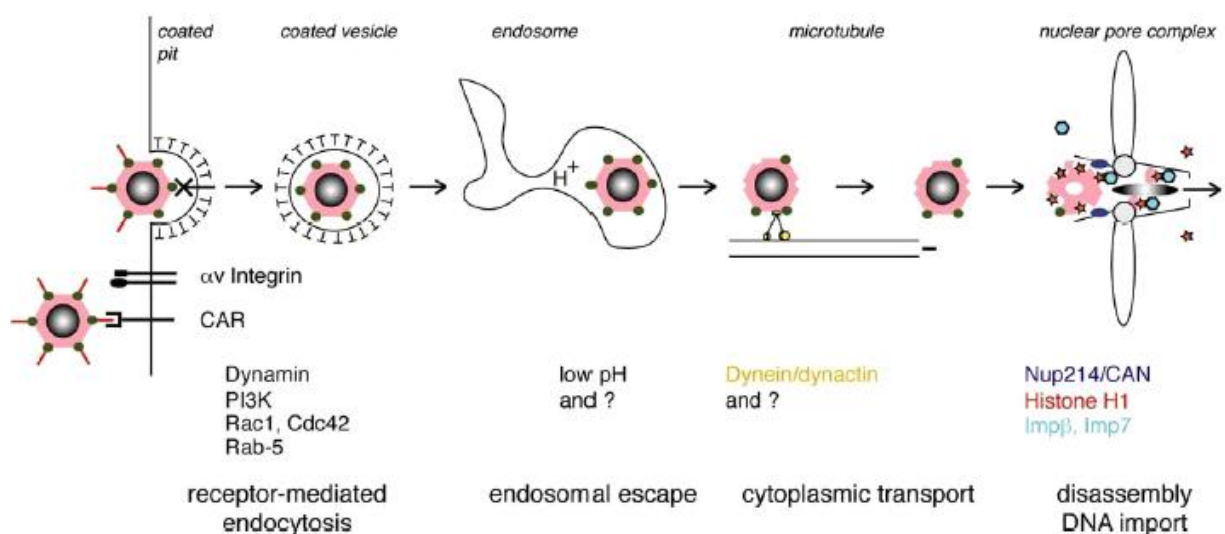


Abb. 4 Eintritt von Adenoviren der Subgruppe C in epitheliale Zellen (verändert nach U. Greber, Universität Zürich, 2002)

Durch Erniedrigung des pH-Wertes im Endosom wird eine Konformationsänderung der adenoviralen Capsid-Proteine induziert, die in der Folge mit der Endosomen-Membran interagieren und das endosomale Vesikel auflösen (Varga et al., 1991). Nach der Entlassung des Virus aus dem Endosom lagern sich die adenoviralen Partikel an den nukleären Porenkomplex an. Nur die Virus-DNA wird in den Nukleus entlassen, wo die Transkription der viralen Gene beginnt.

1.4.3 Adenoviraler Replikationszyklus

Die Transkription der adenoviralen Gene wird in die frühe und späte Phase unterteilt, die entsprechend vor oder nach der DNA-Replikation erfolgt (Fessler and Young, 1998). Die Transkription der adenoviralen Gene erfolgt von beiden DNA-Strängen und wird von alternativen Splice-Ereignissen begleitet. Die adenovirale Replikation wird über die Transkription des E1A Gens induziert, wodurch die sequentielle Transkription der frühen Gene E1B-E4 induziert wird (Volpers and Kochanek, 2004). Die frühen Genprodukte interagieren mit anti-viralen Immunabwehrmechanismen, manipulieren den

Zellzyklus und modulieren den zellulären Metabolismus, um optimale Bedingungen für die Virusreplikation zu schaffen (Russell et al., 2004). Nach der Initiation der DNA-Replikation durch die viralen E2 und E4 Genprodukte erfolgt die Expression der späten Gene L1 bis L5, die unter der Kontrolle des *major late*-Promotors stehen (Larsson et al., 1992; Russell, 2000). Die späten Gene kodieren für strukturelle Virusproteine. Neue Virionen werden im Nukleus aus viralen Hüllproteinen und dem Virusgenom zusammengesetzt. Als finaler Schritt der Virusreplikation wird die Zelllyse induziert und die neu synthetisierten Virionen werden entlassen.

1.4.4 Adenovirale Vektorsysteme

Adenoviren können leicht zu Genvehikeln für gentherapeutische Anwendungen modifiziert werden. Bei adenoviralen Vektoren der ersten Generation wurden die frühen Gene E1 und E3 deletiert, um die Transgenkapazität zu erhöhen. Infolgedessen sind Erstgenerationsvektoren replikations-defizient und können etwa 8kb Fremd-DNA aufnehmen (Danthinne and Imperiale, 2000). Adenovirale Vektoren der zweiten Generation tragen zur Erhöhung der Insertkapazität weitere Gendeletionen und erzielten verbesserte anti-tumorale Effekte (Barton et al., 2006; Krasnykh et al., 2000; Gorziglia et al., 1996). *Gutless* Vektoren, bei denen alle viralen Gene deletiert wurden, zeichnen sich durch eine reduzierte Immunogenität aus (Kochanek et al., 1996; Wang et al., 2004). Trotz guter präklinischer Erfolge erzielten nicht-replikative Adenoviren in klinischen Studien nur mäßige Erfolge und eigneten sich in Ergänzung zu konventionellen Therapien für die Eliminierung kleiner Tumorreste. Um therapeutisch relevante Transduktionsraten zu erzielen, wurden replikations-kompetente Adenoviren entwickelt. Aufgrund der selektiven Replikation in Tumorzellen erzielen diese so genannten onkolytischen Adenoviren oder konditional replikative Adenoviren (CRAds) höhere Transduktionsraten als nicht-replikative Ad-Vektoren.

1.4.4.1 Transduktionelles Targeting

Um die Gentransferrate der adenoviralen Gentherapie zu erhöhen, wurde der Tropismus adenoviraler Vektoren verändert. Das transduktionelle Targeting beschreibt die Zielzell-spezifische Modifikation der adenoviralen Primärrezeptor-Bindung, die über den Einsatz spezifischer Adapter-Moleküle oder durch genetische Veränderungen der Virushülle erreicht werden (s. Abb. 5). Als weiteres Ziel wird die Reduktion des Ad5-Tropismus für normale epitheliale Gewebe angestrebt. Damit birgt das transduktionelle Targeting ein hohes Potential, um die Effizienz und Spezifität der adenoviralen Gentherapie entscheidend zu verbessern.

Die Anwendung bispezifischer Adaptermoleküle, die simultan die adenovirale Fiber-knob-Domäne und tumorspezifische Antigene auf der Zielzelloberfläche binden, konnte bei Erstgenerationsvektoren erfolgreich eine Steigerung des Gentransfers bewirken (Haisma et al., 2000; Haisma et al., 1999; Reynolds et al., 2000; Douglas et al., 1996). Dabei wurde die Fusion von natürlichen Liganden (Douglas et al., 1996; Rancourt et al., 1998) oder Anti-Rezeptor-Antikörpern (Miller et al., 1998;

Haisma et al., 1999; Kelly et al., 2000) mit einem anti-knob-Fab-Fragment erfolgreich erprobt. Der Einsatz eines Fusionsproteins mit EGFR-Spezifität, das als knob-bindende Komponente eine lösliche CAR-Form (sCAR) enthält, erzielte in EGFR-positiven Tumoren eine deutliche Steigerung des Gentransfers (Dmitriev et al., 2000).

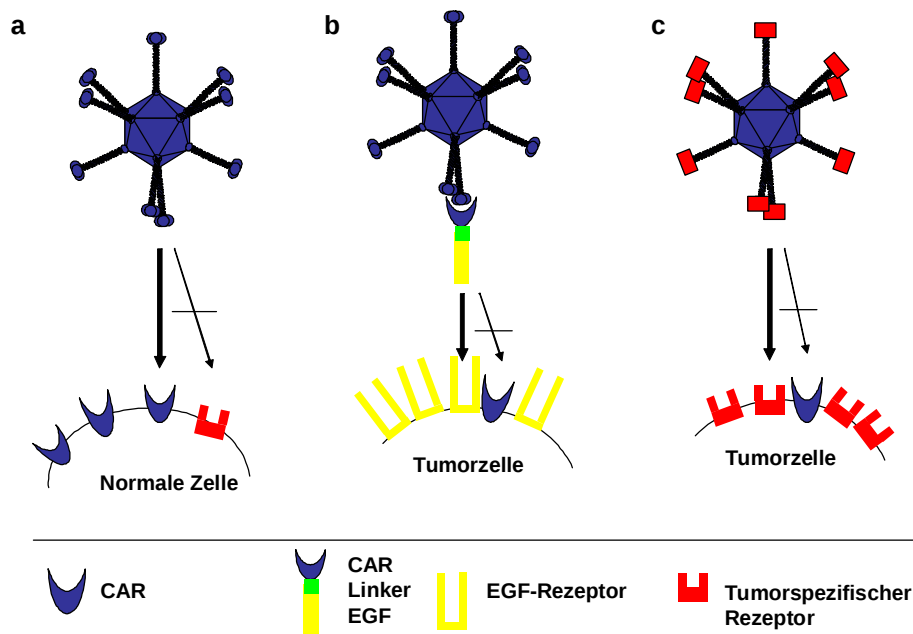


Abb. 5 Transduktionelles Targeting a) CAR-Rezeptorbindung von Ad5 in normalem Gewebe b) alternative Ad-Rezeptorbindung durch die Verwendung von Adaptermolekülen. Das sCAR-EGF-Fusionsprotein bindet den EGF-Rezeptor, der in vielen Tumoren überexprimiert wird. c) CAR-unabhängige Rezeptorbindung über genetische Modifikationen der Fiber-knob-Domäne

Jedoch ist der Einsatz von Adaptermolekülen für onkolytische Viren ungeeignet, da das Targeting produzierter Virusnachkommen problematisch ist. Alternativ wurden genetische Tropismusmodifikationen des adenoviralen Capsids entwickelt (s. Abb. 5). Nach der Insertion heterologer Liganden wurde die adenovirale Bindung an alternative Rezeptoren wie α_v Integrine (Wickham et al., 1996; Gonzalez et al., 1999), CD3 (Wickham et al., 1997), CD40 (Tillman et al., 2000) oder an das prostate membrane antigen (PSMA) (Kraaij et al., 2005) *in-vitro* und *in-vivo* evaluiert. Bewährt haben sich Peptidinsertionen von bis zu 100 Aminosäuren in den HI-Loop der Fiber-knob-Domäne, die die Integrität der Virionen nur minimal beeinflussen (Krasnykh et al., 1998).

Die Inkorporation des Tripeptids RGD in den HI-Loop konnte die Transduktion von Tumorzellen *in-vitro* und *in-vivo* erhöhen, da $\alpha_v\beta$ -Integrine auf Tumoren und Gefäßen häufig überexprimiert werden (Dmitriev et al., 1998b). Darüber hinaus zeigte die RGD-Inkorporation eine gewisse Tumorselektivität, da nur die Gentransferraten in maligne Zellen, nicht jedoch in gesunde Zellen erhöht wurden (Bauerschmitz et al., 2002b).

Die Doppel-Fibermodifikationen aus RGD- und Polylysin-Motiv erzielte gegenüber der singulären Modifikation überlegene Gentransferraten (Wu et al., 2002; Rein et al., 2004).

Insgesamt ermöglicht die Insertion heterologer Liganden-Motive in die Fiber-knob-Domäne eine erhöhte Transduktion der Zielzellen, da neben der klassischen CAR-Bindung eine alternative Rezeptorbindung möglich ist (Dmitriev et al., 1998a; Krasnykh et al., 1998). Interessanterweise bewirkten Tropismusmodifikation adenoviraler Vektoren eine Reduktion der Hepatotoxizität (Rein et al., 2005b; Printz et al., 2000).

Die CAR-unabhängige Transduktion wird durch die Deletion der knob-Domäne (deknobbing) und die nachfolgende Insertion heterologer Liganden erzielt (Henning et al., 2005; Krasnykh et al., 2001; Magnusson et al., 2001). Dabei muss die Funktionalität des chimären Fiberproteins zur Trimerisierung und Nukleus-Translokation sichergestellt werden.

In diesem Zusammenhang wurde die Fiber-Pseudotypisierung untersucht, die die Substitution der Fiber-knob-Domäne durch alternative Serotypen beschreibt. Dabei ist die Ad5-knob-Substitution durch die komplette Fiber oder die singuläre knob-Domäne von Subgruppe B Adenoviren von großem Interesse. Gruppe B Adenoviren binden CAR-unabhängig alternative zelluläre Rezeptoren. Durch die Ad5/3 bzw. Ad5/35 Fiber-Pseudotypisierung konnte die Gentransfereffizienz von Ovarial- bzw. Mammakarzinomzellen mit niedriger CAR-Expression deutlich verbessert werden, (Kanerva et al., 2002; Shayakhmetov et al., 2002).

1.4.4.2 Transkriptionelles Targeting

Schwere Nebenwirkungen, die auf dem unspezifischen Gentransfer in Nicht-Zielorgane beruhen, können durch die transkriptionelle Regulation des therapeutischen Gens vermieden werden. Das transkriptionelle Targeting zielt auf die begrenzte Expression des therapeutischen Gens in Tumorzellen, indem heterologe tumorspezifische Promotoren (TSP) die Expression des Therapiegens steuern (s. Abb. 6). So wird die Spezifität der adenoviralen Genthherapie deutlich gesteigert und toxische Begleiterscheinungen werden reduziert.

Diverse Gewebe-spezifische Promotoren wurden bereits identifiziert und für die gentherapeutische Anwendung charakterisiert z.B. der Melanom-spezifische Tyrosinase-Promotor (Nettelbeck et al., 2002e; Rivera et al., 2004b), der Cyclooxygenase-2 (Cox2)-Promotor für Magen- und Ovarialtumore (Casado et al., 2001; Yamamoto et al., 2001), der Mammakarzinom-spezifische Heparanase-Promotor (Breidenbach et al., 2005) oder der Promotor der humanen Telomerase-reversen Transkriptase hTERT) (Song et al., 2003). Ferner wurden Strahlen- oder Drug-induzierbare Promotoren wie der Promotor des *early growth response gene 1* (Egr-1) evaluiert (Manome et al., 1998b).

Zudem wird auch die Replikation onkolytischer Adenoviren über tumorspezifische Promotoren reguliert. Dabei wird die selektive Virusreplikation durch die transkriptionelle Kontrolle eines oder mehrerer relevanter Replikationsgene (E1A, E1B, E4) erreicht (Nettelbeck et al., 2002d; Hernandez-Alcoceba et al., 2000; Hernandez-Alcoceba et al., 2002). Damit hängt die Virusreplikation nun direkt von der transkriptionellen Aktivität des heterologen Promotors ab.

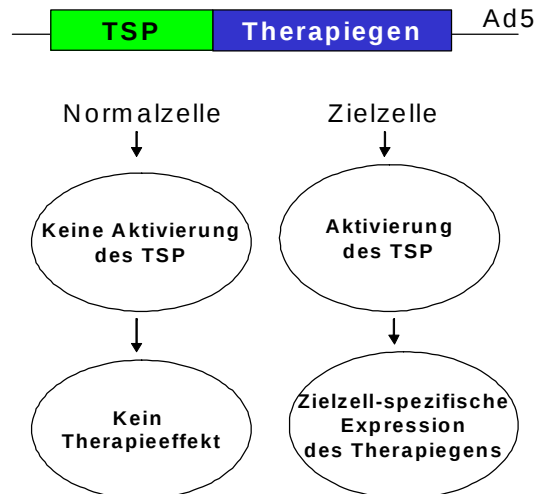


Abb. 6 Transkriptionelles Targeting. Der tumorspezifische Promotor (TSP) steuert die Expression des Therapiegens oder essentieller Gene der Virusreplikation (E1A, E1B, E4). Die Transkription des Therapiegens (nicht-replikative Ad) oder der frühen viralen Gene E1A/E1B/E4 (onkolytische Adenoviren) erfolgt selektiv in Tumorzellen, in denen der TSP aktiv ist.

Ein idealer Promotor für die Krebstherapie weist hohe Aktivitäten im Tumorgewebe auf, wohingegen der Promotor keine Aktivität in lebenswichtigen Organen (z.B. Herz, Niere, Hirn) und insbesondere der Leber aufweisen sollte, um toxische Nebenwirkungen im Normalgewebe zu vermeiden. Die Spezifität der zellulären Promotoren im viralen Genom sollte genauestens evaluiert werden, da die Promotorspezifität durch den Einfluss viraler *cis* und *trans* agierender Faktoren variieren kann (Babiss et al., 1987).

1.4.5 Herausforderungen für die Gentherapie

Obwohl Erstgenerationsvektoren in klinischen Studien gut toleriert wurden, wurde nur bei wenigen Patienten ein erhöhtes Langzeit-Überleben festgestellt. Dabei scheint die Gentransfereffizienz limitierend zu sein (Sternan et al., 2005).

Daher ist es für den klinischen Erfolg der Gentherapie von entscheidender Bedeutung, die Gentransferrate im Zielgewebe zu optimieren. Aufgrund ihrer natürlichen Biologie verfügen Viren über sehr effiziente Mechanismen ihr Genom in die Wirtszellen einzuschleusen. Dennoch verzeichneten Ad5 basierte Vektoren gerade bei Primärtumoren reduzierte Gentransferraten (Kim et al., 2002). Viele maligne Tumore zeichnen sich durch eine CAR-Defizienz aus (Li et al., 1999; Asaoka et al., 2000), wodurch sie gegenüber der Ad5 Infektion resistent sind. Andererseits werden virale Rezeptoren gerade auf epithelialen Normalgeweben stark exprimiert. Dies bedeutet eine hohe Effizienz des viralen Gentransfers im gesunden Gewebe, woraus einerseits unspezifische Nebenwirkungen im Normalgewebe und andererseits eine reduzierte Gentransfereffizienz der Zielzellen resultiert.

Für den erfolgreichen Gentransfer *in-vivo* müssen sich Gentransfervektoren zunächst dem Immunsystem entziehen. Adenoviren verfügen über eine hohe Immunogenität und die Präsenz neutralisierender Ad5-Antikörper bei Erwachsenen erschwert die erfolgreiche adenovirale Infektion zusätzlich (Nwanegbo et al., 2004; Chirmule et al., 1999). So wird die Transduktionseffizienz des adenoviralen Vektors durch die Induktion starker Immunantworten und Entzündungsreaktionen reduziert (Molnar-Kimber et al., 1998; Gahery-Segard et al., 1997b). Humane adenovirale Vektoren verursachen je nach Applikation unterschiedliche humorale Immunantworten (Harvey et al., 1999; Gahery-Segard et al., 1997a). Somit hat der Weg der Vektoradministration einen Einfluss auf den Gentransfer in das Zielgewebe.

In der Krebstherapie werden virale Vektoren oft direkt in das Tumorgewebe injiziert, um einen therapeutisch relevanten Gentransfer zu erzielen. Bei den meisten klinischen Genterapiestudien wurde eine intratumorale Applikation des Vektors angewandt, die jedoch vorzugsweise für lokal begrenzte und gut zugängliche Tumorgewebe geeignet ist. Für die klinische Genterapie von Ovarialkarzinomen, die in der Bauchhöhle lokalisiert und daher schwer zugänglich sind, hat sich die intraperitoneale Vektorapplikation bewährt (Buller et al., 2002a; Alvarez et al., 2000b). Jedoch wird die intraperitoneale Applikation des adenoviralen Vektors durch die Präsenz neutralisierender Antikörper in Aszites erschwert (Stallwood et al., 2000).

Im Gegensatz dazu erfordert die Behandlung disseminierter Tumorerkrankungen die systemische Applikation des Vektors. In klinischen Studien wurde bereits die intravenöse CRAd-Applikation für das metastasierte Osteosarcom gut toleriert (Benjamin et al., 2001). In einer Phase II-Studie wurde bei Patienten mit metastasierten gastro-intestinalen Tumoren durch die hepatische arterielle CRAd-Infusion ein moderates Therapieansprechen bei guter Verträglichkeit erzielt (Reid et al., 2002).

Nach dem kritischen Schritt der Virusinfektion muss die Transgenexpression in den Zielzellen gewährleistet werden. Dabei sollte das Therapiegen in den Zielzellen so stark exprimiert werden, dass ein Therapieansprechen möglich ist. Jedoch sollte das Therapiegen nicht in Normalgewebe exprimiert werden, um unspezifische Nebenwirkungen zu vermeiden.

Aufgrund der Virusbiologie ist die Adenovirus-vermittelte Transgenexpression transient. Daher werden adenovirale Vektoren hauptsächlich für die Krebstherapie eingesetzt, die für die Induktion einer therapeutischen Antwort lediglich eine kurze Transgenexpression benötigen.

1.4.6 Konditional replikative Adenoviren (CRAds)

Die Virotherapie verwendet Viren als lytische Agenzien für die Tumorthherapie. Konditional replikative Adenoviren (CRAds) repräsentieren eine neue Klasse anti-tumoraler Vektoren, die den Ansprüchen einer sich selbst-erneuernden und selbst-limitierenden Therapieoption genügen (s. Abb. 7). Um Nebenwirkungen zu minimieren und die Sicherheitsaspekte zu optimieren, wurden CRAd-Vektoren derart modifiziert, dass die Virusreplikation auf Tumorgewebe beschränkt wird.

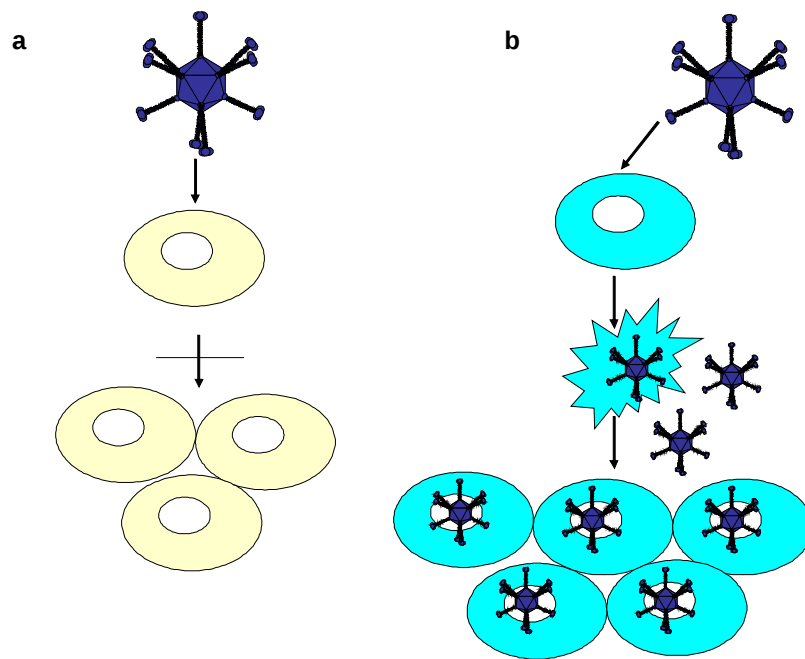


Abb. 7 Konditional replikative Adenoviren (CRADs) a) CRADs replizieren nicht in benignen Zellen, die infolgedessen von der Zelllyse verschont werden. b) Die Infektion von Tumorzellen resultiert in Virusreplikation, Onkolyse und nachfolgender Freisetzung der Virionen. Die virale Replikation erlaubt die lokale Amplifikation der initialen Vektordosis.

Während in Nicht-Zielzellen die adenovirale Replikation unterdrückt wird, führt die Virusreplikation nach Infektion der Zielzelle zu einer Amplifikation der initialen Vektordosis. Die Dauer eines Replikationszyklus beträgt je nach Serotyp zwischen 18 und 36h. Durch die nachfolgende Lyse der Wirtszelle werden die produzierten Virionen aus der Zelle entlassen und können ihrerseits nun benachbarte Zielzellen infizieren und abtöten. Theoretisch ist ein CRAd-Partikel ausreichend, um eine effiziente Tumورpenetration und Zelllyse des Tumorgewebes (Onkolyse) zu induzieren.

Kritische Punkte der CRAd-Replikation sind (i) die bevorzugte Infektion der Zielzellen sowie (ii) die Begrenzung der adenoviralen Replikation auf die Zielzellen. Beide Ziele werden durch gezielte Modifikationen des CRAd-Genoms erreicht. Bis heute wurden drei verschiedene Klassen von CRAd-Vektoren (Typ I bis III) entwickelt (s. Abb. 8).

Typ I CRADs tragen Mutationen in relevanten Replikationsgenen (E1A, E1B-55kDa, E4-34kDa), wodurch die CRAd-Replikation auf Zellen mit Defekt in dem p53/p14ARF (Bischoff et al., 1996) oder pRb-p16 (Fueyo et al., 2000b) Signalweg beschränkt wird, die die viralen Gendefekte kompensieren.

Das bekannteste Typ I CRAd ist ONYX-015 (dl1520) (Bischoff et al., 1996; Heise et al., 1999; Heise et al., 1997), das bereits in klinischen Studien (Phase I bis III) erfolgreich in der Kombinationstherapie bei Kopf-Hals-Tumoren (Lamont et al., 2000; Ganly et al., 2000; Khuri et al., 2000a) sowie beim Pankreas-Karzinom (Hecht et al., 2003; Kasuya et al., 2005; Mulvihill et al., 2001) und Ovarialkarzinom (Vasey et al., 2002b) eingesetzt wurde. Durch die Deletion der p53-inhibierenden Region des E1B-55kD Proteins sollte die Replikation von ONYX-015 auf Tumorzellen beschränkt

werden, die häufig einen Defekt im p53-Signalweg aufweisen. Erste präklinische Studien demonstrierten die selektive Replikation von ONYX-015 in p53-defizienten Tumoren (Bischoff et al., 1996), wohingegen ONYX-015 nicht in Epithel- oder Endothelzellen mit intaktem p53 replizierte (Heise et al., 1997). Spätere Studien zeigten, dass die ONYX-015-Replikation nicht mit dem p53-Status korrelierte (Rothmann et al., 1998; Goodrum and Ornelles, 1998). Klinische Phase I/II Studien belegen die bevorzugte Replikation von ONYX-015 in Tumorzellen gegenüber Normalgewebe. Da die Funktionen von E1B-55kDa über die p53-Bindung hinausgehen, ist die Replikationseffizienz von ONYX-015 in Relation zu Ad5 Wildtyp (Ad5Wt) reduziert. Da nicht die Verträglichkeit sondern eher die anti-tumorale Effizienz der ONYX-015 Virotherapie limitierend zu sein scheint, wurde versucht, das Therapieansprechen durch die Kombination mit einer Chemotherapie oder durch die Insertion von Suizidgenen (Cytosindesaminase, HSVtk) zu erhöhen (Galanis et al., 2005; Freytag et al., 1998).

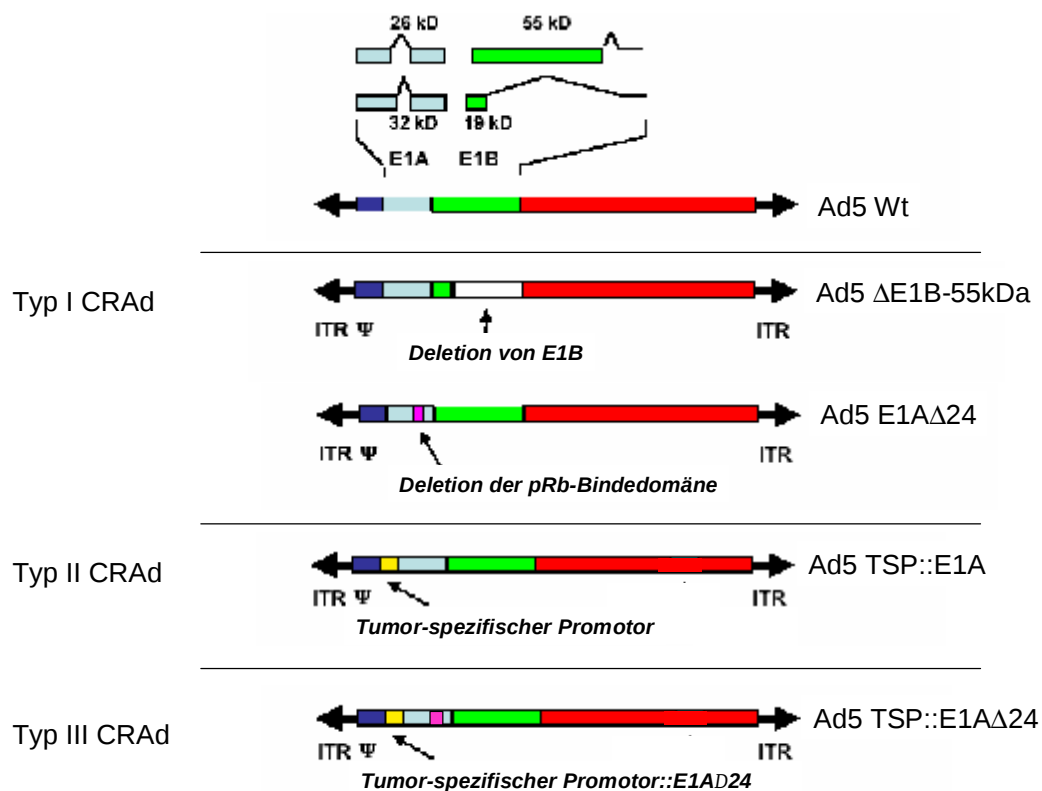


Abb. 8 Darstellung konditional replikativer Adenoviren (CRADs) des Typs I, II und III. E1A, *immediate early gene*; E1B, *early gene*; TSP, Tumor-spezifischer Promotor; ITR, invertierte terminale Sequenzwiederholungen; ΔE1B, Deletion des E1B-Gens; Δ24, 24 bp-Deletion des E1A-Gens (verändert nach S. Kochanek, ESGT 2004)

Andere Typ I CRADs tragen eine 24 Basenpaar (bp)-Deletion (Δ24) in der Retinoblastoma (pRb)-Bindedomäne des E1A-Gens (Fueyo et al., 2000a; Nettelbeck et al., 2002c). Intaktes E1A-Protein bewirkt in ruhenden Zellen die Inaktivierung und Phosphorylierung des pRb-Proteins, wodurch der G2/M-Restriktionspunkt überschritten und die S-Phase der Mitose induziert wird. Die effiziente

Replikation von Adenoviren mit mutiertem E1A Δ 24-Protein erfolgt nur in Zellen mit Defekt in dem pRb-p16-Signalweg, in denen eine pRb-Inaktivierung für den S-Phase Eintritt nicht notwendig ist. Ein solcher pRb-Defekt liegt in vielen humanen Tumoren vor, nicht jedoch in Normalgewebe. Für nicht-proliferierende Normalzellen konnte eine reduzierte Replikation Δ 24-deletierter Adenoviren beschrieben werden (Fueyo et al., 2000c).

Die Replikationskontrolle von Typ II CRAds erfolgt durch die Insertion heterologer Promotoren, die die Expression relevanter Gene für die Virusreplikation (E1A, E1B, E4) kontrollieren. Damit ist die Virusreplikation nun abhängig von der Aktivität und Spezifität des heterologen Promotors (s. 1.4.4.2). Die ersten Studien wurden mit den Promotoren des α -Fetoproteins (AFP) und Prostata-spezifischen Antigens (PSA) durchgeführt, um die tumorspezifische Expression des E1A-Gens beim Leberkarzinom bzw. Prostatakarzinom zu induzieren (Yu et al., 1999b; Hallenbeck et al., 1999; Rodriguez et al., 1997).

Das Prostatakarzinom-spezifische CRAd CV706 wurde bereits in klinischen Studien als Monotherapie getestet. Trotz guter Toleranz und tumorspezifischer Virusreplikation war das Therapieansprechen gering (DeWeese et al., 2001). Die Doppelregulation von E1A-E1B über zwei verschiedene PSA-Promotoren oder von E1A-E4 über Melanom-spezifische Promotoren konnte die Selektivität der Virusreplikation zusätzlich erhöhen (Yu et al., 1999a; Doronin et al., 2001; Li et al., 2005).

Typ III CRAds basieren auf der Kombination der genetischen Modifikationen von Typ I und Typ II CRAds. Folglich weisen Typ III CRAds Deletionen in relevanten Replikationsgenen auf, die wiederum durch heterologe Promotoren reguliert werden. Damit verfügen Typ III CRAds über die höchst mögliche Spezifität der adenoviralen Replikation (Nettelbeck et al., 2002b). Einschränkend gilt jedoch, dass in Relation zu wildtypischen Ad5 Viren jede Modifikation des adenoviralen Genoms limitierend auf die Replikationskompetenz des Virus wirkt (Bauerschmitz et al., 2002a; Nettelbeck et al., 2002a).

Die CRAd-basierte Virotherapie, die in klinischen Studien moderate anti-tumorale Effizienzen erzielte, bietet sich für die Eliminierung minimal-residualer Tumorerkrankungen in Kombination mit konventionellen Therapien an. Bisherige Studien enthüllten additive und synergistische Effekte einer kombinierten Chemo-Virotherapie (s. Tabelle 3). Durch die individuelle Anpassung der Virotherapie auf die Situation der Patientin könnte die Selektivität und Effizienz einer alleinigen Chemotherapie erhöht werden. Ferner belegen Studien, dass Mehrfachmodifikationen aus transduktionellem und transkriptionellem Targeting sowie attenuierenden Deletionen die therapeutische Effizienz der Virotherapie steigern können (Rivera et al., 2004a).

Tabelle 3: Klinische Studien mit konditional replikativen Adenoviren (CRAds)

	Therapieansatz	Route	Dosis	Phase	Referenz
Zervixkarzinom	Wildtyp-Adenoviren (verschiedene Serotypen)	i.t., i.a., i.v.	./.	./.	(HUEBNER et al., 1956)
Kopf-Hals-Tumore (SCCHN)	ONYX-015	i.t.	2x10 ¹¹ VP/Tag x 5Tage	II	(Nemunaitis et al., 2001)
	ONYX-015	i.t., i.p.	1x10 ¹⁰ PFU/Tag x 5Tage, 3 Wochen- Zyklus	II	(Nemunaitis et al., 2000)
	ONYX-015 + 5-FU/Cisplatin	i.t.	2x10 ¹¹ VP/Tag x 5 Tage, 3 Wochen- Zyklus	II	(Khuri et al., 2000b)
Kolonkarzinom (metastasiert)	dl1520 (Originalbezeichnung von ONYX-015)	i.h.a.	2x10 ¹² VP/Tag 1,8 + 5-FU + Leukovorin	II	(Reid et al., 2001)
Prostatakarzinom	Ad5-CD/TKrep	i.t.	1x10 ¹² VP + 5- Fluorocytosin + Ganciclovir	I	(Freytag et al., 2002)
	CV706	i.t.	1x10 ¹³ VP	I	(DeWeese et al., 2001)
Ovarialkarzinom	ONYX-015	i.p.	1x10 ¹¹ PFU/Tag x 5 Tage	I	(Vasey et al., 2002a)
	ONYX-015	i.p.	1x10 ¹³ PFU/Tag x 5Tage	I	(Kirn, 2001)
Refraktäre Malignome	ONYX-015 + IL-2	i.v.	2x10 ¹¹ VP/Woche x 6 Wochen	Pilot	(Nemunaitis et al., 2003)

1.4.7 Virotherapie für fortgeschrittene gynäkologische Malignome

Aufgrund der steigenden Inzidenzrate des Mammakarzinoms sowie einer fehlenden Frühdiagnose für Ovarialkarzinome steht die Entwicklung innovativer therapeutischer Ansätze für das Mamma- und Ovarialkarzinom im Mittelpunkt der gynäkologischen Onkologie. Die CRAd-basierte Virotherapie bietet eine interessante Therapieoption für lokale und disseminierte gynäkologische Tumorerkrankungen. Dabei sind die höchsten Therapieeffekte durch doppelt-modifizierte CRAd-Vektoren (transduktionell und transkriptionell redirigierte Adenoviren) zu erwarten (Zhu et al., 2005; Rein et al., 2005a).

1.4.7.1 Gewebespezifischer Promotor: Humanes α -Lactalbumin

Für die gezielte Virotherapie des Mammakarzinoms eignen sich Promotoren, die von Genen der Milchproduktion abgeleitet wurden. Die Laktation repräsentiert ein einzigartiges Merkmal der Mamma-Organspezifität. Somit werden die Gene, die für Milch-bildende Proteine wie Casein oder α -Lactalbumin (ALA) kodieren, spezifisch im Brustgewebe exprimiert.

Der Promotor des humanen α -Lactalbumin repräsentiert einen solchen Mamma-spezifischen Promotor mit transkriptioneller Aktivität im Brustgewebe. Interessanterweise besteht ein Zusammenhang zwischen ALA-Expression und der Karzinogenese des Mammakarzinoms (MaCa). Im Verlauf der MaCa-Karzinogenese wurden Veränderungen beschrieben, die eine Übereinstimmung mit laktierendem Mammagewebe während der Stillzeit haben (Wiseman and Werb, 2002). Über 60% der Mammakarzinome sind ALA-positiv, eine prognostische Bedeutung wurde dem ALA-Expressionsstatus bisher nicht zugesprochen (Kleinberg et al., 1977; Thean and Toh, 1990; Hall et al., 1981).

Der proximale 5' nicht-translatierte Bereich des ALA-Gens (-737 bis +14bp) wurde von Anderson et al. (1999) erfolgreich für die tumorspezifische Suizidgenexpression eingesetzt. Der putative ALA-Promotor vermittelte ausschließlich in Mammakarzinom-Zelllinien eine erfolgreiche Suizidgenexpression, nicht hingegen in Tumorzellen anderen Ursprungs. Darüber hinaus wurde die Tumorspezifität des putativen ALA-Promotors im Xenotransplantat-Mausmodell bestätigt (Anderson et al., 1999). Die Applikation eines Adenovirus mit ALA-reguliertem Luziferase-Reportergen vermittelte selektiv in Tumorzellen die Transgenexpression, in Leberzellen wurde keine ALA abhängige Luziferase-Aktivität gemessen.

1.4.7.2 Induzierbarer Promotor: multiple drug resistance gene 1

Die sehr schlechte Prognose fortgeschrittener Ovarialkarzinome wird durch die Resistenz von Tumorzellen gegenüber herkömmlichen Zytostatika (Chemoresistenz) verursacht. In der Folge entkommen poly-chemoresistente Tumorzellen der Chemotherapie, wodurch Metastasierung und Rezidivierung des Primärtumors begünstigt werden.

Die Aktivierung einer Virotherapie über pharmakologische Induktoren, die Teil einer konventionellen Strahlen- oder Chemotherapie sind, könnte das Therapieansprechen resistenter Tumore erhöhen. Zudem erlaubt die Modulation der Transgenexpression eine Steigerung der Selektivität und Reduktion unspezifischer Nebenwirkungen (Nettelbeck et al., 2000).

Die Promotoren Egr-1 und MDR1 vermittelten nach Induktion durch therapeutische Dosen einer Strahlen- oder Chemotherapie die Suizidgenexpression, die zu anti-tumoralen Therapieantworten *in-vitro* und *in-vivo* führten (Lopez et al., 2004; Walther et al., 1997a; Manome et al., 1998a).

Das p-Glykoprotein (p-Gp) ist als klinisch relevanter Faktor für die Ausbildung von Multidrug-Resistenzen nach Chemotherapie verantwortlich. Als ATP-abhängige Drug-Efflux-Pumpe vermittelt

das P-Glykoprotein Resistenzen gegenüber Anthrazyklinen und Taxanen. Das P-Glykoprotein wird von dem MDR1-Gen kodiert und gehört der Familie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter an, die xenobiotische Substanzen aus der Zelle heraustransportieren und die Zelle vor toxischen Effekten schützen (Kerb et al., 2001). So erhalten Tumorzellen einen Wachstumsvorteil in der Gegenwart Multi Drug Resistenz-assoziiierter Agenzien (Goldie, 1994; Coldman and Goldie, 1987).

Aufgrund der Induzierbarkeit des MDR1-Promotors über Umweltstimuli stützen viele Studien die Idee, dass es sich bei MDR1 um ein Stress-induziertes SOS-Gen handelt (Venetianer et al., 1994; Chaudhary and Roninson, 1993; Walther et al., 2002). In diesem Zusammenhang wurde die schnelle MDR1-Geninduktion als Antwort auf Toxin- und Zytostatika-Gabe beschrieben (Abolhoda et al., 1999; Walther et al., 1997b). Andere Studien betonen die anti-apoptotische Funktion der p-Gp-Überexpression, da p-Gp überexprimierende Zellen gegen Apoptose-Induktoren wie FASL, UV-Strahlen, TNF α oder die Komplement-System vermittelte Zytotoxizität resistent sind.

Die MDR1-Promotor regulierte Virotherapie könnte die Eliminierung chemoresistenter Tumorzellen ermöglichen, die durch heutige Therapieoptionen nicht erreicht werden (s. Abb. 9). Aufgrund der MDR1-Basalexpression in Leber und Niere müssen insbesondere unspezifische toxische Effekte der Virotherapie evaluiert werden (Sugawara et al., 1997; Israeli et al., 2005).

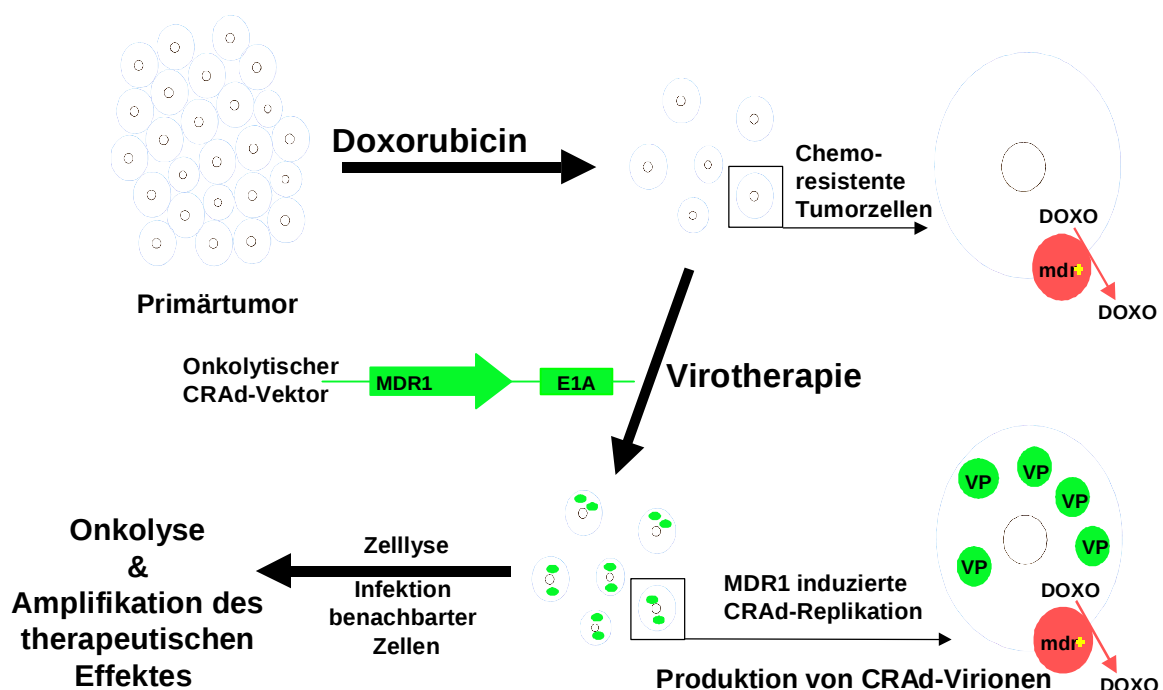


Abb. 9 Prinzip der Chemo-induzierbaren Virotherapie. Nach der operativen Entfernung des Primärtumors werden residuale Tumorzellen zunächst mit den potenten MDR1-Induktoren Paclitaxel oder Doxorubicin einer Chemotherapie unterzogen. Residuale Tumorzellen verfügen folglich über eine MDR-Resistenz, die die Aktivität des MDR1-Promotors in den Tumorzellen voraussetzt. Nach Administration der MDR1-Promotor regulierten CRAds erfolgt die CRAd-Replikation selektiv in Tumorzellen mit MDR-Resistenz. Die nachfolgende Onkolyse wird selektiv in Tumorzellen mit MDR-Resistenz induziert, Normalgewebszellen ohne MDR-Aktivität werden verschont.

1.5 Ziele der Arbeit

Konditional replikative Adenoviren (CRAds) erzielten als innovative anti-tumorale Agenzien erste klinische Therapieerfolge.

Ein weithin ungelöstes Problem der CRAd-Virotherapie besteht in der Resistenz von Malignomen gegenüber konventionellen Ad5-Vektoren, wodurch die Gentransfereffizienzen sowie die Therapiewirkung drastisch reduziert werden. Als zweites Kriterium der erfolgreichen Virotherapie muss die Spezifität der Virusreplikation sichergestellt werden, um toxische Nebenwirkungen zu vermeiden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung neuer CRAd-Vektoren, die neben einem optimierten Gentransfer eine möglichst hohe Spezifität für gynäkologische Malignome aufweisen sollten. Dabei sollte die CRAd-Therapie für (i) das fortgeschrittene chemoresistente Ovarialkarzinom sowie (ii) das fortgeschrittene metastasierte Mammakarzinom in Bezug auf Spezifität und Effizienz optimiert werden.

Folgende Aufgabenstellungen ergeben sich:

- (1) Erhöhung der Infektionsrate von CRAd-Vektoren für maligne gynäkologische Tumore
- (2) Charakterisierung potentieller Kandidatenpromotoren für eine Virotherapie
- (3) Optimierung der Virotherapie durch Kombination des transduktionellen und transkriptionellen Targetings
 - (3a) Entwicklung einer selektiven Virotherapie für das MaCa
 - (3b) Entwicklung einer Virotherapie für chemoresistente OvCa

Auf der Basis dieser präklinischen Erkenntnisse könnte sich eine gezielte Virotherapie für fortgeschrittene gynäkologische Malignome entwickeln lassen, die zu einer Verbesserung der Prognose betroffener Patientinnen beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Tabelle 1 enthält die Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

A.L.F.-Auftragspuffer

100 ml Formamid
5 g Amberlite
600 mg Dextran
4 ml 20 mM EDTA, pH 8,3

Bindesilan

4 ml Ethanol absolut
15 µl Bindsilan (Pharmacia)
1 ml 10% Essigsäure

Formalin

10% Formaladhyd (37%) in PBS

Lösung für A.L.F.-Gele

25,2 g Harnstoff
9 ml Monomerenlösung (40 %)
25,5 ml Aqua dest.
6 ml 6 x TBE
0,2 ml 10% APS
40 µl TEMED

Monomerenlösung (29:1)

29% Acrylamid
1% N,N-Methylen-bisacrylamid

Probenpuffer für A.L.F. Gele

7 mol/l Harnstoff
40% (v/v) Glycerin
50 mmol/l EDTA
10 mmol/l Tris
0,1% (w/v) Bromphenolblau

1 x TBE

0,2 M Tris
0,17 M Borsäure
2 mM EDTA, pH 8,0

1 x TE

10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

10 x TBS

80g NaCl
Tris 12,1g = 0,1M Tris/HCl pH7,3

Trenngelpuffer

1M Tris/HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer

1M Tris/HCl pH 6,8

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Tabelle 2 enthält eine Auflistung der verwendeten Zelllinien mit Ursprung, Herkunft sowie relevante Zellkulturmedien und Zusätze.

Tabelle 2: Kulturmedien und Herkunft der Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Zusatz	Bezug
BT-20	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-19)
BT-474	Mammakarzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-20)
MCF-7	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-22)
MDA-MB-231	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-26)
MDA-MB-468	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
SK-BR-3	Mammakarzinom	McCoy's 5A	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-30)
T-47-D	Mammakarzinom	MEM	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-133)
ZR-75-1	Mammakarzinom	MEM	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, USA
Hey	Ovarialkarzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	Prof. Pfeleiderer, Uni Freiburg, Deutschland
MDAH 2774	Ovarialkarzinom	DMEM (4,5 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (CRL-10303)
SK-OV-3	Ovarialkarzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-77)
SK-OV-3.IP1	Ovarialkarzinom	RPMI1640	/	Prof. Curiel, USA
Ov-4	Ovarialkarzinom	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	/	Prof. Curiel, USA
HepG2	Leberkarzinom	RPMI1640	/	Prof. Curiel, USA
293A	Nierenkarzinom	MEM	/	Qbiogene, Heidelberg
A559	Lungenkarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	/	Prof. Curiel, USA
FHS173WE	Fibroblasten	DMEM (1 g/l Glukose)	/	Prof. Curiel, USA
HFBC	Fibroblasten	DMEM (1 g/l Glukose)	/	Prof. Curiel, USA
MCF-12A	Mamma-Gewebe	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	Cholera-Toxin(100 ng/ml), EGF (20 ng/ml), Insulin (0,01 mg/ml) Hydrocortison (500 ng/ml)	ATCC (CRL-10782)

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert. Das Zellkulturmaterial wurde von den Firmen Greiner (Frickenhäusen), Gibco (Karlsruhe) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bis zu subkonfluentem Wachstum kultiviert, zweimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel mittels steriler Einmalpipetten. Allen Medien wurde L-Glutamin (2mM) sowie das Antibiotikum Gentamicin (50 µg/ml) zugesetzt. Für die Kultur der Normalgewebszelllinie MCF-12A wurde Pferdeserum (HS) verwendet. Kulturmedien enthielten 10% (v/v), Wachstumsmedien 5% (v/v) und Infektionsmedien 2% (v/v) fötales Kälberserum.

2.2.3 Isolierung und Kultur primärer humaner Zellen aus Patientenmaterial

Primäre Keratinozyten wurden mit freundlicher Unterstützung von der Universitätsklinik Düsseldorf bezogen und in Keratinocyte-SFM-Medium (GIBCO) angezogen.

2.2.3.1 Isolierung humaner Mammaepithelzellen (HMEC) und Fibroblasten

Nach der operativen Entnahme wurde die Gewebeprobe in ein steriles Plastikgefäß (Falcon) überführt und in Lagermedium (s. Tabelle 3) bei 4°C für max. 48h aufbewahrt. Nach der Bestimmung des Gewichts wurde die Gewebeprobe in kleine Stücke von 1mm³ zerteilt und in ein steriles Plastikröhrchen mit steriler Kollagenase-Lösung (s. Tabelle 3) überführt. Für das erste Gramm Gewebe wurden 20ml, für jedes weitere Gramm weitere 10ml Kollagenase-Lösung zugegeben. Die Gewebeprobe wurde über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln (65rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe durch kräftiges auf- und abpipettieren (20mal) mit einer sterilen 10ml Pipette resuspendiert, bevor die Zellen bei 1000rpm für 5min sedimentiert wurden. Dann wurden die Zellen in 10ml Waschmedium (s. Tabelle 3) resuspendiert, in ein 15ml Plastikröhrchen überführt und wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Trennung epithelialen Zellaggregate von Stromazellen erfolgte mittels Siebseparation, indem die Zellsuspension über ein steriles Metallsieb (Porengröße 100µm, Sigma) gegeben wurde. Dabei wurde die Porengröße des Siebes so gewählt, dass es für Fibroblasten durchgängig war, die in einem separaten sterilen 15ml Plastikgefäß gesammelt wurden. Hingegen war das Sieb für epitheliale Zellaggregate nicht durchlässig. Nach der Inversion des Siebes wurden die epithelialen Zellaggregate durch Aufpipettieren des Waschmediums aus dem Sieb gewaschen und in einem sterilen 15ml

Plastikröhrchen aufgefangen. Nach dem finalen Zentrifugationsschritt wurden epitheliale Zellaggregate und primäre Fibroblasten jeweils in 1ml IHEC-Medium bzw. Fibroblasten-Medium (s. Tabelle 3) resuspendiert und die Gesamtzellzahl sowie die Zellvitalität bestimmt. Die Kultur primärer Fibroblasten erfolgte in Fibroblasten-Medium. Nach Aussaat der epithelialen Zellaggregate in IHEC-Medium wurde die Kultur innerhalb von 8-10 Tagen von humanen mammären epithelialen Zellen (HMEC) dominiert, die eine für Epithelzellen charakteristische Kopfsteinpflaster-ähnliche Morphologie aufwiesen. IH-Medium repräsentiert ein tumorselektives Medium, das das extensive Wachstum normaler Zellen nicht fördert und das Wachstum von Tumorzellen begünstigt. IHEC-Medium entspricht in seiner Zusammensetzung IH-Medium, wurde jedoch durch den Zusatz von EGF und Choleratoxin für die Kultur normaler Epithelzellen optimiert. HMECs wurden durch partielle Trypsinierungen der epithelialen Primärkultur isoliert (Stampfer, 2004) und sofort in Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt. Mittels Immunohistochemie wurde der mesenchymale bzw. epitheliale Ursprung der Fibroblasten bzw. HMECs verifiziert (s. 2.12.5).

Tabelle 3: Medien und Lösungen für die Gewinnung und Kultur von primären HMEC, Fibroblasten und Tumorzellen. Alle Medien und Lösungen enthielten die Antibiotika Gentamicin (5µg/ml) und Penicillin/Streptomycin (1% v/v).

	Medium-Basis	Zusätze	Konzentration	Referenz
Kollagenase-Lösung	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	Kollagenase	200U/ml	(Stampfer, 2004)
		Hyaluronidase	100U/ml	(Ethier et al., 1993)
		Insulin	5µg/ml	
		FCS	5% v/v	
Lagermedium	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	FCS	5% v/v	(Stampfer, 2004)
		Insulin	5µg/ml	
Waschmedium	DMEM (1g/l Glukose)	/	/	(Ethier et al., 1993)
IH-Medium (Tumorzellen)	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	FCS	5% v/v	(Ethier et al., 1993)
		Insulin	5µg/ml	
		Hydrocortison	1µg/ml	
IHEC-Medium (HMEC)	DMEM/NutMix-F12 (1:1)	s. IH-Medium		(Stampfer, 2004)
		EGF	10ng/ml	
		Choleratoxin	100ng/ml	
Fibroblasten-Medium	DMEM (1g/l Glukose)	FCS	10% v/v	(Stampfer, 2004)

2.2.4 Isolation von Tumorzellen aus Aszites und Pleuraerguss

Aszitesflüssigkeit oder Pleuraerguss wurden in sterile 50ml Plastikröhrchen überführt und für 10min bei 2200rpm zentrifugiert. Die Zellpellets von etwa 1l Aszites- oder Pleuraflüssigkeit wurden vereint und in 20ml Waschmedium resuspendiert. Darauf wurden die Zellen bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Rote Blutzellen wurden über einen Ficoll-Dichtegradienten von der Zellsuspension abgetrennt. Dazu wurden in einem 50ml Plastikröhrchen 20ml Ficoll (1,077g/ml, Sigma-Aldrich) mit 10ml Einzelzellsuspension überschichtet und bei 400g für 30min bei RT zentrifugiert. Mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette wurden die Zellen der Grenzschicht (Tumorzellen) zwischen Ficoll und Medium vorsichtig abgenommen und in ein steriles 15ml Plastikröhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit Waschmedium gewaschen, bevor Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl bestimmt wurden. Der Lebendzellanteil lag durchschnittlich bei 80%. Isolierte Tumorzellen wurden sofort in Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt. Die Kultur der Tumorzellen erfolgte in dem tumorselektiven IH-Medium (s. Tabelle 3).

2.2.5 Subkultivierung

Zur Passagierung subkonfluenten Kulturen wurden adhärend wachsende Zellen mit PBS gewaschen und nach Inkubation mit 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung für 5min bei 37°C geerntet. Durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) wurden die Zellen sedimentiert, vereinzelt und dann ihrem Wachstum entsprechend anteilig neu ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer in Doppelbestimmung, die Zellvitalität wurde mittels der Trypanblau-Ausschlussmethode ermittelt.

2.2.6 Kryokonservierung

Die sedimentierten Zellen wurden in Gefriermedium (Kulturmedium mit 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert, in sterile 2ml Kryoröhrchen überführt und sukzessive (über -20°C und -80°C) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.7 Induktion der MDR1-Genexpression

Um eine Resistenz der Zellkulturen gegenüber Anthrazyklinen zu induzieren, wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums Doxorubicin inkubiert. Initial wurden 10 ng/ml Doxorubicin zugesetzt, bevor die Doxorubicin-Konzentration alle sieben Tage um 5ng/ml erhöht wurde. Ab einer Konzentration von 100ng/ml wurde die Konzentration in Stufen von 10ng/ml erhöht.

2.3 RNA-/DNA-Analytik

2.3.1 RNA-Isolation aus Zellkulturen

Um die Degradation von Ribonukleinsäuren (RNA) durch RNAsen zu verhindern, wurden alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Hierzu wurde DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt, den Lösungen im Verhältnis 1:100 zugesetzt und die Lösungen autoklaviert, nachdem sie über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

Für die Isolierung von Total-RNA wurde TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe) verwendet. Trypsinierte und PBS-gewaschene Zellpellets wurden in 1ml Trizol resuspendiert und 5min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Proben ca. 15sek geschüttelt und nach weiteren 2-3min Inkubation bei RT für 15min bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach 10min Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10min, 4°C, 12000rpm) pelletiert, mit 1ml 75% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut für 5min bei 9500rpm und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das RNA-Pellet bei 55°C für 5-10min getrocknet und in 20 bis 100µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch.

2.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese beschreibt die Translation von Gesamt-RNA in cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (OmniScript RT-Kit, QIAGEN). Die Verwendung unspezifischer Random-Primer (Hexaoligonukleotide) sollte die Erfassung der gesamten RNA-Population ermöglichen. So wurde durch die cDNA-Synthese einer einzigen RNA-Probe die Analyse mutipler Transkripte ermöglicht, die später Voraussetzung für die Transkriptquantifizierung war.

Pro Probenansatz wurde je 1µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 12,5µl aufgefüllt, für 5min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 12,5µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben, so dass im Endvolumen von 25µl folgende Endkonzentrationen erreicht wurden: 50mM KCl, 10mM Tris/HCl, 7.5mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA, 15mM DTT, je 1mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000pmol Random-Primer und 9.5 U (0,5 µl) Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wurde der Reaktionsansatz 60min bei 37°C und 5min bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis werden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

2.3.3 DNA-Isolation aus Geweben und Zelllinien

Das bei -80°C gelagerte Tumor- bzw. Normal-Gewebe wurde auf Trockeneis gelegt und mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde im flüssigen Stickstoff erneut schockgefroren und in einer im flüssigen Stickstoff tiefgekühlter Teflonkapsel mit Wolframkugel mechanisch im Mikrodismembrator für 1min bei 2000rpm pulverisiert.

Pulverisiertes Gewebe wurde in 3-4ml, Zellpellets wurden in $0,1\text{ml}/1 \times 10^7$ Zellen DNA-Verdaupuffer (100mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 8, 25mM EDTA pH8, 0.5% SDS) aufgenommen und nach Zugabe von Proteinase K (0,1 mg/ml Verdaupuffer) über Nacht bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Für die Extraktion genomischer DNA (Deoxyribonukleinsäure) wurden die Proben mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1) versetzt und nach kräftigem Schütteln zur Phasentrennung für 10min bei 2000rpm zentrifugiert. Der DNA-haltige wässrige Überstand wurde abgenommen und zur vollständiger Entfernung des Phenols mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt, geschüttelt und nochmals zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 Volumen Ammoniumacetat sowie 2,5 Volumen eiskalten Ethanol absolut bei -20°C ÜN. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15min, 2000rpm) sedimentiert, mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Abhängigkeit der Pellet-Größe in 50-200µl sterilem Aqua dest. gelöst. Die Konzentrations-Bestimmung erfolgte photometrisch.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR findet einen vielfältigen Einsatz bei der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Alle PCR-Reaktionen wurden standardmäßig in 50µl Ansätzen durchgeführt und enthielten folgende Zusätze: 50ng template (DNA, cDNA), 1x PCR-Reaktionspuffer, dNTPs (je $125\mu\text{M}$), 5'- und 3'- Primer (je 50pmol) sowie 2,5U Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Für die quantitative Bestimmung der PCR-Produktmenge (s. 2.3.6 und 2.3.7) wurde je ein Cy5-markierter Primer in die PCR eingesetzt. Um unspezifische Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde die DNA-Polymerase während der 10min Vorlaufphase (94°C) zugegeben ("Hot Start"-PCR). Die PCR-Reaktionen wurden mit einem "final extension"-Zyklus (8 Minuten bei 72°C) beendet, um einen vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen. Primerkombinationen und optimierte PCR-Bedingungen (Zyklenzahl, Annealing-Temperatur) sind

Tabelle 5 zu entnehmen. Die Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte in Hybaid Omnigene PCR-Cyclern. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die PCR-Ansätze mit Mineralöl überschichtet.

2.3.4.1 Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese

Umgeschriebene cDNA wurde mittels β -Actin-PCR (s. Tabelle 4) hinsichtlich Qualität und potentieller Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Die Primer wurden so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen ein größeres 652bp-Produkt im Gegensatz zu dem kleineren cDNA-Produkt (446 bp) ergab.

Tabelle 4: β -Actin-PCR-Reaktionsansatz mit PCR-Bedingungen

PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen (μ l)	Reaktionsbedingungen
H ₂ O	32,5	94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 1 min Zyklenzahl: 35
10x Puffer	5	
5' β -Aktin	2,0 (25 pmol)	
3' β -Aktin	2,0 (25 pmol)	
dNTP	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

2.3.5 Amplifikation der Promotoren

Für die Klonierung von CRAd-Vektoren wurden die Promotoren des humanen α -Lactalbumin-Gens (ALA) und Multiple Drug Resistance Gene 1 (MDR) mittels PCR derart amplifiziert, dass über die verwendeten Primer artifizielle Erkennungssequenzen für NotI- (5'Primer) bzw. XhoI-Restriktionsendonukleasen (3'Primer) eingefügt werden. So konnten die PCR-Produkte sofort für weiterführende adenovirale Klonierungen eingesetzt werden, die PCR-Bedingungen sind

Tabelle 5 zu entnehmen.

Der ALA-Promotor wurde aus genomischer Blut-DNA mittels PCR unter Verwendung des 5'ALA-NotI- und 3'ALA-XhoI-Primers amplifiziert.

Die Originalsequenz des MDR-Promotors wurde uns freundlicherweise von Prof. Walther, Berlin, zur Verfügung gestellt. Der MDR-Promotor wurde in pGL3-Basic (Promega) kloniert und der resultierende Vektor pGL3-MDR als Matrize mit der Primerkombination 5'MDR-NotI/3'MDR-XhoI in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen

Amplifizierte Region	Primerpaar	PCR-Bedingungen	Zyklen	Produktgröße
β-Aktin	5' β-Aktin	94°C 1 min	35 Zyklen	446 bp (cDNA)
	3' β-Aktin	60°C 1 min		652 bp (gen. DNA)
		72°C 1 min		
GAPDH	5' GAPDH-Cy5	94°C 1min	27 Zyklen	195 bp
	3' GAPDH	60°C 1min		
		72°C 1min		
MDR1-Gen	5' MDR-Cy5	94°C 1min	25 Zyklen	177 bp
	3' MDR	60°C 1min		
		72°C 1min		
MDR-Promotor (Luziferase)	5' MDR-Prom	94°C 1min	30 Zyklen	365 bp
	3' MDR-Prom	45°C 1min		
		72°C 2min		
MDR-Promotor (CRAd)	5' MDR-Prom-NotI	94°C 1min	30 Zyklen	475 bp
	3' MDR-Prom-XhoI	60°C 1min		
		72°C 2min		
ALA-Promotor (Luziferase)	5' ALA-Prom	94°C 1min	30 Zyklen	771 bp
	3' ALA-Prom	54°C 40sek		
		72°C 1min		
ALA-Promotor (CRAd)	5' ALA-Prom-NotI	94°C 1min	35 Zyklen	761 bp
	3' ALA-Prom-XhoI	54°C 40sek		
		72°C 1min		
E1-Region	5' SeqITR	95°C 1min	35 Zyklen	variabel
	3' Ad1124-1100	55°C 1min		Ad5 = 847bp
		72°C 1,5min		

Amplifizierte Region	Primerpaar	PCR-Bedingungen	Zyklen	Produktgröße
Ad3 Fiber-knob	5' Ad3knob 3' SeqMfiber3'	95°C 1min 55°C 1min 72°C 1,5min	30 Zyklen	Ad3 = 489 bp
E1AΔ24-Deletion	5' D24-L1 3' D24-R1	95°C 1min 55°C 1min 72°C 1min	35 Zyklen	
E3-Region	5' E3-L1 3' E3-R1	95°C 1min 58°C 1min 72°C 1,5min	30 Zyklen	3 kb
MDR-Amplifikation	5' MDR-Expr-Cy5 3' MDR-Intron	95°C 30sek 60°C 30sek 72°C 1min	29 Zyklen	166bp
GAPDH-Amplifikation	5' GAPDH-F 3' GAPDH-R-Cy5	95°C 30sek 60°C 30sek 72°C 1min	29 Zyklen	188bp

2.3.6 Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der MDR1-mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des MDR1-Gens wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines Referenzgenes („single copy“ Gen) in einem PCR Ansatz („multi plex“-PCR). Als Referenzgen wird meist ein ubiquitär stabil exprimiertes „house keeping gene“ verwendet, das als interner Standard der PCR-Reaktion dient und den Vergleich der Genexpression unterschiedlicher Proben erlaubt. Als Referenzgen wurde GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Bei der quantitativen RT-PCR müssen die Bedingungen so gewählt sein, dass die Reaktionskinetik allein von der eingesetzten cDNA-Menge limitiert wurde und keine Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Primern, Nukleotiden und Taq-Polymerase entstand. Die Detektion der PCR Produkte sowie die quantitative Bestimmung der PCR-

Produktmengen erfolgte mit Hilfe des A.L.F. (Automated Laser Fluorescence)-DNA-Sequenzierautomaten und der Fragment Manager Software wie unter 2.4.1. beschrieben.

Tabelle 6: Quantitative RT-PCR zur Analyse der MDR-Genexpression. Reaktionsansatz und Bedingungen. Die 5'GAPDH-Primer werden sowohl CY5-markiert/unmarkiert im Verhältnis 1:10 eingesetzt.

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H ₂ O	24,5	94°C à 1 min 60°C à 1 min 72°C à 1 min Zyklenanzahl: 25
cDNA	5 (1µg)	
10x Puffer	5	
5'Primer GAPDH	2,0 (20 pmol)	
3'Primer GAPDH	2,0 (20 pmol)	
5'Primer MDR	4,0 (40 pmol)	
3'Primer MDR	4,0 (40 pmol)	
dNTP	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

2.3.7 Quantitative PCR zur Bestimmung der MDR1-Genamplifikation

Die Amplifikation des MDR1-Genlokus wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Koamplifikation der genomischen Regionen des MDR1-Gens und des GAPDH-Referenzgens in einem PCR-Ansatz durchgeführt(s. 2.3.6). Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass der 5'Primer jeweils im Exonbereich des korrespondierenden Gens lokalisiert war, während die 3'Primer in eine Intronregion gelegt wurden. Die Quantifizierung der PCR-Produktmengen erfolgte mittels des A.L.F.-Sequenziergerätes und der Fragment-Manager-Software. Die Analyse der MDR1-Genamplifikation wurde an Zelllinien sowie an Normal- und Tumorgewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom durchgeführt. Für die Analyse der MDR1-Amplifikation in Tumoren wurde die MDR1-Genamplifikation in Tumoren [T(MDR1/GAPDH)] auf den Mittelwert der MDR1-Genamplifikation der Normalgewebe [N(MDR1/GAPDH)] bezogen.

Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Analyse der MDR1-Genamplifikation

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H ₂ O	11,5	94°C à 30sek 60°C à 30sek 72°C à 1 min Zyklenanzahl: 27
Genomische DNA	5 (100ng)	
10x Puffer	5	
5' MDR-Expr-Cy5	5,0 (50 pmol)	
3' MDR-Intron	5,0 (50 pmol)	
5' GAPDH-F	5,0 (50 pmol)	
3' GAPDH-R-Cy5	5,0 (50 pmol)	
dNTP	4,0 (10 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

2.3.8 PCR-Kontrolle der adenoviralen Konstrukte

Zur Überprüfung der korrekten Insertion von Promotoren und Genen in pShuttle-, Luziferase-Expressions- und CRAd-Vektoren wurden die Klone mittels PCR analysiert (s.

Tabelle 5). Luziferase-Expressionsvektoren wurden unter Einsatz des Promotor-spezifischen 5'-Primers (5'ALA-Prom, 5'MDR-Prom) und des 3'-Luziferase-Primers auf die korrekte Insertion des Promotors analysiert. Die Konstrukte der CRAd-Konstruktion konnten mit nur einem Primerpaar hinsichtlich der Promotorinsertion amplifiziert werden. Der 5'SeqITR-Primer wurde so gewählt, dass er "upstream" des Promotorbereichs innerhalb des 5'LITR lokalisiert war. Der korrespondierende 3'Ad1124-1100-Primer setzte innerhalb des E1A-Genes an. Die 24bp-Deletion des E1A-Gens wurde durch die Primerkombination 5'D24-L1 und 3'D24-R1 amplifiziert. Das Vorliegen der E3-Region wurde mittels der Primer 5'E3-L1 und 3'E3-R1 analysiert. Die Spezifität der adenoviralen Fiber-knob Domäne konnte mittels der Primerkombination 5'Ad5knob/3'Seq-Mfe-fiber-3'dem Serotyp5, mittels der Primerkombination 5'Ad3knob/3'Seq-Mfe-fiber-3'dem Serotyp3 zugeordnet werden.

2.3.9 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration in Lösung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260nm/280nm wurde zur Kontrolle des Reinheitsgrades bestimmt. Die Nukleinsäure-Konzentration errechnet sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt: $c = E \times 1/\epsilon \times 1/d$

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

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

2.3.10 Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung wurden Inserts und resultierende Vektoren sequenziert. Die Sequenzierung wurde in der Sequenziereinheit des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.4 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten

2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe von Sequenzierautomaten (A.L.F. und A.L.F.express, Pharmacia) ist die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente von bis zu 1000bp sowie die Quantifizierung geringer Probemengen möglich. Die eingesetzten Polyacrylamid (PA)-Gele von 29% besitzen einen optimalen Trennbereich für DNA-Fragmente zwischen 60 und 400bp. Während der Elektrophorese durchlaufen Cy5-markierte PCR-Fragmente im unteren Teil des Gels einen vertikalen Laserstrahl (Helium-Neon-Laser, 632,8nm) und werden zur Fluoreszenz angeregt. Die emittierte Strahlung wird von Photodioden detektiert, die senkrecht zum Laserstrahl stehen, und von der Software (Fragment-Manager) erfasst und gespeichert. Vorgelagerte optische Filter minimieren Hintergrundstrahlung und Streulicht. Nach Beendigung des Laufs wurden die Rohdaten mit Hilfe der Software (Fragment-Manager) ausgewertet.

Für ein 29%-ige PA-Gellösung wurden 25,2g Urea und 9ml Monomerenlösung in 25,5ml Aqua dest. gelöst und mit 5g Amberlite für 10min gerührt. 6ml 6x TBE und die Lösung wurden filtriert, vereint und entgast. Dann wurden 40µl TEMED und 200µl 10%-iges APS zugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen. Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum mind. 2h.

Für die Fragmentanalysen wurden die PCR-Produkte mit Aqua dest. 1:2 bis 1:20 verdünnt. 6,5 µl der Verdünnung wurden mit 6,5 µl A.L.F.-Probenauftragspuffer versetzt, für 5min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 8: Bedingungen für A.L.F.-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Laufbedingung	Fragmentanalyse
Spannung	1500 Volt
Strom	34 mA
Leistung	38 Watt
Temperatur	40°C
Laufpuffer	0,6 x TBE

2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5 bis 3%-ige Agarosegelen (w/v in 1x TBE-Puffer). Je 5-20 µl der Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit SB-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Längenstandard wurde die 1kb DNA-Leiter (Gibco BRL) oder die SmartLadder (Eurogentec) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 80 bis 110 Volt für 45 bis 180 Minuten. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (EtBr, 10 µg/ml) für mindestens 30min gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=312$ nm) wurde die Fluoreszenz des interkalierten EtBr angeregt und die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Bakterienstämme

Folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme wurden verwendet:

DH5 α F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_k^- , m_k^+) phoA, supE44, λ thi-1, gyrA96, relA1
 BJ5183 (QBiogene) endA, sbcBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR (Str^I)

2.5.2 Medien und Aufzucht von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden in Luria Bertani (LB)-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl) bei 37°C angezogen. Zur Selektion transformierter *E. coli*-Kulturen wurde Selektionsmedium verwendet, dem nach dem Autoklavieren 50 µg/µl Ampicillin bzw. Kanamycin zugesetzt wurden. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar.

Transformierte *E. coli* Zellen wurden nach Elektroporationen für 1h in SOC Medium (0,5%

Hefeextrakt, 2% Trypton, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20mM Glukose) angezogen.

2.5.3 Plasmide

Das Plasmid pGEM-T Easy (Promega) ermöglicht die einfache Klonierung von PCR-Produkten in einen herkömmlichen Klonierungsvektor. pGEM-T Easy basiert auf der template-unabhängigen Addition eines singulären Deoxyadenosins an das 3'Ende des PCR-Produktes durch thermostabile DNA-Polymerasen. An beide Enden des EcoRV-linearisierten pGEM-T Easy-Vektor wurde ein singuläres 3'Thymidin addiert, so dass PCR-Produkte effizient über kohäsive Enden in pGEM-T Easy ligiert werden können.

Das Plasmid pGL3-Basic (Promega) wird für die Untersuchung regulatorischer cis-Elemente wie Promotoren, Enhancer in Säugerzellen verwendet. pGL3-Basic kodiert für das Luziferase-Reportergen (aus *Photinus pyralis*), das zur Kontrolle für die Transkriptionsaktivität transformierter eukaryontischer Zellen eingesetzt wird. Für die Selektion transformierter *E. coli*-Zellen besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

Zur Klonierung rekombinanter nicht-replikativer Adenoviren wurde das AdEasyTM-System (Qbiogene, Heidelberg; (AdEasy Vector System Application Manual, 2002)) verwendet, das ein pShuttle-Plasmid (Kanamycin-Resistenz) sowie das adenovirale Plasmid pAdEasy (Ampicillin-Resistenz) enthält. Für die Klonierung von replikations-kompetenten CRAd-Vektoren wurden uns freundlicherweise die pShuttle-Plasmide pSE1 und pSE1Δ24 (Kanamycin-Resistenz) von Dr. Dirk Nettelbeck (Universität Erlangen) sowie das adenovirale Plasmid pVK500F5/3 (Ampicillin-Resistenz) von Prof. David Curiel (University of Alabama, USA) zur Verfügung gestellt.

2.5.4 Adenoviren

Der adenovirale Luziferase-Expressions-Vektor Ad5/3CMVLuc sowie das Adenovirus Serotyp 5 (Ad5Wt) und die replikativen CRAd-Vektoren Ad5Δ24 und Ad5Δ24RGD wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. D. Curiel, University of Alabama at Birmingham, USA, bezogen. Der CRAd-Vektor Ad5/3Δ24 wurden uns freundlicherweise von Dr. A. Kanerva, University of Helsinki, Finland, zur Verfügung gestellt.

2.6 Klonierung

2.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Relevante DNA-Banden wurden unter UV-Licht nach EtBr-Färbung aus Agarosegelen ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eluiert. Die DNA-Elution erfolgte wurde mit 30-50µl sterilem Aqua dest. (pH 7,5).

2.6.2 Restriktionen

Alle Restriktionen wurden nach Herstellerangabe der relevanten Restriktionsenzyme unter Verwendung der mitgelieferten Reaktions-Puffer durchgeführt. Zwischen 0,5 und 6µg an template-DNA sowie 1-10U Restriktionsendonuklease wurden eingesetzt. Die Restriktionen wurden in 20-100µl Ansätzen durchgeführt und für 3h oder ÜN bei 37°C (bzw. 55°C für BstXI) inkubiert.

2.6.3 Ligationen

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in 20µl Gesamtvolumen. Ein 4:1 Verhältnis der molaren Menge von Insertionsfragment zu Vektor-DNA, das nach u.g. Formel errechnet wurde, zeigte die höchste Effizienz und wurde standardmäßig eingesetzt. Die Vektor- und Insert-DNA wurde nach der Zugabe von Aqua dest. für 5min bei 65°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen der DNA aufzulösen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10x Ligationspuffer erfolgte die Ligation in Gegenwart von 1U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) ÜN bei 15°C. Zur Inaktivierung der Ligase-Aktivität wurde der Reaktionsansatz abschließend für 10min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{Insert} - \text{Vektor} - \text{Verhältnis} \times \left[\frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \right]$$

2.6.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5α Zellen wurde zunächst eine 10ml Vorkultur, die mit einer einzelnen Kolonie angeimpft wurde, ÜN bei 37°C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 500ml LB-Medium angeimpft und die Kultur für 1,5 bis 3h bei 37°C und 180rpm inkubiert. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ verfolgt. Für die folgenden Schritte wurden ausschließlich vorgekühlte Materialien und Lösungen verwendet. Sobald die

Kultur eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 bis 0,7 erreichte, wurden die Zellen in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 10min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 4000 g für 15min pelletiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit sterilem Aqua dest. (500 ml und 250 ml) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 10ml 10%-igem Glycerin und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, in 40µl Aliquots in Eppendorf Cups angefüllt und bei -80°C gelagert. Die Elektrokompentenz wurde durch die Elektroporation mit einem Referenzplasmid und nachfolgenden Verdünnungsausstrichen auf Selektionsplatten bestimmt. Die Titer sollten über 10^8 Kolonien pro µg DNA liegen.

2.6.5 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 2µl Vektor-DNA (Ligationen, Plasmide) bzw. bei homologen Rekombinationen mit 500ng pShuttle (max. 8µl) und 100ng adenoviralem Plasmid (1µl) gemischt. Das Gemisch wurde in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand = 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser (BioRad, München) durch einen exponentiell abfallenden Spannungsimpuls bei 2,5kV, 25µF und 200Ω. Nach dem Puls werden die Zellen in 1ml SOC-Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefaess überführt und für 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.6 Plasmidisolation

Plasmidpräparationen aus 2ml Übernacktkulturen wurden mittels des GFX™ Micro Plasmid Prep Sample Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Bei hoher Koloniezahl wurde die Plasmid-DNA nach der Methode der Alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurden Bakterien aus 3ml der ÜN-Kulturen durch Zentrifugation für 3min bei 10000rpm pelletiert und in 100µl Lösung 1 (50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte nach Zugabe von 200µl Lösung 2 (0,2N NaOH, 1%SDS) über 5min bei RT. Nach Zugabe von 150µl Lösung 3 (29,5g KAc in 50ml H₂O lösen, pH 5,5 mit Eisessig einstellen und die Lösung mit H₂O auf 100ml auffüllen) wurde der Ansatz bis zur sichtbaren Präzipitation der Proteine gemischt, für 10min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15min, 10000rpm, RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, die DNA Fällung erfolgte nach Zugabe von absolutem Ethanol für 10min bei -20°C. Nach Zentrifugation (10min, 10000rpm, RT) wurde die gefällte Plasmid-DNA mit 70% Ethanol

gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 30 – 40µl TE-Puffer (100 × TE: 1 M Tris pH 8,0; 0,1 M EDTA) aufgenommen.

Für die Aufreinigung qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA aus 100 bis 250ml Übernachtskulturen wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparationen erfolgten nach Herstellerangaben.

2.6.7 Phenolextraktion von DNA-Lösungen

Während der Klonierungsschritte zur Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde die DNA stets mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Fällung (PCI im Verhältnis 25:24:1) aufgereinigt. Hierzu wurde die DNA-haltige Ausgangslösung mit einem Volumen PCI (25:24:1) versetzt, gemischt und zur Phasentrennung für 15 sec bei 14000rpm zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 3M NaAcetat-Lösung und 2,5-3 Volumen Ethanol (-20°C) erfolgte die DNA-Fällung bei -80°C (> 30 min). Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (4°C, 14000rpm, 5 min) pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und nach Trocknung in sterilem Aqua dest. (pH 7,5) resuspendiert.

2.6.8 Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden

Um bei Klonierungsarbeiten die Religation der Klonierungsvektoren zu verhindern, wurden linearisierte Basisvektoren mit alkaline phosphatase, calf intestine (CIP, New England Biolabs) behandelt. Das CIP-Enzym katalysiert die Hydrolyse freier 5'Phosphatgruppen von DNA, RNA und Deoxyribonukleosid-Triphosphaten. So fehlen CIP-behandelten Fragmenten freie 5'Phosphatenden, die von Ligasen für eine Religation benötigt werden, wodurch eine Reduktion des Vektorhintergrundes erzielt werden kann. So wurden Restriktionsansätze für die Dephosphorylierung mit 0,5U CIP pro µg Vektor-DNA für 60min bei 37°C inkubiert. CIP-behandelte DNA wurde anschließend über eine phenolische Extraktion oder mittels Gelpurifikation aufgereinigt.

2.7 Herstellung rekombinanter Adenoviren

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren umfasst typischerweise zwei Schritte. Zunächst erfolgte die Insertion heterologer DNA-Sequenzen in einen Shuttle-Vektor (pShuttle), bevor dann in einem zweiten Schritt die heterologe DNA-Sequenz über homologe Rekombination in ein adenovirales Plasmid (pAd) integriert wird (s. Abb. 1). Aufgrund der Größe des pAd von etwa 36kb sowie der Präsenz multipler Erkennungssequenzen für nahezu allen bekannten

Restriktionsendonukleasen repräsentiert die homologe Rekombination die effizienteste Methode, um rekombinante Ad Genome zu generieren.

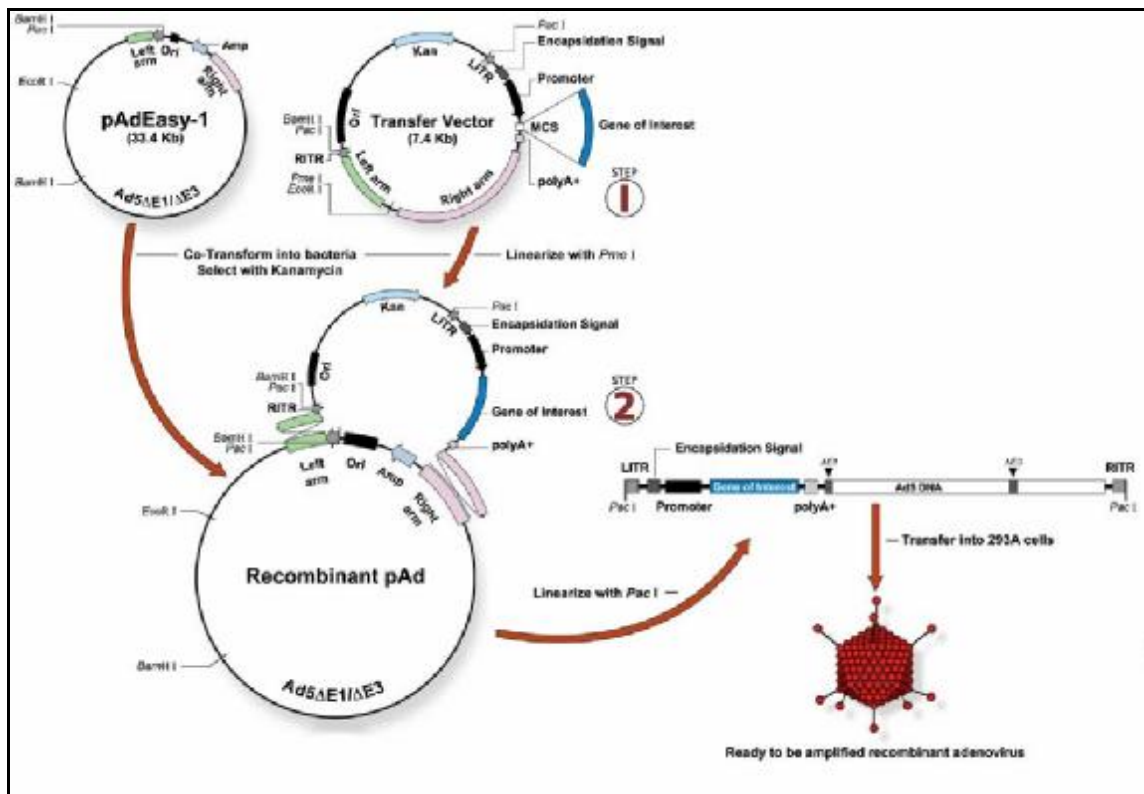


Abb. 1 Herstellung rekombanter Adenoviren mittels homologer Rekombination in *E. coli* (aus AdEasy Vector System Application Manual, 2002)

2.7.1 Klonierung adenoviraler Luziferase-Expressionsvektoren

2.7.1.1 Klonierung von pShuttle-Vektoren mit Luziferase-Expressionskassette

Um die Spezifität der Kandidaten-Promotoren mit Hilfe der Luziferase-Reportergen-Aktivität in Säugerzellen zu analysieren, wurden die Luziferase-Expressionskassette (Luc) sowie eine Promotorsequenz (ALA, MDR, CMV) in den pShuttle-Vektor (AdEasy, QBiogene) eingefügt. Die Genkassette ALA:Luc wurde aus pGL3-ALA mit Hilfe der NotI und SalI Restriktionsendonukleasen in pShuttle inseriert. Die Insertion des MDR-Promotors in pShuttle erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die Luc-Kassette aus pGL3-Basic über NotI und SalI in pShuttle inseriert, bevor der MDR-Promotor aus pGL3-MDR (mit freundlicher Genehmigung von Dr. W. Walter, MDC, Berlin) im zweiten Schritt über NheI und HindIII inseriert wurde. Für die Herstellung des CMV-Referenzvirus wurde der pShuttle-CMV-Vektor (AdEasy, QBiogene) genutzt und die Luc-Kassette aus pGL3 über HindIII und XbaI inseriert. Mittels Elektroporation wurde die resultierenden pShuttle-Promotor-Luc Vektoren in *E. coli* DH5α transformiert, die

Plasmide aus den resultierenden Klonen isoliert und mittels Restriktionsanalyse und PCR-Kontrolle auf das korrekte Vorliegen der Promotor-Luc-Kassette analysiert. Von je einem korrekten Klon der pShuttle-ALA-Luc, pShuttle-MDR-Luc und pShuttle-CMV-Luc wurde eine qualitativ hochwertige Plasmid-Isolation vorgenommen.

2.7.1.2 Klonierung rekombinanter adenoviraler Luziferase-Expressionsvektoren

Zur Vorbereitung auf die homologe Rekombination wurden die pShuttle-Vektoren mit PmeI linearisiert, dephosphoryliert und über ein 0,5%-iges Agarose-Gel aufgereinigt.

Um die Effizienz der homologen Rekombination zu optimieren, wurde das Zwei-Schritt-Transformationsprotokoll nach Stec et al angewandt. Dabei werden das adenovirale Plasmid und der Shuttle-Vektor nacheinander in zwei Elektroporationsschritten in den Rekombinationskompetenten *E. coli*-Stamm BJ5183 transfiziert (Stec et al., 2001). Die Präselektion des adenoviralen Plasmids, das als autonomes Replikon in *E. coli* existierte, soll die Produktivität der homologen Rekombination erhöhen, indem defekte nicht-replikative Ad Plasmide von vorne herein eliminiert werden.

Nach Transformation des pAdEasy-Plasmids, das für ein $\Delta E1\Delta E3$ -deletiertes Ad Genom kodiert, wurden die resultierenden BJ5183-AdEasy-Klone bei 30°C ÜN auf die Ampicillin-Resistenz des AdEasy-Plasmids selektioniert. Ausgehend von einem korrekten Klon wurden elektrokompente BJ5183+pAdEasy Zellen hergestellt, in die nun im zweiten Schritt 200ng des PmeI-linearisierten pShuttle-Plasmids elektroporiert wurde. Der Austausch homologer DNA-Sequenzen (homologe Rekombination) erfolgte für mind. 24h bei 30°C. Als homologe Bereiche dienen sequenzidentische Regionen des linken und rechten Arms bzw. rechter Arm und Replikationsursprung (ori) der Plasmide. Resultierende Ad Klone wurden auf Kanamycin-Resistenz selektioniert, die nach erfolgter homologer Rekombination aus dem pShuttle-Plasmid in das Ad Genom integriert wurde. Positive rekombinante Ad Klone wurden nach Isolation der plasmidalen DNA mittels Restriktionsanalyse detektiert. Um qualitativ hochwertige pAd-DNA zu gewinnen, wurde eine Plasmidpräparation mit dem EndoFree-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.7.2 Klonierung konditional replikativer Adenoviren (CRAds)

2.7.2.1 Klonierung der Promotoren in pSE1 und pSE1D24

Die MDR-Promotorsequenz (-207 bis +158bp) wurde mittels der Primer 5'MDR-Prom-NotI / 3'MDR-Prom-XhoI unter Anhängen artifizierlicher Erkennungssequenzen für

Restriktionsendonukleasen amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt in den Vektor pGEM-T Easy ligiert. Das MDR-Promotorfragment wurde ungerichtet über NotI-Schnittstellen in die NotI-linearisierten und dephosphorylierten pSE1 und pSE1Δ24 kloniert. Die resultierenden Vektoren wurden mit pSMDRE1 bzw. pSMDRE1Δ24 benannt.

Das proximale ALA-Promotorfragment (-737 bis +14bp, (Anderson et al., 1999) wurde mittels der Primerkombination 5'ALA-Prom-NotI / 3'ALA-Prom-XhoI unter Anhängen artifizieller Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt in pGEM-T Easy ligiert. Das ALA-Promotorfragment wurde gerichtet über NotI/XhoI in den linearisierten und CIP-behandelten Vektor pSE1Δ24 ligiert, so dass pSALAE1Δ24 resultierte.

2.7.2.2 Klonierung Fiber-pseudotypisierter CRAds

Zunächst wurden die Shuttle-Vektoren pSMDRE1, pSMDRE1Δ24 und pSALAE1 mit Hilfe der PmeI-Restriktionsendonuklease linearisiert, dephosphoryliert und über ein 0,5%-iges Agarosegel aufgereinigt. Für die homologe Rekombination wurden 200ng eines vorbehandelten Shuttle-Vektors (PmeI, CIP) mit 100ng des adenoviralen Plasmids pVK500F5/3 in den recA-positiven *E. coli* Stamm BJ5183 kotransformiert. pVK500F5/3 kodiert für das komplette adenovirale Genom mit einer Substitution der Ad5 Fiber-knob-Domäne durch die knob-Domäne des Serotyp3 und enthält zusätzlich das Ampicillin-Resistenzgen sowie einen bakteriellen Replikationsstart (ori). Rekombinante adenovirale Plasmide (pAd) wurden über die Kanamycin-Resistenz über mind. 24h bei 30°C selektioniert und potentielle Klone mittels PacI-Restriktion analysiert.

2.7.3 Transfektion rekombinanter adenoviraler DNA in Säugerzellen

Um aus den rekombinanten pAd-Plasmiden adenovirale Partikel zu generieren, müssen diese in Säugerzellen transfiziert werden, in denen die Verpackung des adenoviralen Genoms zu infektiösen Viruspartikeln erfolgt.

Für die Transfektion, Plaqueselektion und Virusproduktion Replikations-defizienter Adenoviren (ΔE1ΔE3) wurde die embryonale Nierenzellkarzinom-Zelllinie 293 verwendet. Durch die stabile genomische Integration der adenoviralen E1-Region sind 293A Zellen in der Lage, die Deletion des adenoviralen E1-Gens zu komplementieren, wodurch die Replikation rekombinanter ΔE1ΔE3-deletierter Adenoviren in 293 Zellen ermöglicht wird.

Replikations-kompetente Adenoviren (CRAds) wurden unter Verwendung der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 generiert, die sich für die Herstellung von CRAds bewährt hat.

CRAds sollten wenn möglich nicht in 293 Zellen generiert werden, da potentiell Rekombinationsereignisse zwischen der genomischen und adenoviralen E1-Region möglich sind.

Nach PacI-Linearisierung, die der Freisetzung der adenoviralen invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITR) diene, und PCI-Aufreinigung wurden rekombinante Ad Plasmide mittels Kalziumphosphat- (AdEasy-Manual) oder Fugene-Transfektion (Roche) nach Herstellerangaben in 293 bzw. A549 Zellen eingebracht. Die Infektion einer einzelnen Zelle durch ein einzelnes Adenovirus, die von multiplen Replikationszyklen sowie der lytischen Freisetzung der Viren aus infizierten Zellen begleitet wurde, konnte durch die Plaquebildung visualisiert werden. Um die Diffusion der viralen Partikel zu minimieren und um die Selektion einzelner viraler Plauques (rekombinante Ad Klone) zu ermöglichen, wurden die Zellen 24h nach Transfektion mit Sea-Plaque-Agarose-Nährmedium (1,25% Agarose w/v, Biozym) überschichtet. Einzelne Plaques wurden 10 bis 21 Tage nach Transfektion isoliert und einer Virusproduktion im kleinen Maßstab unterzogen (s. AdEasy-Maual), bevor sie mittels PCR bzw. funktionellen Genexpressions-Assays auf die Integrität der heterologen DNA-Sequenzen analysiert wurden.

2.7.4 Produktion von adenoviralen Partikeln

Ausgehend von Virusstocks (ca. 5×10^7 VP/ml) wurden sukzessive Virusproduktionen durchgeführt, die eine ausreichende Menge an rekombinanten Adenovirus hervorbringen sollten.

Das Eintreten des zytopathischen Effekts (CPE) diene als Maßstab für die erfolgreiche Virusproduktion. Der CPE tritt infolge der lytischen Virusreplikation auf und beschreibt das charakteristische Abkugeln von Virus-infizierten Säugerzellen sowie das Herauslösen infizierter Zellen aus dem Zellverband. Ein ausgeprägter CPE diene als Indikator des Zeitpunktes der Zellernte, da Adenoviren nach Auftreten des CPE weitere 1-2 Tage innerhalb der Zellen verbleiben und leicht durch die Ernte von CPE-positiven Zellen angereichert werden können.

293 bzw. A549 Zellen wurden in 10 bis 30 Zellkulturplatten ($\approx 175\text{cm}^2$) ausgesät und bei einer Konfluenz von 90% mit rekombinanten Adenoviren für 5h bei 37°C in 15ml Kulturmedium mit 2% FCS infiziert. Für die Virusinfektion wurde ein Aliquot einer vorangegangenen Virusproduktion im kleinen Maßstab ($1 \times 75\text{cm}^2$) verwendet. Nach 5h wurde das Kulturvolumen von 30 ml mit Kulturmedium (5% FCS) aufgefüllt. Die infizierten Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO_2 bis zur vollständigen CPE-Induktion (2-3 Tage nach Infektion) inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei 4°C . Abschließend wurden die Zellen bei 1000rpm für 10min

sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 bis 10ml 2%-igem Kulturmedium aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.7.5 Freisetzung adenoviraler Partikel

Die Freisetzung der Adenoviren aus Zellen erfolgte durch den Gefrier-Tau-Zyklus. Dabei wurde die Zellsuspension abwechselnd für 20 min in flüssigem Stickstoff (-196°C) und bei 37°C im Wasserbad (20 min) inkubiert. Nach viermaliger Wiederholung des Gefrier-Tau-Zyklus war der Zellaufschluß abgeschlossen und die Zellen wurden in Lösung entlassen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde für 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert, der Virus-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.7.6 Aufreinigung und Dialyse

Um infektiöse Viruspartikel von defekten viralen Partikeln (z.B. leere Virushüllen) zu trennen, wurde die Virussuspension über zwei diskontinuierliche Cäsiumchlorid (CsCl)-Gradienten aufgereinigt. Bei der Herstellung eines diskontinuierlichen CsCl-Gradienten wurden zunächst 5ml der Virussuspension in Zentrifugenröhrchen (Quick-Seal, Beckman, Palo Alto, CA, USA) eingefüllt. Dann wurden 4ml der leichten CsCl-Lösung (Dichte 1,2 g/cm³: 26.8g CsCl, 92ml 10mM Tris/HCl pH7.9) unterschichtet, bevor abschließend mit 4ml der schweren CsCl-Lösung (Dichte 1,4 g/cm³: 53g CsCl, 87ml 10mM Tris/HCl pH7.9) das Volumen des Röhrchens gefüllt wurde. Der erste CsCl-Gradient wurde für 2h bei 7°C und 60.000rpm zentrifugiert. Die Bande der infektiösen viralen Partikel wurde eluiert und über einen zweiten identischen diskontinuierlichen CsCl-Gradienten aufgereinigt. Der zweite CsCl-Gradient wurde bei 7°C und 60.000rpm für >18h zentrifugiert. Die infektiösen, adenoviralen Partikel wurden zur Entfernung des CsCl über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer (10mM Tris/HCl pH8.0, 2mM MgCl₂, 5% Sucrose) dialysiert. Der Dialysepuffer wurde zweimal gewechselt und betrug jeweils das 200fache Volumen der Viruslösung. Nach Abschluss der Dialyse wurden die Viren im Verhältnis 1:2 mit Virusverdünnungspuffer (10mM Tris/HCl pH8.0, 100mM NaCl, 0.1% BSA (w/v), 50% Glycerin) gemischt, in 10 bis 50µl Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

2.7.7 Titerbestimmung

Um die Ausbeute der Virusproduktion bestimmen zu können, wird die Anzahl der viralen Partikel über zwei Bestimmungsmethoden ermittelt.

2.7.7.1 Physikalische Titerbestimmung

Virale DNA wurde mittels photometrischer Absorption bei 260nm quantifiziert. Ein Virusaliquot wurde mit Viruslysepuffers (VLB: 0.5% SDS (w/v) in 1xTE) in den Verhältnissen 1:3, 1:5 und 1:10 versetzt und unter Schütteln für 30 min bei 56°C inkubiert. Durch Messung der optischen Dichte der Virusverdünnungen konnte die Anzahl viraler Partikel in Lösung nach folgender Formel berechnet werden, wobei die Absorption bei 320nm der Absorption der Lösung ohne Viruspartikel entspricht:

$$OD_{260nm} = A(260) - A(320)$$

$$OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{12} = \text{Titer in VP/ml}$$

Die Extinktion von 1 OD_{260nm} entspricht $1,1 \times 10^{12}$ Viren.

2.7.7.2 Biologische Titerbestimmung

Der „Tissue Culture Infectious Dose 50“ (TCID₅₀)-Test wurde für die Titration infektiöser Adenoviren eingesetzt und basiert auf der CPE-Induktion in 293A Zellen nach einer Endpunktverdünnung der Adenovirus-haltigen Infektionslösung. Jede Titerbestimmung wurde standardmäßig in zwei 96-Well-Platten als Doppelbestimmung durchgeführt. 293A Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well in 100µl Infektionsmedium (2% FCS) ausgesät und mit 100µl einer Virusverdünnung infiziert. Eine virale Infektion erfolgte jeweils als sequentielle Verdünnungsreihe des Virusstocks (10^{-2} bis 10^{-14}) in 10-facher Bestimmung. Die Virusverdünnungen wurden so gewählt, dass die geringste Verdünnung in allen Wells CPE induzierte, wohingegen die höchste Verdünnung keinen CPE induzieren durfte. 16 Wells der Testplatte (zwei Spalten) dienten als Negativkontrollen, d.h. die Zellen wurden nicht mit Virus infiziert. Für die virale Infektion wurden die entsprechenden Verdünnungen der Stammlösung in 293-Kulturmedium mit 2% FCS angesetzt. Die Testplatte wurde für 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der CPE-positiven Wells.

Der Virustiter T (TCID/ml) berechnet sich nach folgender Formel:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)} \quad \text{mit} \quad d = \log(\text{Verdünnungsfaktor}) \quad \text{und} \quad S = \Sigma \text{CPE-Wells}/10$$

Der TCID-Titer wurde wie folgt in die gebräuchliche Einheit „plaque forming unit“ (PFU) transformiert:

$$\text{PFU/ml} = \text{TCID/ml} - 0,7 \log$$

2.7.7.3 Qualität der Viruspartikel

Das Verhältnis infektiöser Viruspartikel (biologischer Titer in TCID₅₀/ml) zu der absoluten Virionenzahl (physikalischer Titer in VP/ml) gilt als Maß für die Qualität einer Virusproduktion und sollte das Verhältnis 1:100 nicht überschreiten. Alle Adenoviren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wiesen ein Verhältnis zwischen 1:12 und 1:51 auf (s. Anhang).

2.8 Luziferase-Reportergen-Assay

Das Luziferase-Reportergen ist ein gängiger genetischer Reporter, der für die Untersuchung der Genexpression in Säugerzellen eingesetzt wird. Das Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) wurde speziell für die luminometrische Messung von 96-Well-Platten entwickelt. Aufgrund der hohen Stabilität der Luziferase-Reaktion (Halbwertszeit >25min bei 22°C) wird die reproduzierbare Messung von 96 Proben gewährleistet. Darüber hinaus wurde die Sensitivität gegenüber anderen Signal-stabilisierten Luziferase-Assays erhöht, weshalb auch geringe Luziferase-Aktivitäten detektiert werden können. Das Bright-Glo Luciferase Assay System ist mit der Luziferase der amerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) (aus pGL3-Basic, Promega, Mannheim) kompatibel, die für die Klonierung der rekombinanten Adenoviren verwendet wurde.

Die Luziferase-Reaktion beruht auf der Monooxygenierung von Luziferin zu Oxiluziferin, die durch das Luziferase-Enzym katalysiert wird (s. Abb. 2). Die freiwerdende Biolumineszenz kann leicht in Luminometern quantifiziert werden. Da die Luziferase-Reaktion temperaturabhängig ist, wurden die verwendeten Zellen und Reagenzien vor ihrer Verwendung für mind. 2h bei RT inkubiert.

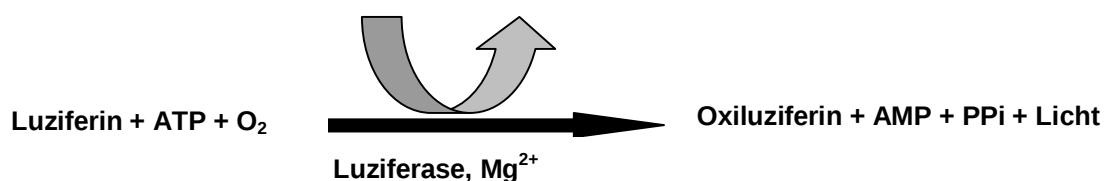


Abb. 2 Luziferase-Luziferin-Reaktion. Die Monooxygenierung von Luziferin wird durch Luziferase in Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und Sauerstoff katalysiert.

Je 10⁴ Zellen wurden in eine 96-Well-Platte in 100µl Wachstumsmedium (5% FCS) ausgesät. 24h später wurden die Zellen je Well für 2h mit Adenoviren in je 50µl Infektionsmedium (2% FCS) infiziert (Dreifachbestimmungen), bevor 100µl Kulturmedium (10% FCS) pro Well hinzu gegeben wurden. 48h nach der adenoviralen Infektion wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen durch die Zugabe von 100µl Lysispuffer (Glo Lysis Buffer, Promega,

Mannheim) pro Well für 5min bei RT lysiert. Danach wurden 50µl des Zelllysates in eine Messplatte überführt und 50µl Bright-GloTM-Assay Reagenz hinzu pipettiert. Nach weiteren 5min Inkubation bei RT wurde die Luziferase-Aktivität in einem Plattenluminometer (Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) als Lichtemission je Well pro Sekunde gemessen. Die Lichtemission wurde von dem Luminometer aufgezeichnet und in die angeschlossene Software eingespeist. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der in Dreifach-Bestimmung ermittelten Messwerte auf den Mittelwert der Luziferase-Aktivität des Referenzvirus Ad5CMVLuc bezogen. Die resultierenden relativen Luziferase-Aktivitäten wurden als prozentualer Anteil der CMV-Promotor vermittelten Luziferase-Aktivität angegeben (%CMV).

2.9 Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Assays

Das verwendete CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in Proliferations- oder Zytotoxizitäts-Assays (MTS-Assay). Das MTS-Assay basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliums Salzes MTS zu lila Formazan unter Beteiligung von NADPH oder NADH in metabolisch aktiven Zellen. Die Durchführung des Assays erfolgte durch die Zugabe von 20µl MTS zu 100µl Kulturvolumen je Well (96 Well Platte) und einer Inkubationszeit von 2-4h bei 37°C und 5% CO₂. Die Menge des umgesetzten Formazan-Produktes wurde spektrometrisch im ELISA-Platten-Reader (anthos htII) bei 492nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm gemessen. Die Quantität des Formazan-Produktes ist dabei direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen in Kultur. Die Hintergrundabsorption von Medium bei 490nm wurde korrigiert, indem Kontrollwells ohne Zellen mit gleichem Mediumvolumen mit MTS versetzt und inkubiert wurden und die resultierende Absorption der Kontrollwells von allen anderen experimentellen Wells subtrahiert wurde. Ferner ist das Assay abhängig von der genauen Zellzahl und dem metabolischen Zustand der Zellen, der zwischen Zelllinien variieren kann.

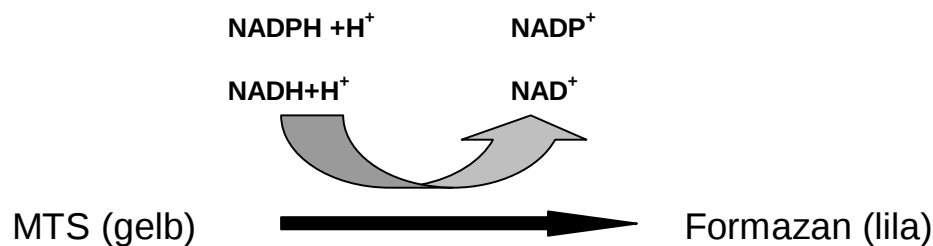


Abb. 3 Farbreaktion des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Assay)

2.9.1 Proliferations-Assay

Mittels des MTS-Assays wurde die Fähigkeit der Zellproliferation unter Doxorubin-Gabe evaluiert. Je 2×10^3 Zellen wurden pro Well in eine 96 Well-Platte mit 100µl 5%-iges Wachstumsmedium mit/ohne Doxorubicin- ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung der Zellproliferation erfolgte nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h durch Zugabe von je 20µl MTS/PMS-Lösung (Endkonzentration 333µg/ml MTS; 25µM PMS) je Well.

2.9.2 Zytotoxizitäts-Assay

Um die Zytotoxizität der adenoviralen Replikation zu quantifizieren, wurde das MTS-Assay mit Adenovirus-infizierten Zellen durchgeführt. Je 10^4 Zellen wurden in 100µl Wachstumsmedium (5% FCS) in 96-Wellplatten ausgesät und 24h später mit adenoviralen Vektoren infiziert. Dazu wurden adenovirale Partikel in 50µl Infektionsmedium (2% FCS) angesetzt und nach Entfernung des Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Zwei Stunden später wurden 100µl Wachstumsmedium hinzu gegeben und die Zellen solange bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis ein offensichtliche Zelllyse bei der geringsten Viruslast auftrat. Dann wurden pro Well 20µl MTS-Reagenz hinzugegeben, die Platte für 2 bis 4h bei 37°C inkubiert und die Absorption des Formazans bei 490nm und bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

2.9.3 ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA)

Die inhibitorische Wirkung von Zytostatika auf die Zellproliferation wurde mittels MTS-Assay analysiert. Solide Tumore wurden unter Verwendung des ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assays (ATP-TCA, DCS, Hamburg) nach Herstellerangaben durch eine enzymatische Behandlung in eine Einzelzellsuspension überführt. Für Zelllinien wurden je 10^4 Zellen, für primäre Tumorzellen je $1,5-2 \times 10^4$ Zellen je Well in eine 96-Well-Testplatte eingesät. Zur Bestimmung der Resistenz oder Sensitivität wurden Tumorzellen für 5 Tage in Gegenwart von Zytostatika-Konzentrationen (200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% und 6,25%) der in vitro Tumor Drug Konzentration (TDC) in 200µl Wachstumsmedium (5% FCS) kultiviert (s. Tabelle 9). Das Zytostatikaprofil von 200 bis 6,25% TDC wurde in Dreifachbestimmungen angesetzt. Die Kontrollwerte M0 bzw. MI entsprachen dem Nullwert (Zellen ohne Zytostatikum) bzw. dem Blindwert (nur Medium) und wurden 12-fach bestimmt. Nach 5 Tagen wurden je 20µl MTS-Reagenz pro Well hinzugegeben, die Testplatte für 2 bis 4h bei 37°C inkubiert und die Formazan-Produktmenge im ELISA-Platten-Reader bei 490nm quantifiziert.

Tabelle 9: Konzentrationsangabe der 100%-igen Zytostatika-Konzentration (Tumor Drug Concentration = TDC)

Medikament	100% TDC (µg/ml)	Stamm-Lösung (mg/ml)
Doxorubicin	0,5	2,0
Paclitaxel	13,6	6,0
Cisplatin	3,8	2,0

Die Wachstumshehmung (Tumor Growth Inhibition = TGI) der Tumorzellen für jede Zytostatika-Konzentration (TDC) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$1 - (\text{Test-MI}) / (\text{M0-MI}) = \text{TGI} \quad \text{bzw.} \quad \{1 - (\text{Test-MI}) / (\text{M0-MI})\} \times 100\% = \text{TGI}(\%)$$

wobei

Test = Mittelwert der drei Messwerte je Zytostatika-Konzentration

MI = Mittelwert der 12 Blindwerte

M0 = Mittelwert der 12 Nullwerte ohne Zytostatikum

Basierend auf den TGI-Werten wurden mittels der mitgelieferten DCS-Software folgende Parameter errechnet:

IC50 = durch Interpolation ermittelte Zytostatika-Konzentration, die zu 50% TGI führt

IC90 = durch Interpolation ermittelte Zytostatika-Konzentration, die zu 90% TGI führt

Folgende Kategorien der ex vivo Sensitivität wurden wie folgt definiert (Kurbacher et al., 1997):

Starke Sensitivität $\text{IC}_{90} \leq 100\% \text{ TDC}$ und $\text{IC}_{50} \leq 25\% \text{ TDC}$

Partielle Sensitivität $\text{IC}_{90} > 100\% \text{ TDC}$ und $\text{IC}_{50} \leq 25\% \text{ TDC}$

Schwache Sensitivität $\text{IC}_{90} \leq 100\% \text{ TDC}$ und $\text{IC}_{50} > 25\% \text{ TDC}$

Resistenz $\text{IC}_{90} > 100\% \text{ TDC}$ und $\text{IC}_{50} > 25\% \text{ TDC}$

2.10 Crystal-Violet-Assay

Das Crystal-Violet-Assay repräsentiert ein Zytotoxizitäts-Assay, das die Visualisierung von Zellen über eine Gesamtproteinfärbung erlaubt. Zunächst wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen in eine 24-Well-Platte mit je 1ml Wachstumsmedium (5% FCS) ausgesät und für 24h bei 37°C inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit entsprechenden Virusverdünnungen in 500µl Infektionsmedium (2% FCS) für 1h bei 37°C infiziert, bevor 1ml Wachstumsmedium

je Well hinzugegeben wurde. Die Zellvitalität wurde täglich kontrolliert, das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Sobald bei Wells mit der geringsten Viruslast CPE oder zytotoxische Effekte beobachtet wurden, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 10min bei RT mit Formalin fixiert. Nach der Entfernung des Formalins wurde das Gesamtprotein der fixierten Zellen mit je 1ml Crystal-Violet-Lösung (1% Crystal Violet in 70% EtOH) je Well für 20min bei RT angefärbt. Überschüssige Crystal-Violet-Lösung wurde unter fließendem Wasser abgewaschen und die Platten getrocknet, bevor sie digital fotografiert wurden.

2.11 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse werden die Daten aus unabhängigen Experimenten verwendet. Die Luziferase- und MTS-Assays wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Es werden immer Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

2.12 Proteinbiochemie

2.12.1 Proteinextraktion aus Zelllinien

Zur Vorbereitung des RIPA-Puffers (50mM Tris/HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100) wurde ein Aliquot von 8,75 ml (-20°C) aufgetaut und mit 1,25 ml 200mM NaF [Endkonzentration 25 mM], 100µl 200mM Na₃VO₄ [Endkonzentration 2mM] sowie einer Protease-Inhibitor Complete Mini Tablette versetzt. Der resultierende Protein-Lysepuffer wurde auf Eis gelagert.

Zellen wurden nach Zugabe eines adäquaten Volumens Protein-Lysepuffer (100µl für 5x10⁵ Zellen oder 300µl für 1x10⁷ Zellen) mit Hilfe eines Zellschabers aus der Kulturschale gelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 14000rpm für 15min bei 4°C sedimentiert: Der Protein-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei Bedarf bei -80°C zwischen gelagert oder sofort in die Proteinbestimmung eingesetzt.

2.12.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Biuret-Reaktion durchgeführt, die auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine basiert. Bicinchoninsäure reagiert als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv, spezifisch und stabil mit Cu¹⁺-Ionen zu einem wasserlöslichen stabilen Komplex, der stark bei 562 nm absorbiert. Folglich können Proteine in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 562 nm spektralphotometrisch quantifiziert werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine zuvor erstellte Eichgerade mit BSA ermöglichte die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der gemessenen Absorption bei 562 nm.

2.12.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS (sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinextrakte mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau, 62,5mM Tris) versetzt und hitzedenaturiert (5min 94°C). Unter Verwendung des Gießstandes des Mini-Protean II Systems (Biorad) wurden Trenn- und Sammelgele mit folgender Zusammensetzung (s. Tabelle 10) hergestellt:

Tabelle 10: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE nach Laemmli

Trenngel	10%	15%	Sammelgel	4%
40% Acrylamid	3,750 ml	5,625 ml	40% Acrylamid	500 µl
Trenngelpuffer	5,625 ml	5,625 ml	Sammelgelpuffer	625 µl
H ₂ O	5,340 ml	3,468 ml	H ₂ O	3,795 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	120 µl	120 µl	10% APS	25 µl
TEMED	12 µl	12 µl	TEMED	5 µl

Die Polymerisation des Trenngels erfolgte für mind. 30min. Die auspolymerisierten PA-Gele wurden in die Mini-Protean II Elektrophoresekammer (Biorad) eingesetzt und das Pufferreservoir mit 1x Elektrophorese-Puffer (25mM Tris pH8.3-8.4, 192mM Glycin) mit 0,1% SDS gefüllt. Nach dem Entfernen des Kamms wurden die Proben in die Geltaschen aufgetragen (10 bis 30µg Protein pro Spur). Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Proteingrößenstandard (See Blue Plus2 Prestained, Invitrogen) aufgetragen. Der Gellauf wurde bei 150V unter Verwendung des PowerPac 300 Power Supply (Biorad) gestartet. Die Spannung wurde auf 180V erhöht, nachdem die Proteinlauffront das Sammelgel durchlaufen hatte. Die totale Laufzeit betrug etwa 1h.

2.12.4 Western-Blot

Der elektrophoretische Proteintransfer erfolgte im semi-dry Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences), auf der die Proteine immobilisiert wurden.

Dafür wurde unmittelbar nach der Elektrophorese das Sammelgel entfernt und die Gele für 10min in Transferpuffer (25mM Tris-Base, 192mM Glycin, 20% Methanol) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 10min im Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des semi-dry Blots erfolgte durch das Luftblasen-freie Aufeinanderschichten von Gel-Blotting-Papier, der Nitrocellulose-Membran, des Gels und abschließend nochmals Gel-Blotting-Papier (Reihenfolge von unten nach oben) in der horizontalen Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)-Apparatur. Durch Anschließen der Blot-Apparatur an ein PowerPac 300 Power Supply (Biorad) erfolgte der Proteintransfer bei 15 V für 30min bei RT. Die Transfereffizienz wurde durch das Anfärben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S Lösung (Sigma) für 5min bei RT überprüft, bevor die Membran mit 0,1N NaOH entfärbt wurde.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Nitrocellulose-Membran in einer Block-Lösung (5% BSA bzw. 5% Magermilchpulver jeweils in 0,1% TBST) für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C unter ständigem Schütteln blockiert. Danach wurden fünf Waschschrte je 5min mit 0,1% TBST-Puffer (0,1% Tween in 1xTBS) bei RT durchgeführt. Für den spezifischen Nachweis des nachzuweisenden Proteins wurde der entsprechende Primärantikörper (aus Maus) in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in Blocklösung angesetzt und die Membran für 1h bei RT bzw. ÜN bei 4°C unter leichtem Schütteln in der Primärantikörper-Lösung inkubiert (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Angabe der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper im Western-Blot

Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper (HRP-konjugiert)	Blocklösung	Proteingröße
α -Lactalbumin	Clone F20.16 Dianova 1:400	Goat anti-mouse IgG Santa Cruz 1:2500	5% BSA	14kDa
Adenovirus Fiber	Clone 4D2 Dianova 1:2000	Goat anti-mouse IgG Dianova 1:70.000	5% Magermilch	62 bis 65kDa (Monomer)
β -Aktin	Clone AC-74 Sigma 1:3000	Goat anti-mouse IgG Dianova 1:70.000	5% Magermilch	42kDa

Um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran fünfmal mit 0,1% TBST für je 5min bei RT gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Peroxidase-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörpers (Verdünnung laut Herstellerangabe in 0,1% TBST, s. Tabelle 11) für 45min bei RT. Abschließend wurde die Membran fünfmal für je 5min in 0,1% TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung eines ECL-Detektionssystem (ECL™-Western Blotting Reagents, Amersham Biosciences) nach Anleitung des Herstellers. Die Signalentwicklung wurde auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) festgehalten.

2.12.5 Immunohistochemische Methoden

2.12.5.1 Anzucht von Zelllinien auf Objektträgern

Die Zellen wurden auf sterilen Objektträgern in Quadriperm-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % herangezogen. Die Zellen wurden für 15min mittels Formalin auf den Objektträgern fixiert, in PBS gewaschen (5min) und nacheinander für 5min in Methanol (-

20°C) und 1min in Aceton (-20°C) inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger für 5 min in PBS gewaschen und in Aufbewahrungsmedium (250ml PBS, 42.8g Sucrose, 0.33g MgCl₂, 250ml Glycerin) bei -20°C für maximal 6 Monate gelagert.

2.12.5.2 Anzucht von Kokulturen auf Objektträgern

Für die Kokultur wurden $0,75 \times 10^5$ epitheliale Zellen (HMEC oder BT-20) und $0,3 \times 10^5$ Fibroblasten auf einen sterilen Objektträger in Quadripermschalen ausgesät und bei 37°C inkubiert. 24h später wurden die Zellen mit Adenoviren (10VP/Zelle) für 4h in 1,5ml Infektionsmedium (2% FCS) infiziert, bevor das Kulturvolumen auf 4ml mit Wachstumsmedium aufgefüllt wurde. Die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern erfolgte mittels Formalinbehandlung (s. 2.12.5.1). Die Kokulturexperimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.12.5.3 Immunohistochemische Färbung nach der ABC-Methode

Die immunohistochemische Färbung wurde nach der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode unter Verwendung des Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kits (Vector Laboratories) durchgeführt. Nach der Inkubation der Probe mit dem Primärantikörper erfolgt die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin erfolgt im nächsten Schritt die Bindung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. Nach Zugabe des Substrates 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB, ScyTek) wird dieses durch die Peroxidase-Aktivität oxidiert und als braunes Präzipitat sichtbar.

Die einzelnen Schritte der Immunohistochemie wurden in Feuchtkammern bei RT durchgeführt, um die Austrocknung der Zellen auf den Objektträgern zu verhindern. Nach der Lagerung in Aufbewahrungsmedium wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült. Anschließend wurden endogene Peroxidase-Aktivitäten durch die Zugabe von 3% Wasserstoffperoxid für 15 min inaktiviert, um eine unspezifische DAB-Umsetzung zu vermeiden.

Anschließend wurde die Probe erneut mit PBS gewaschen und durch die Inkubation mit Normalserum unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach der Entfernung des Serums wurde die Probe mit dem Primärantikörper in PBS laut Herstellerempfehlungen für 1h inkubiert. Folgende Primärantikörper der Firma Dianova wurden nach Herstellerangaben eingesetzt: Pan-Keratin (Clone AE1/AE3); Vimentin (Clone V9); p170/p-Glykoprotein/MDR (Clone C494); α -Lactalbumin (Clone F20.16); Adenovirus Type2 E1A (Clone M73). Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30min nach Herstellerangaben. Während der 30min Inkubation der Zellen mit dem ABC-Reagenz wurde die DAB-Chromogen-Lösung nach Angaben des Herstellers (ScyTek)

zubereitet. Nach Zugabe des DAB-Substrates wurden die Zellen mit Leitungswasser gespült und anschließend die Zellkerne mit Hämalaun (nach Mayer, MERCK) gefärbt. Um eine möglichst vollständige Entwässerung der Zellen zu erreichen, wurden die Zellen einer ansteigenden Alkohol-Reihe mit finaler Xylol-Inkubation unterzogen. Die Objektträger wurden schließlich mit Eukitt® (Kindler GmbH & Co), einem wasserfreien Einschlußmittel für die mikroskopische Technik, eingebettet. Die Auswertung der immunohistochemischen Färbung erfolgte lichtmikroskopisch unter Berücksichtigung des immunreaktiven Scores nach Remmele (Remmele and Stegner, 1987). Die Aufnahme der Zellpräparate erfolgte mit einer Digitalkamera (DXM 1000, Nikon), die an ein Phasenkontrast-Mikroskop angeschlossen war, über die mitgelieferten Software.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten durch die Modifikation des adenoviralen Genoms konditional replikative Adenoviren entwickelt und getestet werden, die spezifisch gynäkologische Tumorzellen lysieren.

Im transkriptionellen Targeting kann durch die Promotor-Regulation adenoviraler Replikationsgene die Spezifität der Adenoviren derart verändert werden, dass die adenovirale Replikation bevorzugt in Tumorzellen erfolgt. Um die Tumorspezifität der Kandidatenpromotoren ALA und MDR zu untersuchen, wurde das Expressionsmuster der korrespondierenden Gene in gynäkologischen Tumor- und Kontrollzellen analysiert (s. 3.1.1). Die Charakterisierung der spezifischen Promotoraktivitäten erfolgte im Luziferase-Reporter-Gen-Assay (s. 3.1.2). Zu diesem Zweck wurden die Kandidatenpromotoren in einen adenoviralen Luziferase-Expressionsvektor kloniert und die Luziferase-Aktivitäten in Tumor- und Normalzellen bestimmt.

Die erfolgreiche Infektion des Zielgewebes ist eine wichtige Voraussetzung für die adenovirale Virotherapie. Durch die Modifikation des adenoviralen Fiberproteins kann der virale Tropismus verändert und somit eine erhöhte Infektion des Zielgewebes erzielt werden (transduktionelles Targeting). Verschiedene Adenoviren, die sich jeweils in dem Aufbau der adenoviralen Fiber unterscheiden, wurden in gynäkologischen Tumor- und Normalzellen hinsichtlich ihrer Infektionseffizienz analysiert (s. 3.2).

Um die Effizienz und Spezifität der adenoviralen Virotherapie für gynäkologische Tumore zu verbessern, wurde die Strategie des transkriptionellen Targetings mit dem Ansatz des transduktionellen Targetings kombiniert. Für die Klonierung konditional replikativer Adenoviren (CRAds) wurden die Kandidatenpromotoren in einen adenoviralen Vektor mit 5/3 Fiberchimäre inseriert, bei dem die Ad5 knob durch die Ad3 knob substituiert ist (s. 3.3). Das onkolytische Potential der rekombinanten CRAds wurde in Zytotoxizitäts-Assays charakterisiert (s. 3.3.2, 3.3.3), in die Normal- sowie Tumorzellen eingesetzt wurden.

3.1 Transkriptionelles Targeting: Charakterisierung der Kandidatenpromotoren für die CRAd-Konstruktion

Die Beschränkung der Onkolyse auf Tumorgewebe ist essentiell bei der adenoviralen Virotherapie, um toxische Effekte auf Normalgewebe zu vermeiden. Da die adenovirale Infektion sich gerade durch eine hohe Transduktion von epitheliale Normalgewebe auszeichnet, wird im Ansatz des transkriptionellen Targetings versucht, die Transgenexpression bzw. die adenovirale Replikation auf Tumorzellen zu beschränken. Aufgrund des natürlichen Hepatotropismus von Adenoviren sind niedrige Promotoraktivitäten in der Leber eine notwendige Voraussetzung, um toxische Nebenwirkungen der adenoviralen Gentherapie zu vermeiden.

3.1.1 Analyse der Genexpression potentieller Kandidatenpromotoren

Geeignete Promotoren für eine tumorgerichtete CRAd-Therapie leiten sich von Kandidatengen ab, die eine erhöhte Expression in Karzinomen sowie eine reduzierte oder fehlende Expression in Normalgewebe aufweisen. Eine große Anzahl von tumorspezifisch exprimierten Kandidatengen wurde in den letzten Jahren im Hochdurchsatzverfahren mittels Micro-Array-Analysen identifiziert. Zunächst wurden die korrespondierenden Gene der Kandidatenpromotoren ALA und MDR1 hinsichtlich ihrer spezifischen Expressionsmuster analysiert.

3.1.1.1 Expressionsanalyse des humanen α -Lactalbumin

Die Expression des ALA-Proteins erstreckt sich auf laktierende Mammaepithelzellen und MaCa-Zellen verschiedener Tumorstadien, wohingegen umliegende gesunde Mammazellen wie Fibroblasten ALA nicht exprimieren.

Die spezifische ALA-Proteinexpression wurde in MaCa-Zelllinien sowie Kontrollzellen analysiert. Eine ALA-Genexpressionsanalyse war aufgrund der hohen Sequenzhomologien der humanen Milchproteine nicht durchführbar. Für die Proteindetektion wurde der ALA-spezifische Ab-1/clone F20.16 Antikörper (Dianova) verwendet.

Mittels Immunohistochemie wurden 4/5 MaCa-Zelllinien (SK-BR-3, ZR-75-1, BT-20, BT-474) sowie immortalisierte MCF-12A Mammaepithelzellen als schwach positiv in Bezug auf die ALA-Expression getestet. Das ALA-Protein wurde subzellulär im Zytosol lokalisiert. Die höchste Intensität der ALA-Expression zeigten wenig differenzierte SK-BR-3 Zellen (s. Abb.1). In Kontrollzellen wie primären Mammaepithelzellen (HMEC) und primären Fibroblasten wurde kein ALA-Protein detektiert. Auch SK-OV-3 OvCa-Zellen wurden immunhistochemisch negativ auf die ALA-Expression getestet (Daten nicht gezeigt).

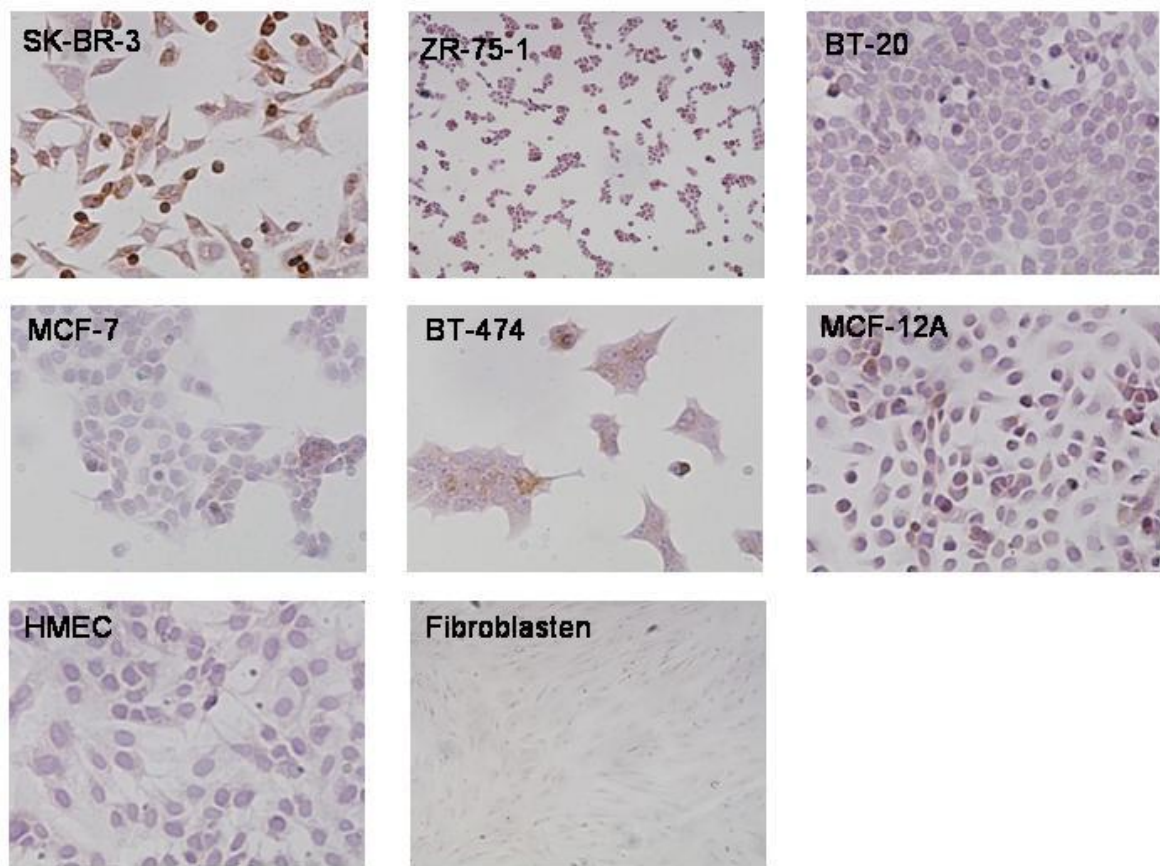


Abb.1 Immunohistochemische Analyse der ALA-Expression in Mammakarzinom- (SK-BR-3, ZR-75-1, BT-20, MCF-7, BT-474) und Kontrollzellen (MCF-12A, HMEC, Fibroblasten, SK-OV-3) unter Verwendung des F20.16-Antikörpers

Die ALA-Expression in Brustkrebszellen sollte mittels Western-Blot-Analyse verifiziert werden. Etablierte MaCa-Zelllinien (SK-BR-3, ZR-75-1, BT-20, MCF-7, MDA-MB-231 und MDA-MB-468) und normale MCF-12A Mammaepithelzellen wurden auf die ALA-Proteinexpression untersucht. Die OvCa-Zelllinie SK-OV-3 diente als Negativkontrolle. Die Normalisierung der Proteinmenge je Spur wurde mittels Detektion des ubiquitär exprimierten Proteins β -Aktin vorgenommen. Alle MaCa-Zelllinien wurden für die ALA-Expression positiv getestet, die höchste ALA-Expression wurde in SK-BR-3 Zellen detektiert (s.Abb.2).

Die Ergebnisse aus IHC und Western-Blot korrelierten und bestätigten die spezifische ALA-Expression in gesunden Mamma- und MaCa-Zellen. Da sowohl ER-positive (MCF-7, MCF-12A) als auch ER-negative (SK-BR-3, MDA-MB-231), gut (MCF-7) und wenig differenzierte (SK-BR-3, ZR-75-1) MaCa-Zellen positiv für die ALA-Expression getestet wurden, konnte keine Korrelation zwischen ER-Status, Metastasierungspotential, Differenzierungsstatus und der ALA-Expression nachgewiesen werden.

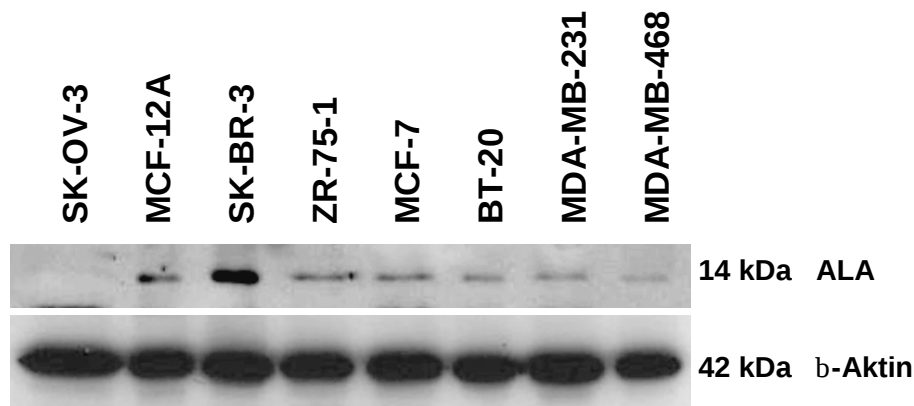


Abb.2 Western-Blot-Analyse der ALA-Expression in MaCa-Zelllinien (SK-BR-3, ZR-75-1, BT-20, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468) und Kontrollzellen (MCF-12A, SK-OV-3). Für die ALA-Detektion wurde der F20.16-Antikörper verwendet, b-Aktin diente der Normalisierung der Proteinmengen.

3.1.1.2 Analyse der basalen MDR1-Genexpression

Das Potential einer MDR-regulierten Gentherapie liegt in einer Therapieoption für chemoresistente Tumore, die durch derzeitige Therapieansätze nicht erreicht werden.

Zunächst wurde die Basalexpression des MDR1-Gens mittels quantitativer RT-PCR analysiert (s. Abb.3). Die tumorassoziierte MDR-Expression konnte durch die basale MDR1-Expression in 2/5 OvCa-Zelllinien (MDAH-2774 und SK-OV-3) sowie die fehlende Expression in Normalgewebszellen (FHS173WE und primäre Fibroblasten, MCF12A und HMEC Mammaepithelzellen) nachgewiesen werden. Primäre OvCa #1 Zellen, die aus Aszites von OvCa-Patientinnen nach Polychemotherapie isoliert wurden, wiesen im Vergleich zu MDAH-2774 eine 1,5-fach erhöhte MDR1-Genexpression auf, wohingegen primäre OvCa #2 Zellen eine minimale MDR1-Expression zeigten. Die getesteten malignen mammären Linien SK-BR-3, ZR-75-1, BT-20, MCF-7 und T-47-D wurden negativ auf die MDR1-Genexpression getestet.

Für die Analyse der Lebertoxizität wurden modellhaft HepG2 Tumorzellen, da keine primären Hepathozyten verfügbar waren. Die positive MDR1-Expression in HepG2 Zellen stimmt mit der beschriebenen basalen MDR1-Expression in der Leber überein. Bei der Anwendung einer MDR-Promotor-regulierten Virotherapie müssen mögliche lebertoxische Nebenwirkungen berücksichtigt werden. Da es sich bei der Zelllinie HepG2 um eine murine Tumorzelllinie handelt, sind die Ergebnisse nur bedingt auf das humane System übertragbar.

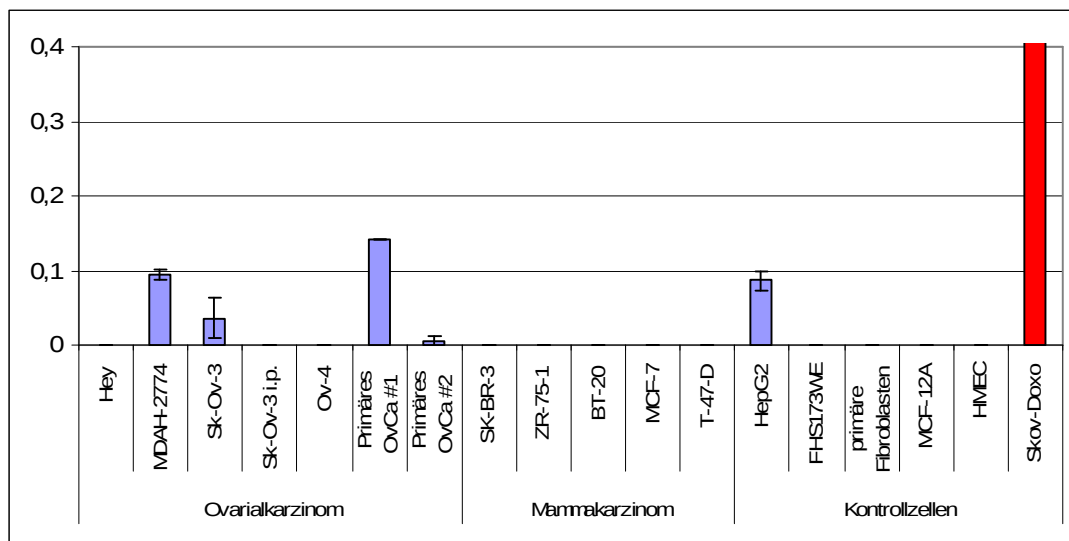


Abb.3 Relative MDR1-Genexpression in Ovarial-, Mammakarzinomzellen und Kontrollzellen. Die relative MDR1-Expression (MDR1/GAPDH) wurde durch den Bezug auf das ubiquitär exprimierte GAPDH-Gen bestimmt (y-Achse). Dargestellt wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten.

3.1.1.3 MDR-Geninduktion in Doxorubicin-Resistenzlinien

Um die MDR1-Geninduktion in Zytostatika-resistenten Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, das die klinische Situation von Tumorrezidiven nach einer Doxorubicin-Therapie imitieren sollte.

3.1.1.3.1 Selektionierung der Doxo-Resistenzlinien

Zur Etablierung Doxorubicin-resistenter Sublinien wurden Zellen in permanenter Gegenwart von Doxorubicin kultiviert. Unter permanenter Doxorubicin-Gabe (20 bis 400ng/ml) konnten Doxo-resistente Sublinien der Zelllinie SK-OV-3 isoliert werden, die im Folgenden als Doxo-Resistenzlinien bezeichnet werden. Die Doxo-Resistenzlinien werden jeweils mit dem Zusatz der Doxorubicin-Konzentration benannt, mit der sie kultiviert wurden, so wurde z.B. SK-OV-3(55) in 55ng/ml Doxorubicin angezogen.

3.1.1.3.2 Charakterisierung der Doxo-Resistenzlinien

Die Wachstumsrate der Doxo-Resistenzzellen gegenüber parentalen SK-OV-3 Zellen wurde in einem MTS-Proliferations-Assay untersucht. Je 2000 Zellen/Vertiefung wurden in eine 96-Lochplatte eingesät und die Zellvitalität in Abständen von 24h über einen Gesamtzeitraum von 120h bestimmt (s. Abb.4). Während die Proliferation von parentalen SK-OV-3 Zellen durch Doxorubicin-Gabe vollständig inhibiert wurde, zeigten SK-OV-3(100) Resistenzzellen in Gegenwart von Doxorubicin eine deutliche Proliferationskompetenz. Die selektionierten Doxo-Resistenzzellen zeichneten sich im Vergleich zu der parentalen Linie durch eine Doxorubicin-Toleranz bei reduzierter Zellteilungsrate aus.

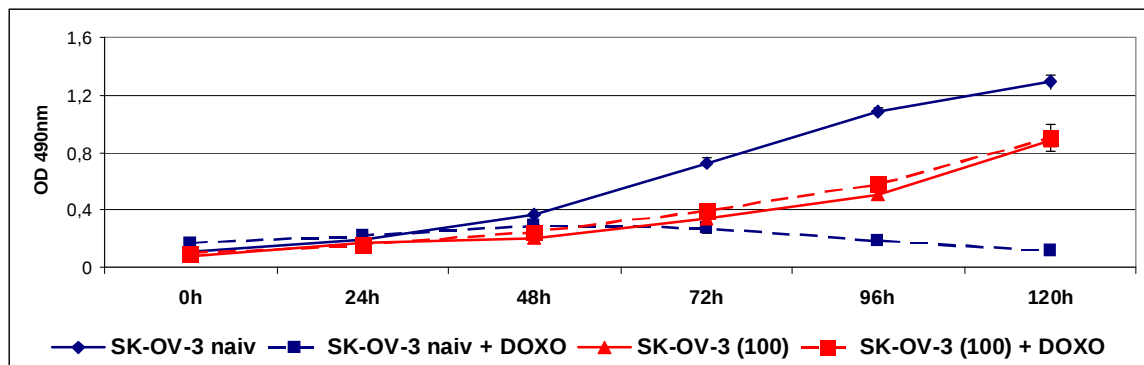


Abb.4 MTS-Proliferations-Analyse naiver und resistenter SK-OV-3 Zellen mit / ohne Doxorubicin-Behandlung (100ng/ml) im MTS-Assay. Dargestellt wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus 3 Experimenten

3.1.1.3.3 Analyse der Chemoresistenz

Die Sensitivität der Doxo-Resistenzlinien gegenüber einer Auswahl von Zytostatika wurde in dem Tumor-Chemosensitivitäts-Assay (TCA) spezifiziert. Dazu wurden jeweils 10.000 Zellen je Vertiefung in eine U-förmige 96-Lochplatte eingesät und mit verschiedenen Zytostatika-Konzentrationen (Zytostatika-Konzentration in Medium in %) inkubiert. Nach 5 Tagen wurde die Zellvitalität bestimmt und aus den ermittelten IC90-, IC50-Werten der Grad der Resistenz bestimmt (s. Abb.5, Tabelle 1).

Tabelle 1: Angabe der IC90- und IC50-Werte sowie der *ex-vivo* Sensitivität des Tumor-Chemosensitivitäts-Assays

Zelllinie	Zytostatikum	IC90	IC50	<i>ex-vivo</i> Sensitivität
SK-OV-3 naiv	Doxorubicin	202	24	Partielle Sensitivität
SK-OV-3(60)	Doxorubicin	2266	1258	Resistenz
SK-OV-3(120)	Doxorubicin	396	219	Resistenz
SK-OV-3 naiv	Cisplatin	292	152	Resistenz
SK-OV-3(60)	Cisplatin	37	11	Starke Sensitivität
SK-OV-3(120)	Cisplatin	75	12	Starke Sensitivität
SK-OV-3 naiv	Paclitaxel	84	4	Starke Sensitivität
SK-OV-3(60)	Paclitaxel	19	4	Starke Sensitivität
SK-OV-3(120)	Paclitaxel	32	4	Starke Sensitivität

Parentale SK-OV-3 Zellen waren partiell sensitiv gegenüber der Doxorubicin-Gabe und ließen mit steigender Doxorubicin-Dosis eine zunehmende Inhibition der Zellproliferation erkennen. Selektionierte Doxo-Resistenzlinien zeichneten sich durch eine vollständige Resistenz gegenüber der Doxorubicin-Behandlung aus. Die Inkubation der Zellen mit Cisplatin offenbarte die intrinsische Multidrug-Resistenz naiver SK-OV-3 Zellen, während ein Verlust der Cisplatin-Resistenz in Doxo-Resistenzzellen beobachtet wurde. Gegenüber der Behandlung mit Paclitaxel waren sowohl naive SK-OV-3 Zellen als auch Doxo-Resistenzlinien sensitiv.

Demnach konnte die *in-vitro* Doxorubicin-Selektion von SK-OV-3 Zellen eine Doxorubicin-spezifische Zytostatika-Resistenz induzieren, eine Kreuzresistenz gegenüber Paclitaxel und Cisplatin wurde nicht beobachtet.

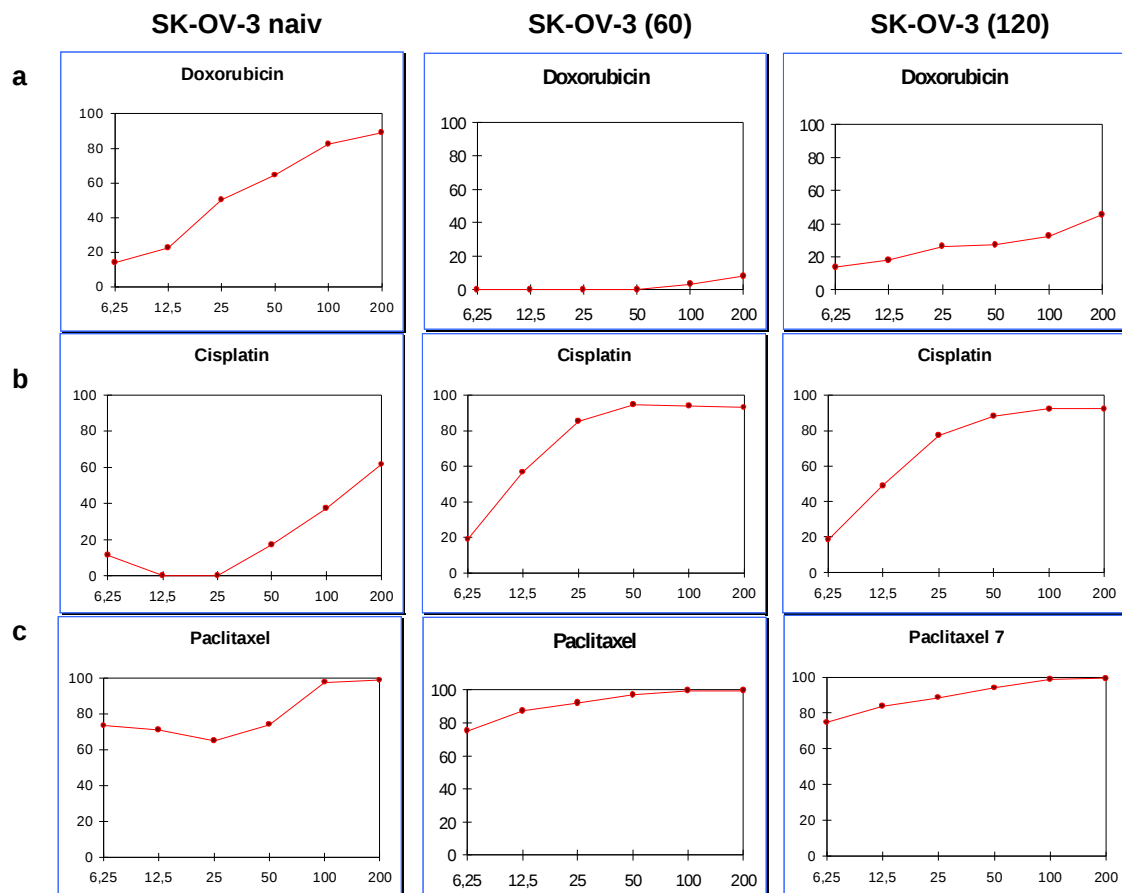


Abb.5 TCA-Chemosensitivitäts-Assay. Die Resistenzen naiver und selektionierter Doxorubicin-resistenter SK-OV-3 Zellen gegenüber Doxorubicin (a), Cisplatin (b) und Paclitaxel (c) wurde in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt und die Mittelwerte dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Zytostatika-Konzentration in %, auf der y-Achse die Inhibition des Tumorwachstums in % angegeben.

3.1.1.3.4 MDR1-Geninduktion in Doxo-Resistenzlinien

Zur Beantwortung der Frage, ob die phänotypische Doxorubicin-Resistenz durch die MDR1-Expression vermittelt wird, wurden SK-OV-3 basierte Doxo-Resistenzlinien auf die MDR-Geninduktion durch Doxorubicin untersucht.

Die Genexpressionsanalyse belegte die dosisabhängige MDR1-Geninduktion in SK-OV-3-Resistenzlinien nach Doxorubicin-Langzeitselektion (s. Abb.6).

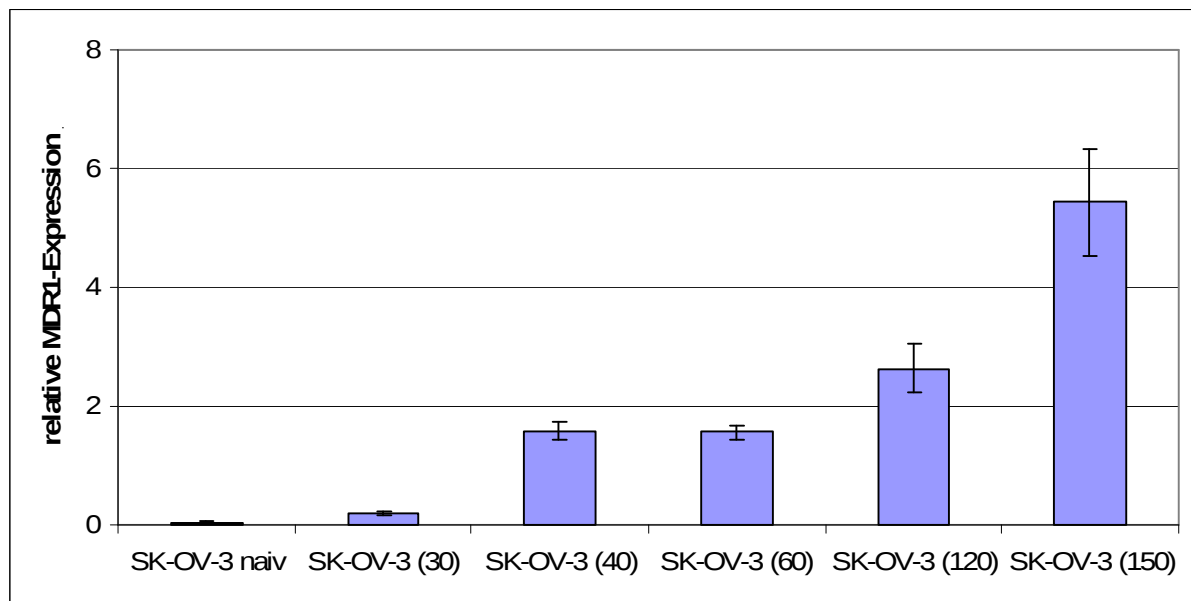


Abb.6 MDR-Geninduktion nach Doxorubicin-Selektion von SK-OV-3 Zellen. Dargestellt wurde die relative MDR-Expression (MDR/GAPDH) als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 3 Experimenten.

Mittels quantitativer RealTime-PCR wurde untersucht, ob weitere relevante Chemoresistenzgene in die Ausprägung der Doxorubicin-Resistenz involviert sind. Die Multidrug-Resistenz assoziierten Gene BCRP (breast cancer resistance protein) und LRP (lung cancer resistance protein) wurden in Doxo-Resistenzzellen vermindert exprimiert, während die MRP-Expression (multi drug resistance protein) unverändert blieb (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich die MDR1-Geninduktion wurde in Doxo-Resistenzlinien bestätigt.

Die Doxorubicin-Langzeitbehandlung von SK-OV-3 Zellen konnte folglich eine spezifische Chemoresistenz induzieren, die auf eine erhöhte Transkription des MDR1-Gens zurückzuführen war. Die dosisabhängige Zunahme der MDR1-Genexpression deutet auf eine Doxorubicin-abhängige Aktivierung des MDR1-Promotors hin, die unter 3.1.2 näher analysiert wurde. Die Funktionalität des *in-vitro* Doxo-Resistenzmodells wurde durch die Korrelation der phänotypischen Doxorubicin-Resistenz mit der spezifischen MDR1-Expression verifiziert.

3.1.1.3.5 MDR-Genamplifikation nach Doxorubicin-Behandlung

In-vitro Studien beschreiben die Amplifikation des MDR1-Gens sowie eine daraus resultierende MDR1-Überexpression in Doxorubicin-behandelten Tumorzellen. In einer quantitativen differentiellen PCR (An et al., 1995) wurden Doxo-Resistenzzellen darauf hin untersucht, ob die beschriebene MDR-Induktion infolge der Doxorubicin-Behandlung mit einer Genamplifikation einhergeht. Naive OvCa- und MaCa- Zelllinien sowie ein randomisiertes Patientenkollektiv (Tumor- gegen Normalgewebe, OvCa) dienten als Kontrollen. Zur Normalisierung der Messungen wurden in einem Ansatz jeweils das MDR1-Gen sowie das GAPDH-Referenzgen simultan amplifiziert und das PCR-Signal des

MDR1-Gens auf das PCR-Signal des GAPDH-Gens bezogen. Für die Bestimmung der MDR1-Genkopiezahl wurden die PCR-Signale der Tumore auf die PCR-Signale der Normalgewebe bezogen: $\text{MDR1-Genamplifikation} = [\text{Tumor (MDR1/GAPDH)}] : [\text{Normalgewebe (MDR1/GAPDH)}]$.

Im Gegensatz zu parental SK-OV-3 Zellen wurde durch die Doxorubicin-Selektion der Resistenzlinien SK-OV-3(120) eine durchschnittliche 2,6 fache Kopienzahl des MDR1-Gens nachgewiesen (s. Abb.7). Etablierte OvCa-Linien sowie das randomisierte OvCa-Patientinnen-Kollektiv zeigten im Vergleich zu den gemittelten korrespondierenden Normalgeweben keine MDR1-Genamplifikation (s. Abb.7B). Für die MaCa-Zelllinien T-47-D, für MCF-7 und für SK-BR-3 wurde eine 3,9, 2,2 bzw. 1,9 fache MDR1-Genamplifikation nachgewiesen (s. Abb.7A).

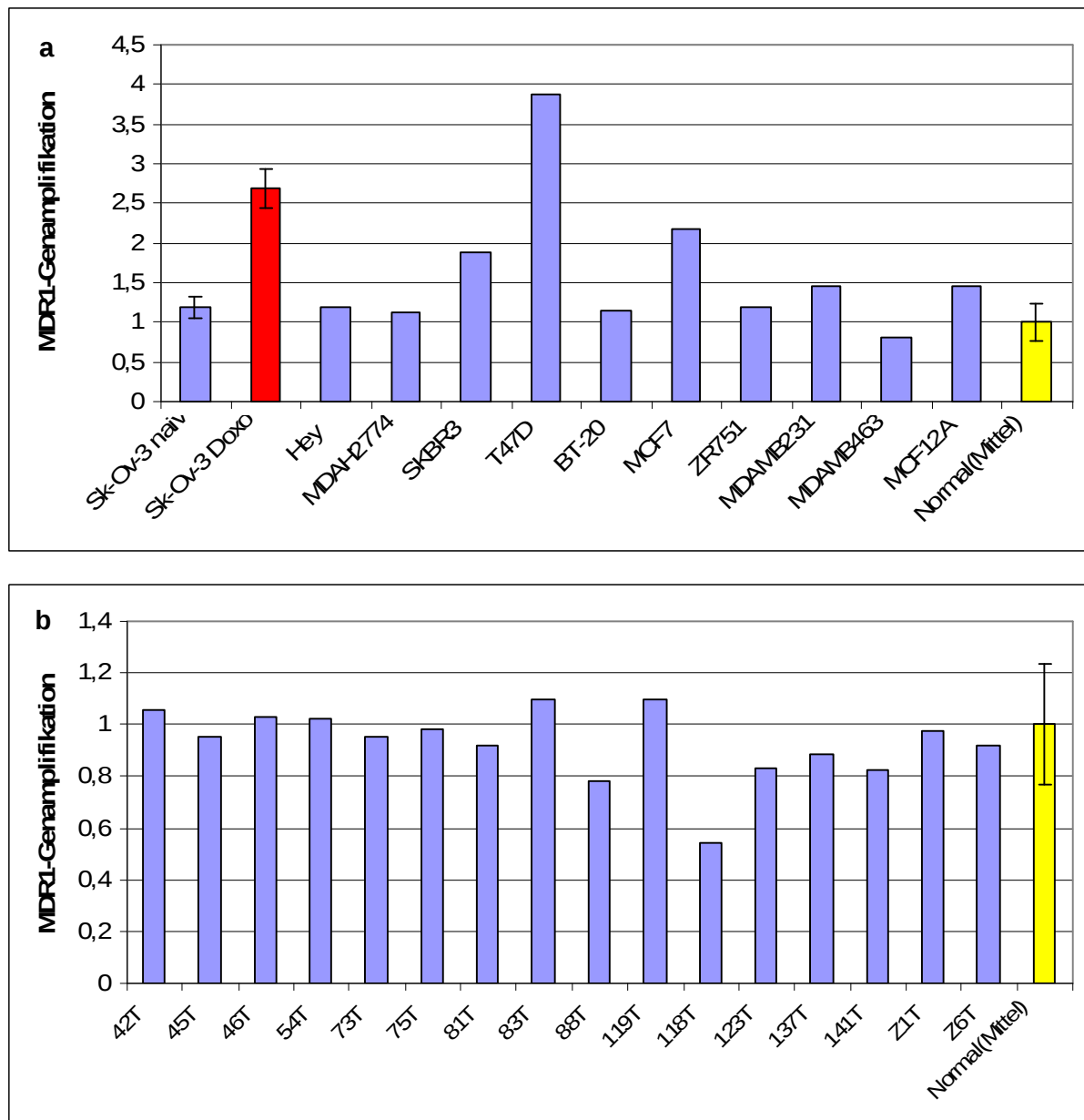


Abb.7 MDR1-Genamplifikation in Zelllinien (a) und einem OvCa-Patienten-Kollektiv (b). Dargestellt wurde die MDR1-Genkopiezahl der Tumorproben bezogen auf den Mittelwert der Normalgewebe.

3.1.1.3.6 P-Glykoprotein-Induktion in Doxo-Resistenzlinien

Der Zusammenhang zwischen gesteigerter MDR1-Transkriptionsrate und erhöhter Expression des P-Glykoprotein Membran-Transporters wurde mittels Immunohistochemie untersucht. In Doxo-resistenten SK-OV-3 Zellen konnte über die Anfärbung mit dem MDR1-Isoform spezifischen JSB-1 Antikörper (Dianova) die Expression des P-Glykoproteins entlang der Ausläufer der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden (s. Abb.8). Die schwach homogene Färbung des Zytoplasmas mit granulärem Muster war auf eine unspezifische Anfärbung der Pyruvat-Carboxylase zurückzuführen. Demnach korrelierte die Expression des P-Glykoproteins in Doxo-Resistenzzellen mit der erhöhten MDR1-Transkription.

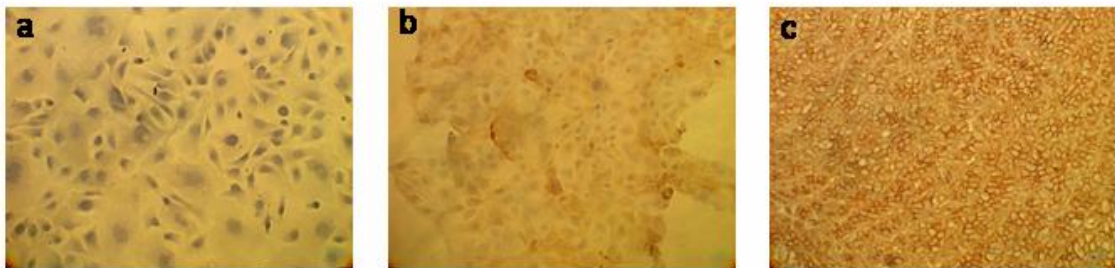


Abb.8 Immunohistochemischer Nachweis der p-Glykoproteinexpression nach Doxorubicin-Induktion unter Verwendung des JSB1-Antikörpers (100x Vergrößerung). a) Naive SK-OV-3 Zellen; b) Doxorubicin resistente SK-OV-3(150) Zellen; c) Nebennierenrinde (Positivkontrolle)

3.1.2 Charakterisierung der Promotoren im Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Bei der Auswahl der Kandidatenpromotoren ist eine ausreichende Expression des korrespondierenden Gens in Tumorgewebe eine notwendige Voraussetzung. Nur eine hinreichende Aktivität des Kandidatenpromotors gewährleistet die Einleitung des adenoviralen Replikationszyklus, der mit der Zelllyse der Zielzellen endet. Andererseits sollten die Kandidatenpromotoren über eine niedrige Genexpression in lebenswichtigen Organen wie Leber, Herz, Niere oder Hirn verfügen, damit toxische Effekte auf Normalgewebe vermieden werden. Die Spezifität und Aktivität der Kandidatenpromotoren ALA und MDR im adenoviralen Vektorhintergrund wurde in Luziferase-Reporter-Gen-Experimenten analysiert.

3.1.2.1 Klonierung der adenoviralen Luziferase-Expressionsvektoren

Um die transkriptionelle Aktivität der Kandidatenpromotoren zu bestimmen, wurden die humanen Promotoren ALA und MDR sowie der virale Referenzpromotor CMV mit Hilfe des AdEasy-Systems in ein adenovirales Genom integriert (s. Material & Methoden).

Die Klonierung der Luziferase-exprimierenden Adenoviren erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden der zu untersuchende Promotor und die Luziferase-Expressionskassette in den Transfervektor pShuttle kloniert. Im zweiten Schritt wurde die Promotor-Luziferase-Expressionskassette mittels homologer Rekombination in das nicht-replikative adenovirale Plasmid pAdEasy inseriert, das für ein E1- und E3-deletiertes adenovirales Genom ($\Delta E1\Delta E3$) des Serotyp 5 (Ad5) kodiert. Die Plasmidkarten der verwendeten Vektoren sind im Anhang zu finden.

Ein proximales ALA-Promotorfragment wurde mittels PCR aus Blut-DNA gesunder Patienten amplifiziert und in den Luziferase-Expressionsvektor pGL3-Basic ligiert. Die Expressionskassette aus ALA-Promotor und Luziferase-Reporter-Gen (ALA:Luc) wurde aus dem Plasmid pGL3ALA mit den Restriktionsendonukleasen NotI und SalI ausgeschnitten und in den NotI/SalI geöffneten pShuttle-Vektor ligiert.

Hinsichtlich des MDR-Promotors wurde eine Zwei-Schritt-Klonierung angewandt. Nachdem das Luziferase-Gen über NotI/SalI in pShuttle inseriert wurde, wurde der MDR-Promotor über NheI/Hind III aus pGL3MDR ausgeschnitten und vor das Luziferase-Gen in pShuttle-Luc ligiert. Für die Klonierung des Referenzvirus wurde das pShuttle-CMV Plasmid verwendet, das bereits die CMV-Promotorsequenz enthält. Das Luziferase-Reporter-Gen wurde über HindIII/XbaI aus pGL3-Basic ausgeschnitten und in pShuttle-CMV eingefügt.

Über homologe Rekombination in *E. coli* wurden die Promotor-Luziferase-Genexpressionskassetten aus den rekombinanten pShuttle-Plasmiden in das Ad5-Genom inseriert. Die resultierenden rekombinanten adenoviralen Plasmide wurden mittels PCR und Restriktionsanalyse auf die korrekte Insertion der Expressionskassette überprüft, bevor sie in die Verpackungszelllinie 293A transfiziert wurden. Aufgrund der genomischen Integration adenoviraler Genfunktionen komplementieren 293A

Zellen die E1-Genfunktion, weshalb rekombinante $\Delta E1\Delta E3$ -Adenoviren in 293A Zellen effizient replizieren. Nach erfolgreicher Virusreplikation wurden 10 bis 18 Tage nach Transfektion sogenannte Plaques sichtbar, die auf die Replikation eines einzelnen rekombinanten Adenovirus zurückzuführen waren. Nach der Isolation vereinzelter Plaques wurden die adenoviralen Klone mittels PCR und Restriktionsanalyse sowie im funktionellen Luziferase-Assay auf die korrekte Insertion der Expressionskassette analysiert. Adenovirale Klone mit maximaler Luziferase-Expression wurden im grossen Massstab produziert, über CsCl-Gradienten aufgereinigt und nach der Bestimmung der viralen Titer in das funktionelle Luziferase-Assay eingesetzt.

Die resultierenden nicht-replikativen Adenoviren Ad5ALALuc und Ad5MDRLuc enthielten jeweils das Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors (s. Abb.9). Das isogenetische Referenzvirus Ad5CMVLuc Virus enthielt die immediate early Promotor- und Enhancer-Region des Cytomegalovirus (CMV).

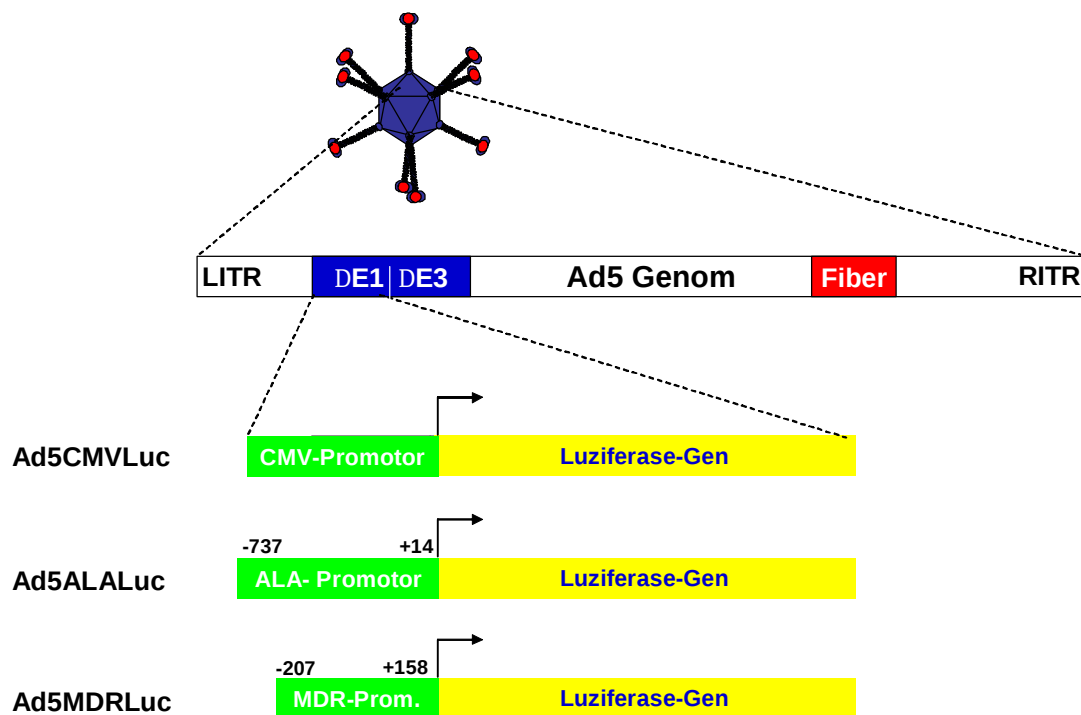


Abb.9 Schematische Übersicht der Luziferase-Expressionsvektoren

3.1.2.2 Analyse der Promotoraktivitäten im Luziferase-Assay

Zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivitäten der Kandidatenpromotoren wurden gynäkologische Tumor- und Normalzellen mit Ad5ALALuc, Ad5MDRLuc und Ad5CMVLuc mit 10 bis 100 PFU/Zelle infiziert und nach 48h die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Lumineszenzen der Negativkontrollen (0 PFU/Zelle) wurden als Hintergrundsignale der Zellkulturen gewertet. Es wurden nur Messdaten verwendet, die mindestens 10-fach über den Hintergrundsignalen lagen. Innerhalb einer Zelllinie wurden die Luziferase-Aktivitäten jeweils auf die Luziferase-Aktivität des Ad5CMVLuc-Referenzvirus normiert (% CMV), um abweichende Transduktionseffizienzen zwischen den Zelllinien zu minimieren. Es wurde keine Normalisierung der Luziferase-Aktivität auf ein Referenzsystem vorgenommen. Der Einfluss variierender Zellzahlen auf die Messdaten konnte aufgrund der Sicherheit in der Versuchshandhabung und der hohen Reproduzierbarkeit der Daten minimiert werden. Abweichungen in den Messdaten hinsichtlich toxischer Effekte der Virusinfektion konnten aufgrund der Verwendung vergleichbarer Virusqualitäten und mikroskopischer Überprüfung der Zellvitalität unmittelbar vor der Zelllyse minimiert werden.

3.1.2.3 Ad5ALALuc-vermittelte Luziferase-Expression

Als Kriterium für die Auswahl des ALA-Promotors wurde die gewebespezifische Expression des korrespondierenden humanen α -Lactalbumin Gens (ALA) in der Mamma zugrunde gelegt.

In 4/7 MaCa-Linien wurden ALA-Promotoraktivitäten (0,2% bis 0,85% der CMV-Aktivität) gemessen, die im Vergleich zu der MDR-Aktivität deutlich geringer waren (s. Abb.10). Die Tumorspezifität des ALA-Promotors wurde verdeutlicht, indem die ALA-Aktivität in Kontrollzellen (FHS173WE, HFBC, MCF-12A) im Vergleich zu MaCa-Zellen reduziert war. Auch primäre mamäre Normalgewebszellen (HMEC, Fibroblasten #1 und #2), die aus normalem Brustgewebe isoliert wurden, zeigten in Relation zu MaCa-Zellen deutlich reduzierte ALA-Aktivitäten von unter 0,02% der CMV-Aktivität (s. Abb.10).

Die ALA-Promotoraktivitäten in den getesteten MaCa-Zelllinien waren mit Ausnahme der Zelllinie SK-BR-3 mit dem ALA-Proteinexpressionsmuster vereinbar. Als mögliche Ursache für ein fehlendes Korrelat zwischen ALA-Expression und ALA-Promotoraktivität in SK-BR-3 Zellen könnten niedrige Messwerte im Luziferase-Experiment gelten, die zu niedrigen relativen Luziferase-Aktivitäten führten.

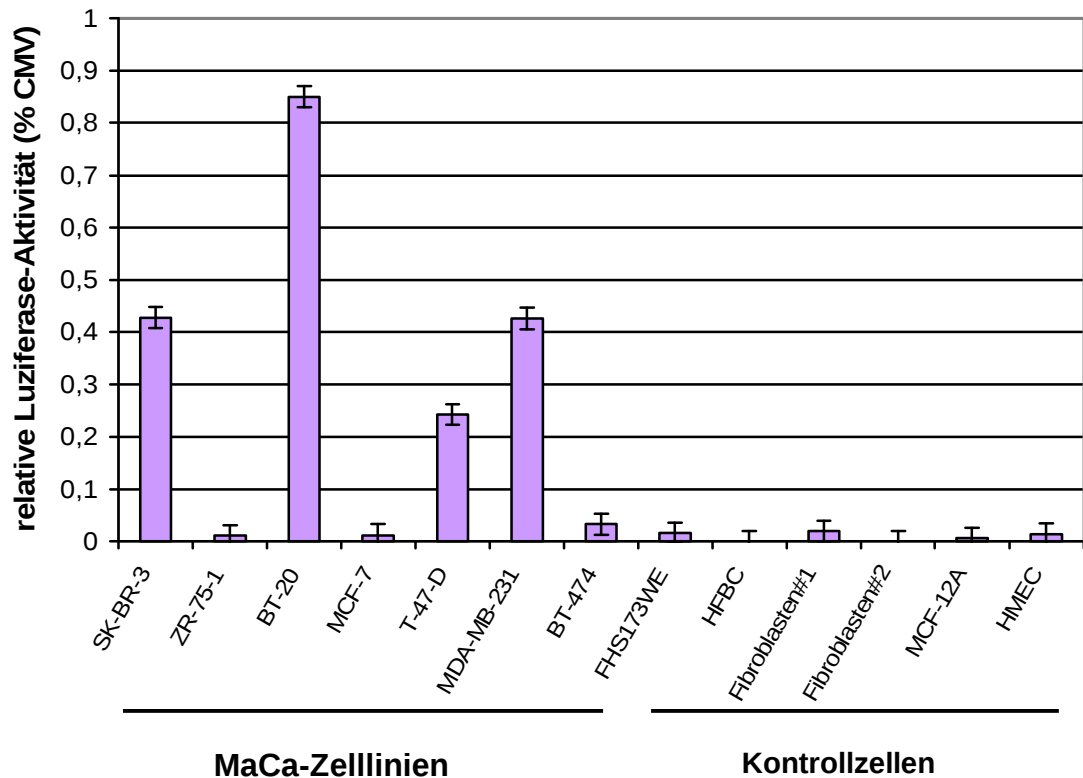


Abb.10 Relative Luziferase-Aktivität (%CMV) in MaCa-Zelllinien und Kontrollzellen nach Ad5ALALuc-Infektion mit 100 PFU/Zelle. Dargestellt wurden Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

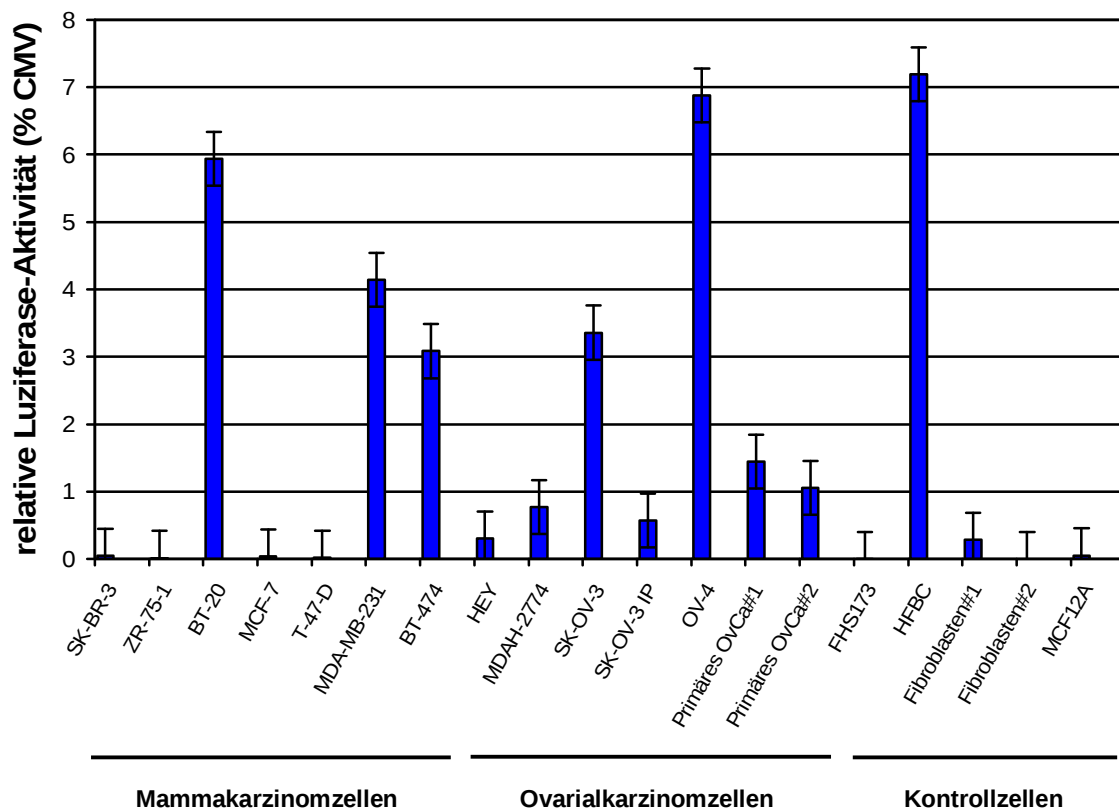
3.1.2.4 Ad5MDRLuc-vermittelte Luziferase-Expression

Fortgeschrittene Ovarial- und Mammatumore verfügen oftmals über Multidrugresistenzen, die auf die Überexpression des MDR1-kodierten p-Glykoproteins (p-Gp) zurückgehen. Als Mechanismus der p-Gp-Multidrugresistenz in Tumoren ist die Induktion der MDR1-Genexpression durch Zytostatika beschrieben, die auf die Aktivierung des MDR1-Promotors durch Anthrazykline und Taxane zurückgeht. Darüber hinaus wurde die MDR1-Genamplifikation in Zelllinien nachgewiesen.

Als Zytostatika-induzierbarer Promotor verfügt MDR über das Potential, eine Virotherapie in chemoresistenten Tumoren zu induzieren. Die transkriptionelle Aktivität des MDR-Promotors wurde vor und nach Doxorubicin-Induktion in gynäkologischen Zelllinien mittels Reporter-Gen-Analysen untersucht (s. Abb.11).

Basale MDR-Promotoraktivitäten zwischen 3,1% und 5,9% der CMV-Promotoraktivität wurden in den MaCa Zelllinien BT-474, MDA-MB-231 und BT-20 nachgewiesen, während in SK-BR-3, ZR-75-1, MCF-7 und T-47-D MaCa-Zellen deutlich geringere MDR:Luziferase-Aktivitäten gemessen wurden.

a



b

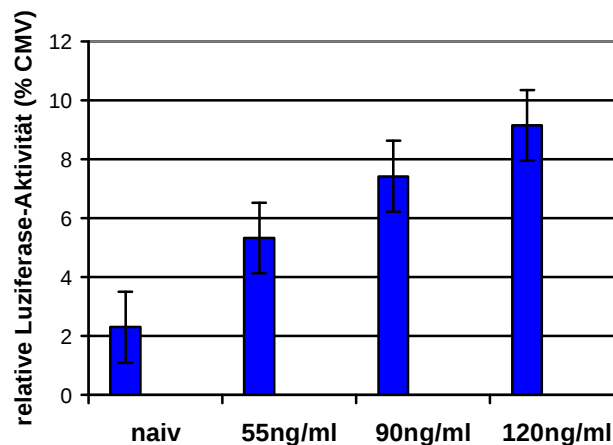


Abb.11 Relative Luciferase-Aktivität (%CMV) nach Ad5MDRLuc-Infektion (10PFU/Zelle). Dargestellt wurden Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. a) MaCa-, OvCa-Zelllinien, Kontrollzellen b) MDR-Promotoraktivität in naiven SK-OV-3 Zellen und SK-OV-3 Doxorubicin-Resistenzlinien (55-120ng/ml Doxorubicin)

Die transkriptionellen MDR-Aktivitäten in OvCa-Zelllinien lagen zwischen 0,2% (Hey) und 6,8% (Ov-4) der CMV-Aktivität. Die MDR:Luziferase-Aktivität in primären Ovarialtumoren (primäre OvCa #1 und #2) näherte sich mit 1% bzw. 0,6% der CMV-Aktivität der mittleren MDR-Aktivität in OvCa-Zelllinien an.

In Kontrollzellen waren die gemessenen MDR-Promotoraktivitäten in etablierten FHS173WE, primären Fibroblasten #1 sowie MCF-12A Brustepithelzellen mit unter 0,05% der CMV-Aktivität deutlich vermindert gegenüber MDR-Aktivitäten in Tumorzellen. Jedoch deutet die MDR:Luziferase-Aktivität von 7,1% in HFBC Zellen bzw. 0,3% in primären Fibroblasten #2 für eine Aktivität des MDR-Promotors in diesen Fibroblasten-Subpopulationen.

In Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen war eine dosisabhängige Zunahme der MDR:Luziferase-Aktivität auf 5,3% bzw. 9,16% der CMV-Aktivität nach Inkubation mit 55ng/ml bzw. 120 ng/ml Doxorubicin zu beobachten (s. Abb.11b), wodurch die Doxorubicin-Responsivität des MDR-Promotors belegt wurde.

Die MDR:Luziferase-Aktivitäten korrelierten in OvCa-Linien, nicht jedoch in MaCa-Linien mit den MDR-Genexpressionsdaten. Für MaCa-Zellen wurde die Hypermethylierung der MDR-Promotorregion beschrieben, die als mögliche Ursache für die negative MDR-Expression in MaCa-Zellen gelten könnte.

3.2 Transduktionelles Targeting: Verbesserung der adenoviralen Infektionsrate

3.2.1 Erhöhung der Infektionsrate durch genetische Fibermodifikationen

Für fortgeschrittene klinische Tumore (Mamma-, Ovarial-, Lungen-, Prostatakarzinom) konnte eine reduzierte Expression des primären adenoviralen Rezeptors CAR gezeigt werden, die eine Resistenz der Tumore gegenüber der adenoviralen Infektion bedingen kann. Die Resistenz der Tumore gegenüber der Infektion mit gängigen Ad5 basierten Vektorsystemen bedeutet eine verminderte adenovirale Gentransferrate, wodurch die Therapieeffizienz der adenoviralen Gentherapie entscheidend reduziert wird. Daher sollte untersucht werden, ob die Infektion von Ovarial- und Mammatumoren durch die Insertion genetischer Modifikationen in die adenovirale Fiber verbessert werden kann. Durch den Vergleich der Infektionsraten von Tumorzellen und Normalgewebszellen sollte darüber hinaus untersucht werden, ob die Spezifität der adenoviralen Infektion für Tumorzellen durch Fibermodifikationen erhöht werden kann.

Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien sowie Normalgewebszellen wurden mit dem Wildtyp-basierten CRAAd Ad5 Δ 24 und Tropismus modifizierten CRAAd-Derivaten (Ad5 Δ 24RGD, Ad5/3 Δ 24) mit Virustitern zwischen 10 und 0,1 VP/Zelle infiziert. Als Vergleichsvirus diente das Wildtyp Adenovirus Serotyp 5 (Ad5Wt), als Negativkontrolle das nicht-replikative Ad5/3CMVLuc. Ad5 Δ 24RGD enthielt zusätzlich das Integrin bindende Peptidmotiv Arginin-Glycin-Aspartat RGD (Ad5 Δ 24RGD) im H1-Loop der Fiber knob-Domäne, wodurch die alternative Bindung des Adenovirus an zelluläre Integrine ermöglicht wird. Bei Ad5/3 Δ 24 wurde die Serotyp 5 Fiber knob Domäne durch die Serotyp 3 knob ersetzt. Durch die Verwendung isogenetischer Ad-Vektoren mit 24 bp Deletion in der CR2-Region des E1A-Gens (Δ 24) konnten Unterschiede in der Adenovirus vermittelten Zytotoxizität direkt auf die Capsidmodifikation und ihre Infektionseffizienz zurückgeführt werden. Die Zytotoxizität wurde durch die Crystal Violet Färbung überlebender Zellen bestimmt.

In 3/5 Ovarialkarzinomzelllinien induzierte Ad5/3 Δ 24 die stärkste Zytotoxizität (SK-OV-3, SK-OV-3 i.p.1, Ov-4) und war damit der Ad5-Fiber und der RGD-Fiberchimäre überlegen (s. Abb.12). Gerade in Ad5 resistenten Ov-4 und SK-OV-3 i.p.1 Zellen konnte die 5/3 Fiberchimäre einen Vorteil bei der Infektionsrate erzielen, der dem RGD vermittelten Infektionsvorteil um den Faktor 10 überlegen war. Auch an primären Ovarialtumoren (primäre OvCa #2, #4) erzielte Ad5/3 Δ 24 eine effiziente Zelllyse, die gegenüber Ad5 Δ 24RGD und Ad5-basierten Vektoren überlegen war (s. Abb.12).

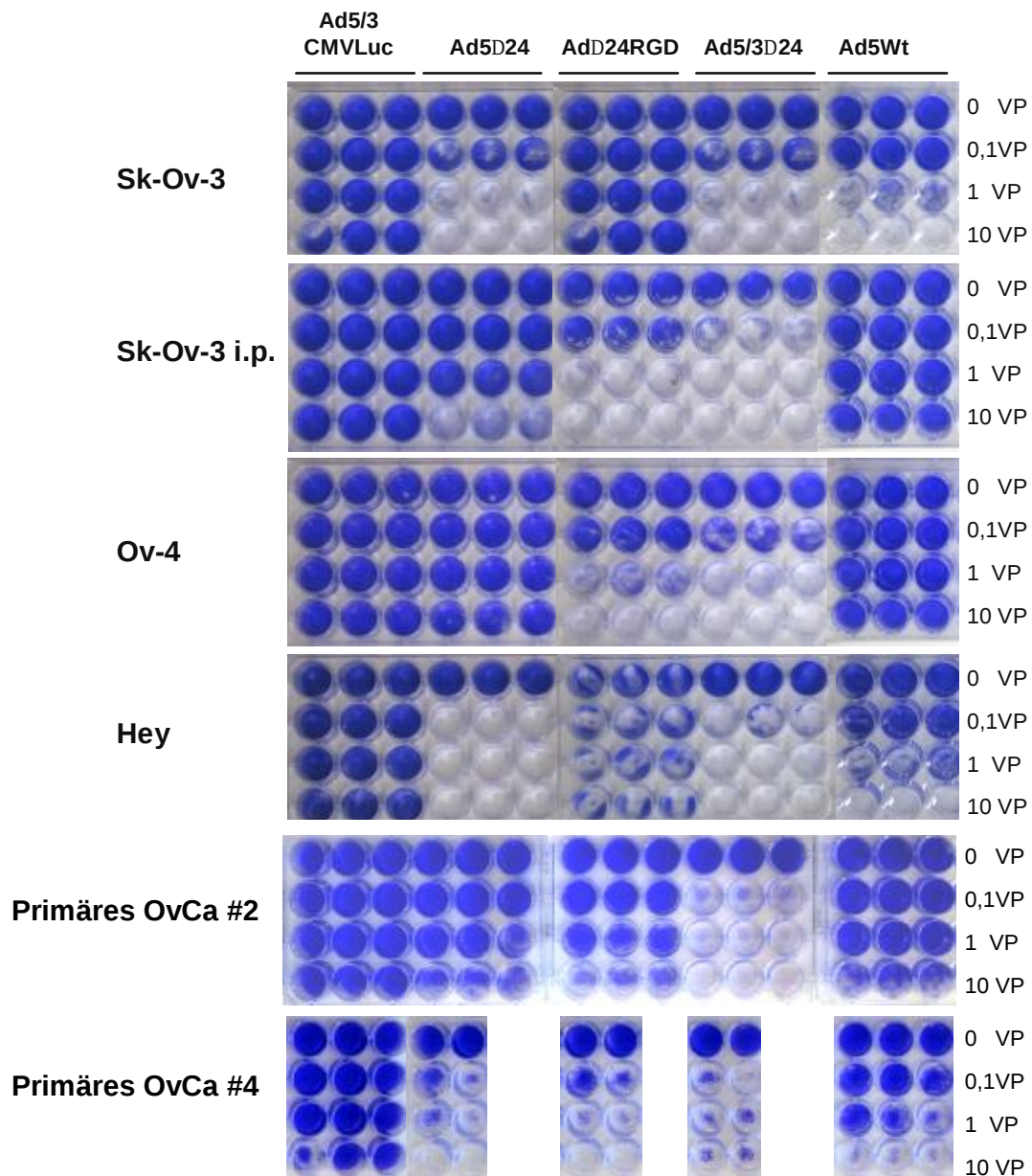


Abb.12 Zytotoxizität von Ad5-Wildtyp (Ad5Wt) und CRAd-Derivaten ohne (Ad5D24) und mit Fibermodifikation (Ad5D24RGD, Ad5/3D24) in OvCa-Zelllinien und primären OvCa-Zellen. Die chimäre Fiber von Ad5D24RGD enthält ein RGD-Peptid im H1 Loop der Ad5 Fiber, Ad5/3D24 enthält eine Ad3 Substitution der Ad5 knob-Domäne, Ad5/3CMVLuc diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit den angegebenen Virustitern infiziert und die überlebenden Zellen dann mit 1% Crystal-Violet angefärbt, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAd-induzierte Zelllyse beobachtet wurde.

In 3/6 MaCa-Zelllinien (ZR-75-1, MDA-MB-231, BT-474) erzielten Ad5-, RGD- und 5/3-Capsidvarianten vergleichbare Zytotoxizitäten (s. Abb.13). In ER-positiven MCF-7 Zellen stellte sich die 5/3 Chimäre als hoch potentes onkolytisches CRAd dar. In BT-20 Zellen erwies sich Ad5Δ24RGD als das CRAd mit stärkster onkolytischer Aktivität. In SK-BR-3 Zellen waren die onkolytischen Aktivitäten von Ad5Δ24RGD und Ad5/3Δ24 vergleichbar und gegenüber der Ad5 Capsid vermittelten Onkolyse um den Faktor 10 erhöht.

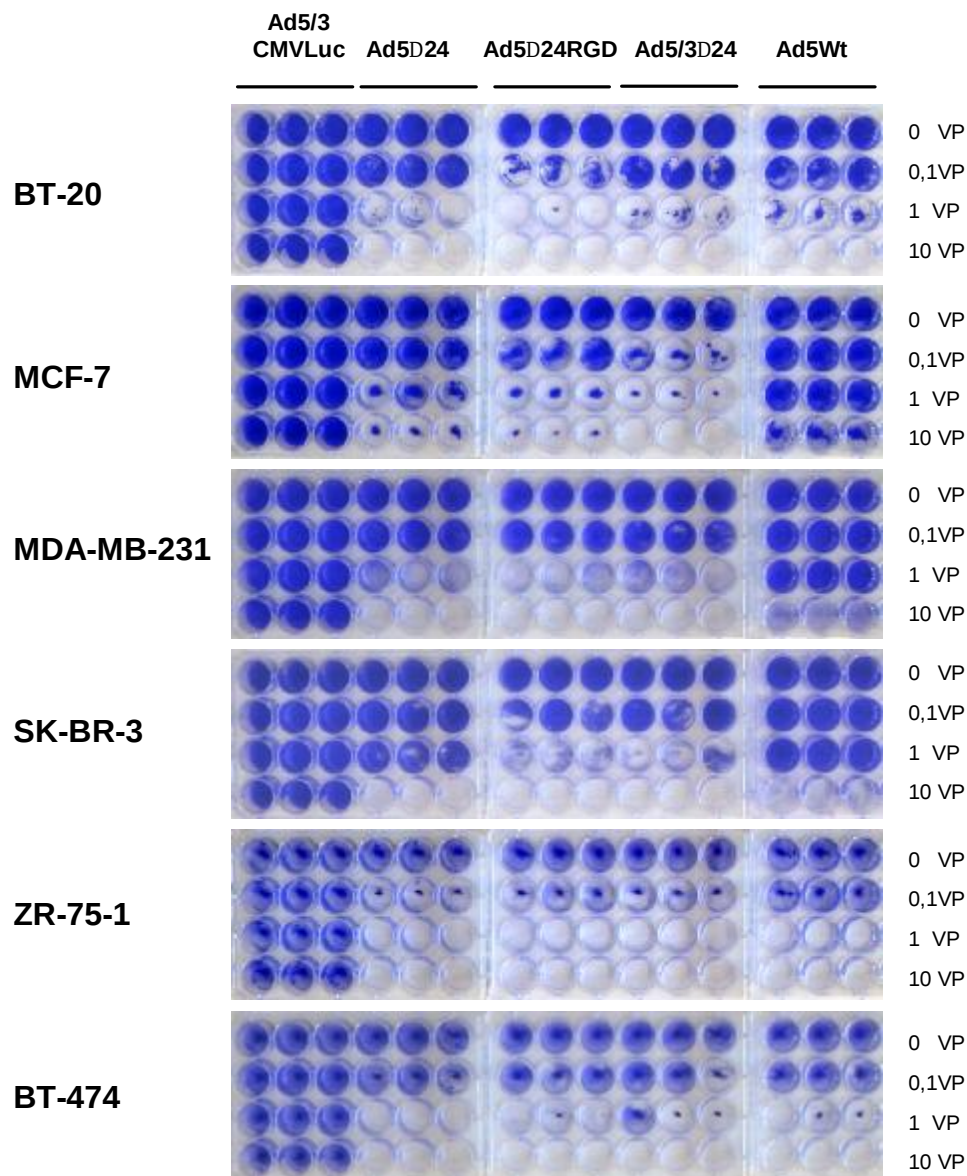


Abb.13 Zytotoxizität von Ad5-Wildtyp (Ad5Wt) und CRAAd-Derivaten ohne (Ad5 Δ 24) und mit Fibermodifikation (Ad5 Δ 24RGD, Ad5/3 Δ 24) in MaCa-Zelllinien. Ad5/3CMVLuc diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit den angegebenen Virustitern infiziert und die überlebenden Zellen dann mit 1% Crystal-Violet angefärbt, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAAd-induzierte Zelllyse beobachtet wurde.

In normalen MCF-12A und primären HMEC Mammaepithelzellen waren die onkolytischen Aktivitäten der 5/3 Fiberchimäre um den Faktor 10 attenuiert in Relation zu Ad5 Δ 24 und Ad5 Δ 24RGD (s. Abb.14). Hingegen induzierten Ad5 Δ 24RGD und Ad5/3 Δ 24 in Ad5 resistenten Fibroblasten stärkere zytopathische Effekte als Ad5Wt-basierte Vektoren, wobei Ad5 Δ 24RGD stärker zytotoxisch als Ad5/3 Δ 24 wirkte (s. Abb.14).

Somit konnte die 5/3 chimäre Fiber als Fibervariante identifiziert werden, die eine hohe Infektion von gynäkologischen Tumorzellen bei gleichzeitig verringerter Infektion von Normalgewebezellen (MCF-12A, HMEC) bewirkte.

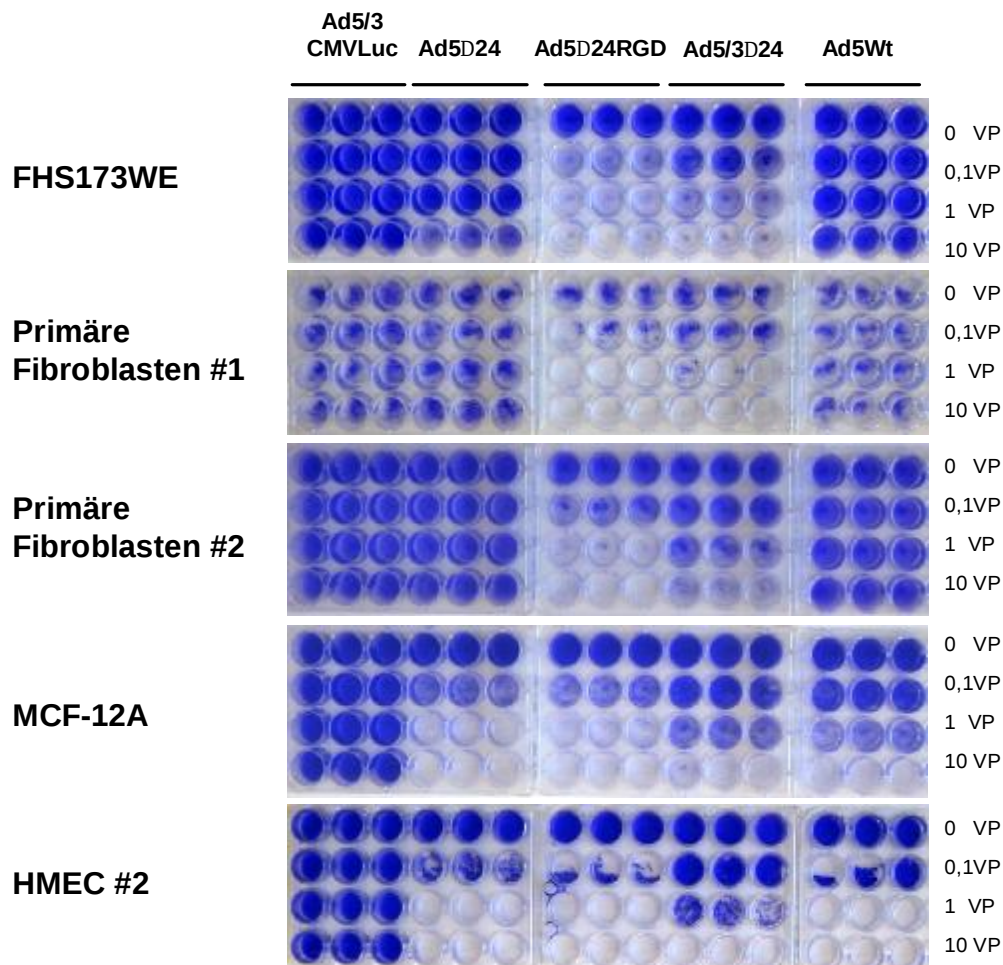


Abb.14 Zytotoxizität von Ad5-Wildtyp (Ad5Wt) und CRAd-Derivaten ohne (Ad5D24) und mit Fibermodifikation (Ad5D24RGD, Ad5/3D24) in Kontrollzellen (MCF-12A, HMEC, Fibroblasten). Ad5/3CMVLuc diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit den angegebenen Virustitern infiziert und die überlebenden Zellen dann mit 1% Crystal-Violet angefärbt, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAd-induzierte Zelllyse beobachtet wurde.

3.2.2 Modulation der Infektionsrate in Doxorubicin-resistenten OvCa-Zellen

Neben der Tumorprogression hat die Behandlung mit zytotoxischen Agenzien einen hohen Einfluss auf die Expression des primären Ad Rezeptors CAR. FACS- und RT-PCR basierte Studien konnten zeigen, dass unter der Gabe von Zytostatika die CAR-Oberflächenexpression auf primären Ovarialkarzinomen zunimmt (Hemminki et al., 2003b), was zu einer Erhöhung des Gentransfers von Ad5 Vektoren führte. In Analogie dazu wurde die Gentransferrate der RGD- und 5/3 Capsid-Modifikationen in Relation zu Ad5-Vektoren in naiven und Doxo-resistenten SK-OV-3 Zellen untersucht (s. Abb.15).

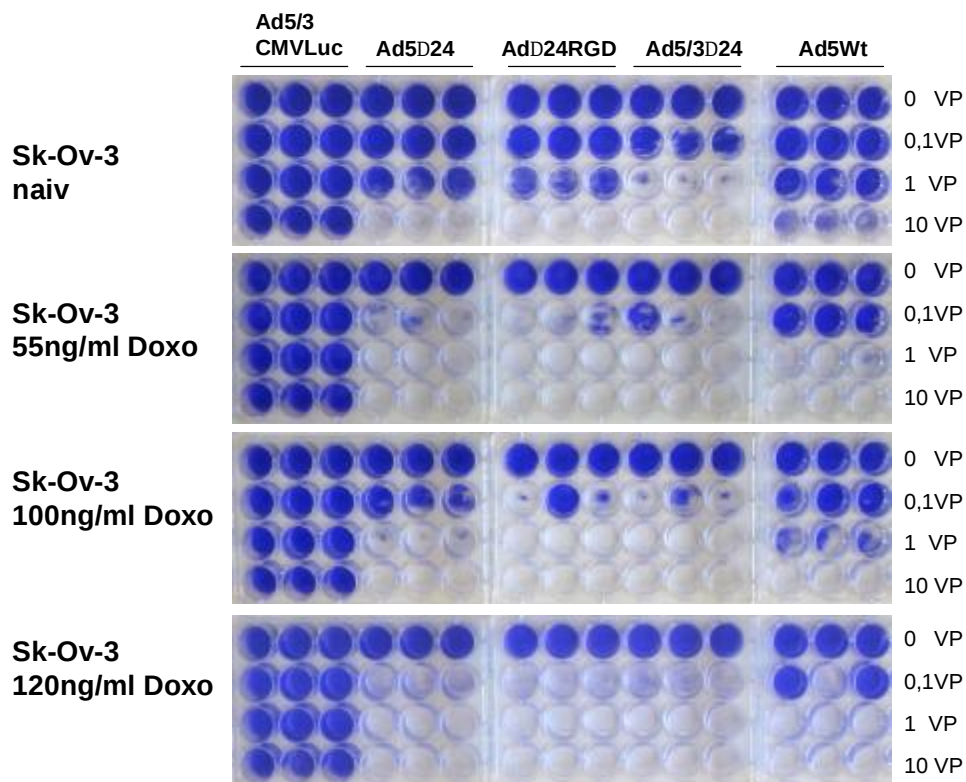


Abb.15 Zytotoxizität von Ad5-Wildtyp (Ad5Wt) und CRAAd-Derivaten ohne (Ad5D24) und mit Fibermodifikation (Ad5D24RGD, Ad5/3D24) in naiven und Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen. Ad5/3CMVLuc diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit den angegebenen Virustitern infiziert und die überlebenden Zellen dann mit 1% Crystal-Violet angefärbt, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAAd-induzierte Zelllyse beobachtet wurde.

Naive SK-OV-3 Zellen sowie Doxorubicin-Resistenzlinien wurden an Tag 1 mit Ad5Wt und Ad5Δ24 sowie mit Capsid-modifizierten CRAAds (Ad5Δ24RGD, Ad5/3Δ24) infiziert und die Zytotoxizität durch eine Crystal Violet Färbung überlebender Zellen an Tag 7 bestimmt. Der Infektionsvorteil der 5/3 Fiberchimäre gegenüber Ad5 Capsid und RGD-Inkorporation in naiven SK-OV-3 Zellen wurde in Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen aufgehoben.

Unter der Gabe von Doxorubicin wurde die Infektion von Adenoviren mit Ad5-Capsid und RGD-Inkorporation evident verbessert, was auf eine mögliche Hochregulation der CAR- und Integrin-Expression unter Chemotherapie deutet. Die Gentransfereffizienz 5/3 Fiberchimärisierter Adenoviren in naiven und chemoresistenten Tumoren blieb konstant und verdeutlichte die CAR-unabhängige 5/3 Infektion.

3.3 Entwicklung und Charakterisierung Fiber-chimärisierter CRAds

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die mammaspezifische Aktivität des ALA-Promotors sowie die Aktivität des MDR-Promotors in chemoresistenten Tumorzellen im Hintergrund adenoviraler Vektoren nachgewiesen (s. 3.1.2). Zudem wurde die erhöhte Infektionsrate der 5/3 Fiberchimäre sowohl bei OvCa- als auch MaCa-Zellen dargelegt (s. 3.2.1).

Um die Effizienz sowie die Spezifität der onkolytischen Gentherapie heraufzusetzen, wurde für die CRAd-Konstruktion eine Kombination aus transduktionellen und transkriptionellen Targeting verwendet (s. Abb.16). Durch den Einsatz 5/3 chimärisierter CRAds sollte eine effiziente Infektion gynäkologischer Tumorzellen erreicht werden. Um toxische Effekte der Virotherapie in gesunden Zellen zu vermeiden, sollte der Kandidatenpromotor die E1A-Expression und damit die adenovirale Replikation auf Tumorzellen beschränken.

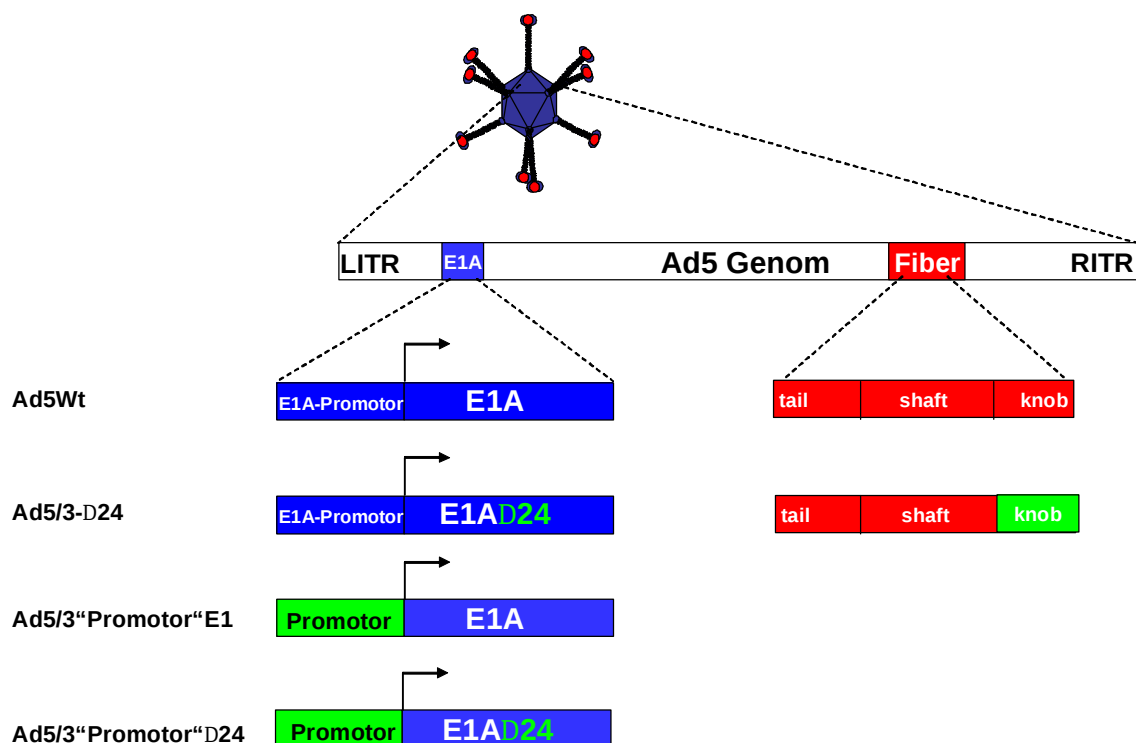


Abb.16 Schematische Darstellung der onkolytischen CRAd-Vektoren

Der adenovirale E1A-Promoter eines 5/3 fiberchimärisierten Adenovirus wurde durch transkriptionsregulatorische Sequenzen des ALA oder MDR1-Gens ersetzt (Typ II CRAds). Ad5/3 Δ 24, Ad5/3ALA Δ 24 und Ad5/3MDR Δ 24 enthalten zusätzlich eine 24 bp Deletion im E1A-Gen (Δ 24), wodurch die CRAd-Replikation in ruhenden Normalgewebszellen verhindert werden sollte (Typ III CRAds). In 5' Richtung des heterologen Promotors befindet sich ein Polyadenylierungssignal (polyA), das eine unspezifische E1A Expression durch eine Transkriptionsinitiation des linken Ad5 ITR verhindern soll.

3.3.1 Klonierung der CRAd-Vektoren

Die Kandidatenpromotoren ALA und MDR wurden mittels PCR unter Verwendung von Primern mit artifiziellen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NotI (5'-Primer) und XhoI (3'-Primer) amplifiziert und in das Plasmid pGem-T-Easy ligiert. Das ALA-Promotorfragment wurde gerichtet über NotI und XhoI in den Transfervektoren pSE1Δ24 kloniert, es resultierte der rekombinante Transfervektor pSALAΔ24. Die Klonierung des MDR-Promotors in die Transfervektoren pSE1 und pSE1Δ24 erfolgte ungerichtet mittels der NotI-Restriktionsendonuklease, die resultierenden Transfervektoren wurden mit pSMDRE1 und pSMDRΔ24 benannt. Die Kandidatenpromotoren wurden über homologe Rekombination in *E. coli* in ein 5/3 pseudotypisiertes Adenovirus-Genom inseriert, indem die rekombinanten Transfervektoren pSALAΔ24, pSMDRE1 oder pSMDRΔ24 mit dem adenoviralen Plasmid pVK500F5/3 in BJ5183-Zellen ko-elektroporiert wurden. Die resultierenden rekombinanten CRAd-Vektoren pAd5/3ALAΔ24, pAd5/3MDRE1 und pAd5/3MDRΔ24 wurden über die Kanamycin-Resistenz selektioniert und mittels Restriktionsanalyse überprüft.

Um eine potentielle Rekombination der E1-Region der rekombinanten CRAds mit der genomischen E1-Region der Verpackungszelllinie 293A zu vermeiden, wurden die rekombinanten CRAd-Vektoren in die Zelllinie A549 transfiziert. 14 bis 28 Tage nach Transfektion wurden vereinzelte Plaques isoliert und eine Amplifikation der CRAd-Klone im kleinen Maßstab durchgeführt. Die resultierenden CRAds Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDRΔ24 und Ad5/3ALAΔ24 wurden mittels PCR hinsichtlich der korrekten Insertion der Promotor:E1A-Region sowie der Fiber-Spezifität analysiert. Ausgehend von einem korrekten CRAd-Klon wurde eine Virusproduktion im großen Maßstab durchgeführt. Die rekombinanten CRAds wurden mittels CsCl-Gradienten aufgereinigt, dialysiert und die viralen Titer bestimmt. Amplifizierte CRAds wurden erneut mittels PCR und Restriktionsanalyse analysiert, um die Modifikationen der adenoviralen Genome sowie die Abwesenheit einer Ad5Wt Kontamination zu verifizieren, bevor sie in funktionelle Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt wurden. Das isogenetische Kontroll-CRAd Ad5/3Δ24 wurde von Dr. A. Kanerva, Universität Helsinki, Finnland, bezogen.

3.3.2 Charakterisierung einer adenoviralen Virotherapie für das MaCa

Aufgrund der mammaspezifischen Aktivität des ALA-Promotors sollte das onkolytische Potential von Ad5/3ALAΔ24 für die Therapie des MaCa untersucht werden. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung sollte die Spezifität einer ALA-regulierten Virotherapie durch Verwendung der E1Δ24-Deletionsvarinate gesteigert werden, wodurch die CRAd-Replikation in ruhenden Normalgewebszellen verhindert wird.

3.3.2.1 ALA-Promotor regulierte E1A-Expression

Da es sich bei ALA um einen Promotor mit geringer Aktivität handelt, wurde zunächst untersucht, ob die transkriptionelle ALA-Aktivität ausreichend ist, um im adenoviralen Vektor die E1A-Expression und damit die Virusreplikation zu induzieren.

BT-20 MaCa-Zellen und Kontrollzellen (HMEC und Fibroblasten) wurden mit Ad5/3ALAA Δ 24 oder Ad5/3 Δ 24 mit 10 VP/Zelle infiziert. Die Zellen wurden über eine Serie von 5 Tagen p.i. fixiert und die E1A-Proteinexpression immunohistochemisch mit dem M73-Antikörper (Dianova) analysiert. In Abbildung Abb. 17 wurden exemplarische Zeitpunkte (Tag p.i.) der E1A-Expression vor Eintritt der vollständigen Zelllyse erfasst.

Das Kontroll-CRA Δ Ad5/3 Δ 24 induzierte in allen getesteten Zellen eine starke E1A-Expression (s. Abb. 17d,e,f), die in BT-20 MaCa-Zellen (Tag 4 p.i.), normalen HMEC-Epithelzellen (Tag 4 p.i.) und Fibroblasten (Tag5 p.i.) in vollständigen Zelllysen resultierte. Im Vergleich zu dem Kontroll-CRA Δ vermittelte der ALA-Promotor eine reduzierte E1A-Expression, die mit der schwachen ALA-Promotoraktivität korrelierte. Nach Infektion mit Ad5/3ALAA Δ 24 wurde eine kontinuierliche Steigerung der E1A-Expression auf 5% (Tag 4 p.i.) der BT-20 MaCa-Zellen (s. Abb. 17c) beobachtet, während die ALA-vermittelte E1A-Expression in Normalgewebszellen (s. Abb. 17a,b) reduziert war (s. Tabelle 2). In MaCa-Zellen führte die ALA-induzierte E1A-Expression zu Zelllysen, während normale Mammaepithelzellen (HMEC) nicht lysiert wurden (s. Abb. 17b,c). Aufnahmen über Tag 4 p.i. hinaus waren nicht möglich, da nach Infektion von BT-20 Zellen mit Ad5/3ALAA Δ 24 an Tag 5 p.i. alle Zellen bereits lysiert waren. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die spezifische Aktivität des ALA-Promotors im CRA Δ -Vektorhintergrund ausreichend ist, um in MaCa-Zellen die CRA Δ -Replikation zu induzieren.

Tabelle 2 Semiquantitative Auswertung der E1A-Expression nach Infektion mit Ad5/3ALAA Δ 24 oder Ad5/3 Δ 24

	Ad5/3ALAA Δ 24				Ad5/3 Δ 24			
	Tag3 p.i.		Tag 5 p.i.		Tag3 p.i.		Tag5 p.i.	
Fibroblasten	1,5*	0,74%	3,2*	1,28%	9,8*	5,2%	116*	60,9%
	Tag 3 p.i.		Tag4 p.i.		Tag3 p.i.		Tag4 p.i.	
HMEC	2*	0,6%	7,3*	1,6%	44,5*	13,9%	Lyse	Lyse
	Tag3 p.i.		Tag4 p.i.		Tag3 p.i.		Tag4 p.i.	
BT-20	8,25*	1,15%	36*	5,0%	51,5*	14,3%	Lyse	Lyse

* Mittelwert E1A-positiver Zellen pro Gesichtsfeld aus 4 unabhängigen Auswertungen

% Prozentsatz E1A-positiver Zellen bezogen aus 4 unabhängigen Auswertungen

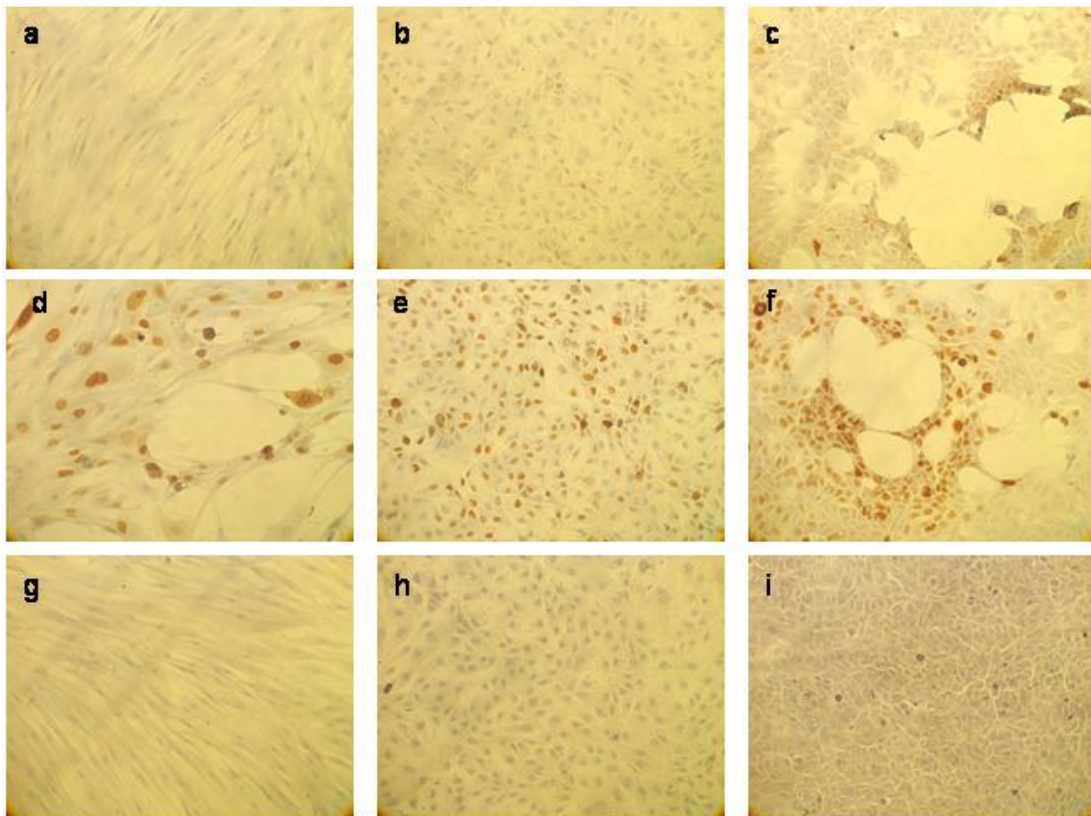


Abb. 17 Immunhistochemie der E1A-Expression nach Infektion von Fibroblasten (a, d, g; Tag 5 p.i.), HMEC (b, e, h; Tag 3 p.i.) und BT-20 Zellen (c, f, i; Tag 3 p.i.) mit Ad5/3ALAD24 (a, b, c), Ad5/3Δ24 (d, e, f) oder mock (g, h, i) infizierter Zellen; 100x Vergrößerung

3.3.2.2 Zytotoxizitätsprofil von Ad5/3ALAD24 in MaCa-Zellen

Die onkolytische Aktivität des ALA-CRAds wurde in MTS-Zytotoxizitäts-Assays untersucht, in die gynäkologische Tumor- und Normalzellen eingesetzt wurden. Für die Analyse der Tumorspezifität wurden die onkolytischen Aktivitäten von Ad5/3ALAD24 mit dem isogenetischen Vergleichsvirus Ad5/3Δ24, das den adenoviralen E1A-Promotor enthält, verglichen.

Vitale MaCa-Zellen wurden mit Ad5/3ALAD24 oder den Kontrollviren Ad5/3Δ24 und Ad5Wt infiziert und die Zellvitalität in Relation zu nicht-infizierten Zellen (0 VP/Zelle) bestimmt. Das E1-deletierte Ad5/3CMVLuc Virus diente als Negativkontrolle.

In allen getesteten MaCa-Linien konnten durch Ad5/3ALAD24 onkolytische Effekte bei höchster Viruslast (10 VP/Zelle) induziert werden (s.Abb.18). Dabei waren die induzierten onkolytischen Effekte der Kontrollviren dem ALA-CRAD jeweils überlegen. Eine maximale Onkolyse von 77,7% wurde durch Ad5/3ALAD24 in ER-negativen SK-BR-3 Zellen erzielt. Damit korrelierte die ALA-Expression in SK-BR-3 Zellen mit der onkolytischen Aktivität des ALA-CRAds.

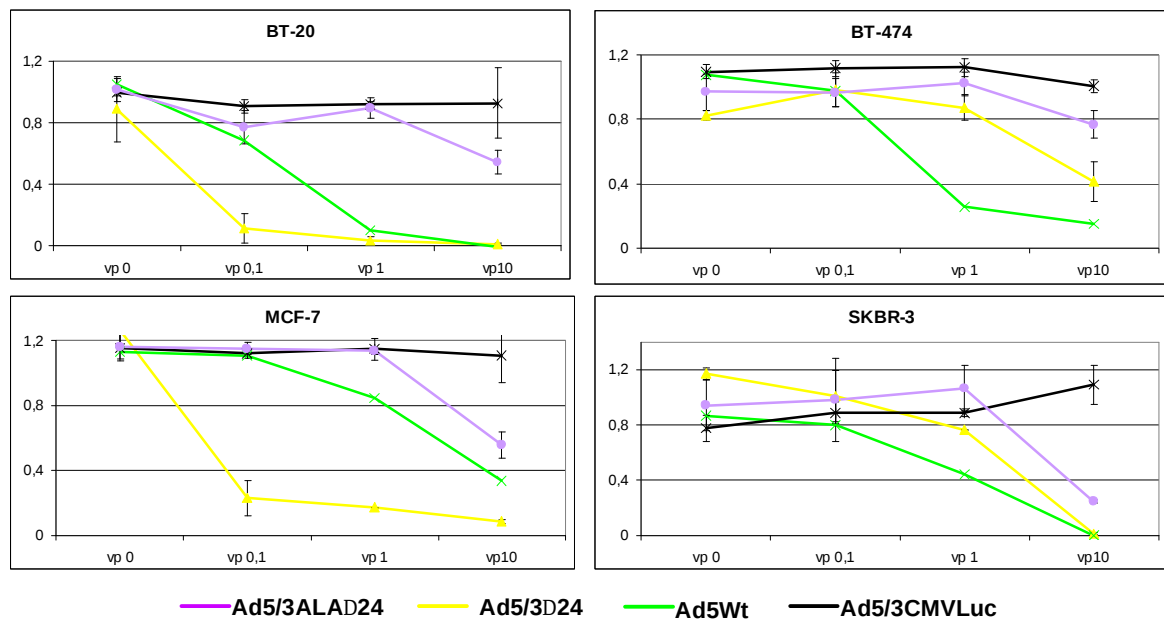


Abb.18 Ad5/3ALAD24, Ad5/3D24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in MaCa-Zelllinien. Nach der Infektion mit den angegebenen Virustitern wurde die Zellvitalität der verschiedenen Ansätze dann im MTS-Assay bestimmt, wenn bei 0,1 VP/Zelle 50% der Zellen lysiert waren. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten +/- Standardabweichung dargestellt

Bei der Analyse primärer Tumorzellen konnte in 1/3 primären MaCa-Proben eine onkolytische Aktivität von Ad5/3ALA24Δ nachgewiesen werden (s.Abb.19). Im Vergleich zu Ad5/3CMVLuc wurden durch Ad5/3ALAΔ24 38,8% der primären Tumorzellen lysiert (primäres MaCa #2). Die höhere Zytotoxizität von Ad5/3Δ24 in 2/3 der primären Proben gegenüber Ad5Wt verweist auf das Potential der 5/3 Fiberchimäre bei der effizienten Infektion von primären MaCa-Zellen. Da die Menge des primären Tumormaterials limitierend ist, reichte die Anzahl der primären Tumorzellen nicht aus, um parallel die ALA-Expression in den primären Tumoren zu bestimmen.

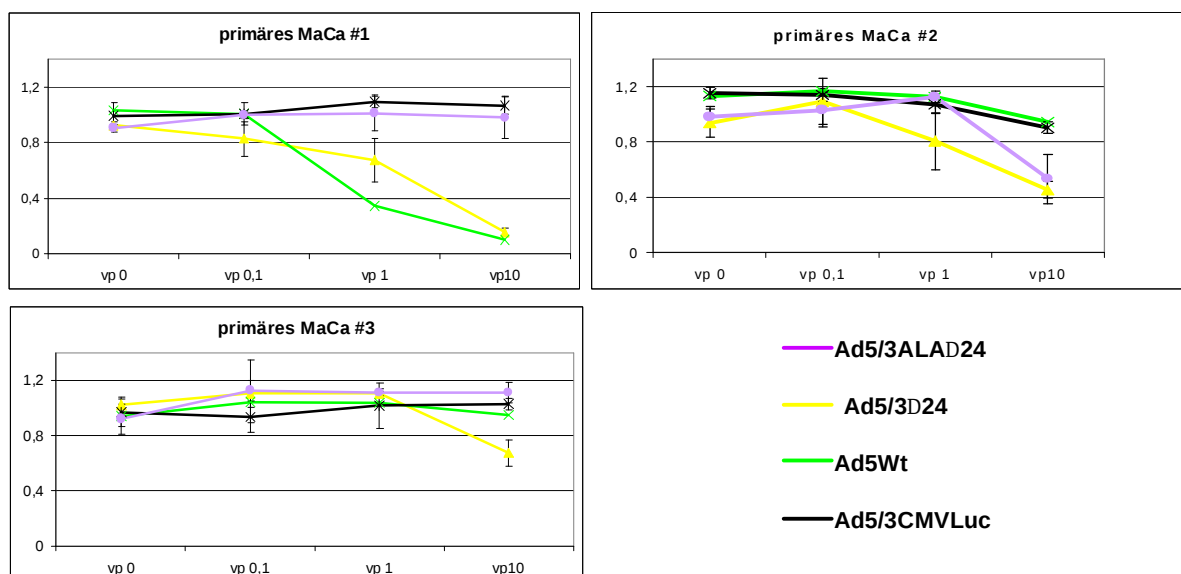


Abb.19 Ad5/3ALAD24, Ad5/3D24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in primären MaCa-Zellen nach Infektion mit den angegebenen Virustitern. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten +/- Standardabweichung dargestellt.

3.3.2.3 Zytotoxizitätsprofil von Ad5/3ALAD24 in Normalgewebe

Die Toxizität der ALA-Promotor kontrollierten CRAd-Replikation auf Normalgewebszellen wurde in Fibroblasten und benignen Mammaepithelzellen (MCF-12A, HMEC) untersucht. Während Ad5/3Δ24 in allen Kontrollzellen Zytotoxizitäten induzierte, wurden in etablierten HFBC Zellen, primären Fibroblasten und MCF-12A Zellen durch Ad5/3ALAD24 keine zytotoxischen Effekte induziert (s.Abb.20). Lediglich in HMEC Zellen verursachte Ad5/3ALAD24 bei einem Titer von 10 VP/Zelle eine Zytotoxizität von 31,7%, die jedoch in Relation zu Ad5/3Δ24 und Ad5Wt abgeschwächt war.

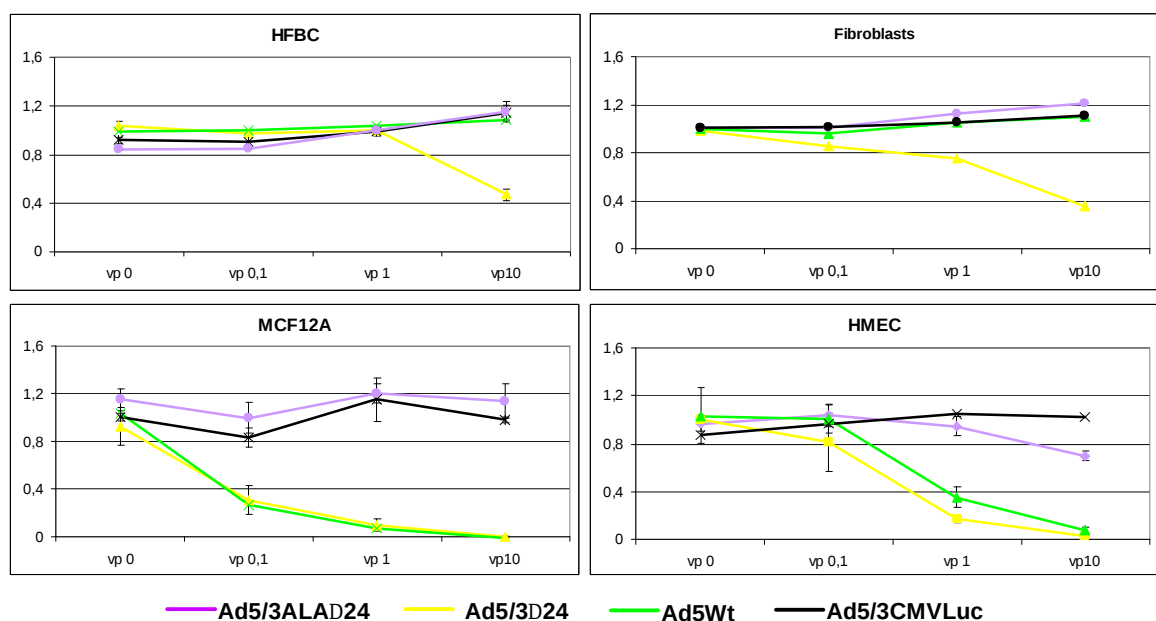


Abb.20 Ad5/3ALAD24, Ad5/3D24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in Kontrollzellen nach Infektion mit den angegebenen Virustitern. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten +/- Standardabweichung dargestellt

Der Vergleich mit Ad5/3Δ24 belegte die Tumorspezifität von Ad5/3ALAD24. Aufgrund der hohen Selektivität des ALA-Promotors konnten zytotoxische Effekte auf Normalgewebszellen im Vergleich zu Ad5/3Δ24 minimiert werden. Darüber hinaus korrelierten die ALA-CRAd induzierten Zytotoxizitäten mit den ALA-Expressionsdaten. Eine Ausnahme bildeten MCF-12A Zellen, die trotz positiver ALA-Expression nicht durch Ad5/3ALAD24 lysiert wurden.

3.3.2.4 Analyse der spezifischen Replikation von Ad5/3ALAD24

Mittels Western-Blot-Analyse sollte überprüft werden, ob die gemessenen Zytotoxizitäten nach Infektion mit Ad5/3ALAD24 mit der CRAd-Replikation korrelierten. Das späte adenovirale Fiberprotein wird während des finalen Schrittes des adenoviralen Replikationszyklus exprimiert, so dass über die Detektion des Fiberproteins der Nachweis der adenoviralen Replikation möglich ist. MaCa- und

Kontrollzellen wurden mit CRAds (100 VP/Zelle) infiziert und die Zellen 48h später lysiert. Das Fiberprotein wurde mittels des 4D2-Antikörpers (Dianova) nachgewiesen. In der Western-Blot-Analyse wurden monomere 5/3 chimäre Fiberproteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von 65kDa detektiert. Die Ad5 Fiber des Ad5Wt Capsids fiel mit einem apparenten Molekulargewicht von 63kDa kleiner aus. β -Aktin diente als interner Standard und wurde zusammen mit dem Fiberprotein in einem Detektionsansatz nachgewiesen. Die Replikationseffizienz (Menge der detektierten Fiberproteine) von Ad5/3ALA Δ 24, wurde mit den Positivkontrollen Ad5/3 Δ 24 und Ad5Wt verglichen. Das nicht-replikative Ad5/3CMVLuc diente als Negativkontrolle.

Ad5/3ALA Δ 24 konnte in SK-BR-3 und MCF-7 MaCa-Zellen effizient replizieren, während die Tumorspezifität des ALA-CRAds durch die verminderte Replikation in Normalgewebszellen (MCF-12A, Fibroblasten #2) bestätigt wurde. Die Unterdrückung der ALA-CRAd-Replikation in primären Fibroblasten wurde durch die Abwesenheit der Fiberbande nach Ad5/3ALA Δ 24 Infektion nachgewiesen. In Übereinstimmung mit dem Zytotoxizitätsprofil von Ad5/3ALA Δ 24 konnte hiermit die tumorspezifische Replikation des ALA-CRAds nachgewiesen werden.

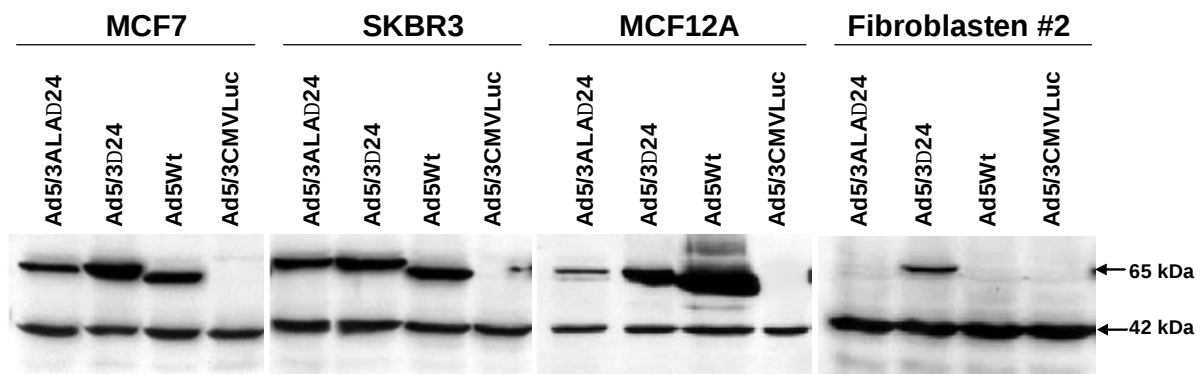


Abb.21 Spezifische Expression des Fiberproteins nach Ad5/3ALAD24-Infektion von MaCa- (MCF-7, SK-BR-3) und Normalzellen (MCF-12A, primäre Fibroblasten #2). Ad5/3D24 und Ad5Wt dienten als Positivkontrolle, Ad5/3CMVLuc als Negativkontrollen. Das Ad Fiberprotein wurde im Immunoblot unter Verwendung des 4D2-Antikörpers detektiert.

3.3.2.5 Analyse der Tumorspezifität von Ad5/3ALAD24

In einem Kokulturmodell, in dem Mammaepithelzellen und Stromazellen simultan kultiviert wurden, sollte die tumorspezifische Replikation von Ad5/3ALA Δ 24 im Zellverband getestet werden. Benignes Brustgewebe wurde durch die Kokultur von HMEC und Fibroblasten (HMEC/Fibroblasten) nachgestellt, malignes Brustgewebe durch die Kokultur der MaCa-Zelllinie BT-20 mit Fibroblasten (BT-20/Fibroblasten). Die Zellspezifität wurde immunhistochemisch über eine Fibroblasten-spezifische Vimentin-Antikörper- bzw. über eine Mammaepithelzell-spezifische Keratin-Antikörper-Färbung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Kokulturen wurden mit CRAd-Vektoren (10 VP/Zelle) infiziert und die E1A-Expression zum Nachweis der CRAd-Replikation nach 6 Tagen bestimmt (s.Abb.22).

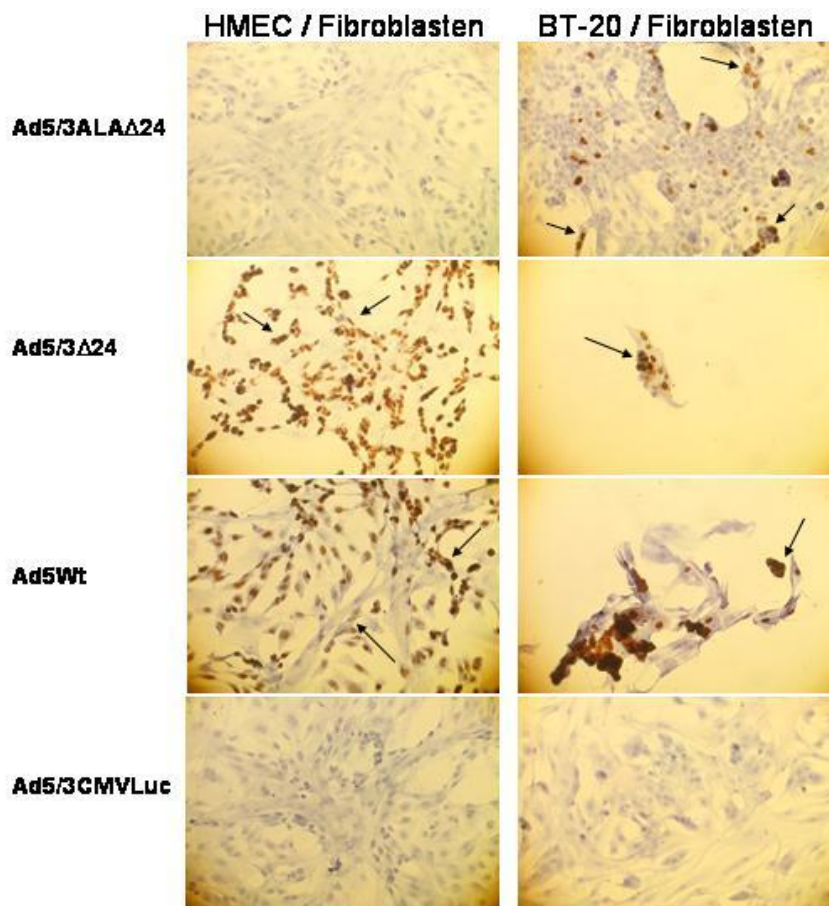


Abb.22 MaCa-selektive Replikation von Ad5/3ALAD24 im Kokulturmodell. Um die selektive Zytotoxizität von Ad5/3ALAD24 in MaCa-Zellen, aber nicht in umliegenden Normalgewebszellen (HMEC, Fibroblasten) zu demonstrieren, wurden Kokulturen aus BT-20/Fibroblasten und HMEC/Fibroblasten mit Ad5/3ALAD24, Ad5/3Δ24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc infiziert und das E1A-Protein zum Nachweis der Ad-Replikation immunhistochemisch angefärbt. In der Kokultur bilden Fibroblasten spindelförmige Strukturen aus, die zwischen kopfsteinpflasterartige Monolayer aus gesunden (HMEC) oder karzinogenen (BT-20) Epithelzellen eingebettet sind. Das Kokulturmuster wurde nach der Infektion mit Ad5/3CMVLuc bewahrt, während die Replikation von Ad5/3Δ24 und Ad5Wt in allen Zellen nachgewiesen wurde. Die Replikation von Ad5/3ALAD24 erfolgte selektiv in BT-20 MaCa-Zellen

Die Sensitivität beider Kokulturtypen gegenüber der Ad5/3Δ24 vermittelten Zelllyse wurde durch die onkolytische Aktivität von Ad5/3Δ24 bestätigt. Die effiziente Replikation von Ad5Wt in karzinogenen (BT-20) und gesunden (HMEC) Epithelzellen wurde durch die intensive E1A-Färbung im Zellkern verdeutlicht. Jedoch zeigte Ad5Wt eine verminderte Replikation in CAR-negativen Fibroblasten. Im Vergleich zu den Kontrollviren Ad5/3Δ24 und Ad5Wt replizierte Ad5/3ALAD24 spezifisch in BT-20 MaCa-Zellen. Nach Infektion mit Ad5/3ALAD24 wurde die ALA-Promotor induzierte E1A-Expression in karzinogenen BT-20 Zellen, nicht aber in normalen HMEC und Fibroblasten nachgewiesen. Das Auftreten des CPE-Effektes als Folge der CRAd-Replikation konnte die onkolytische Potenz von Ad5/3ALAD24 in Mammakarzinomzellen aufzeigen.

3.3.3 Charakterisierung einer CRAd-Virotherapie für fortgeschrittene Karzinome

Die Rationale einer induzierbaren Virotherapie für Zytostatika-resistente Tumore basiert auf der Chemo-Responsivität des MDR-Promotors, die unter 3.1.2.4 demonstriert wurde. Im Folgenden wurde das Potential der CRAd-Vektoren Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 für die Virotherapie fortgeschrittener chemoresistenter OvCa untersucht. Die E1A Δ 24-Deletionsvariante repräsentiert für die klinische Anwendung einen zusätzlichen Sicherheitsaspekt, da die adenovirale Replikation in ruhenden Normalgewebszellen unterbunden wird. Andererseits belegen Studien, dass die zytotoxische Eigenschaft des E1A Δ 24-Proteins im Vergleich zu intaktem E1A-Protein reduziert ist. Im Folgenden wurden die zytotoxischen Aktivitäten des einfach modifizierten (Ad5/3MDRE1) und des doppelt modifizierten MDR-CRAds (Ad5/3MDR Δ 24) im Vergleich zu dem isogenetischen Vergleichs-CRAd Ad5/3 Δ 24 analysiert.

3.3.3.1 Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in OvCa-Zellen

Für die Analyse der basalen onkolytischen Aktivität wurden zunächst unbehandelte OvCa-Zelllinien mit Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 infiziert (0,1 bis 10 VP/Zelle) und die Zellvitalität im MTS-Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Ad5/3 Δ 24 diente als isogenetisches Vergleichs-CRAd, Ad5Wt als Positivkontrolle und das nicht-replikative Ad5/3CMVLuc als Negativkontrolle.

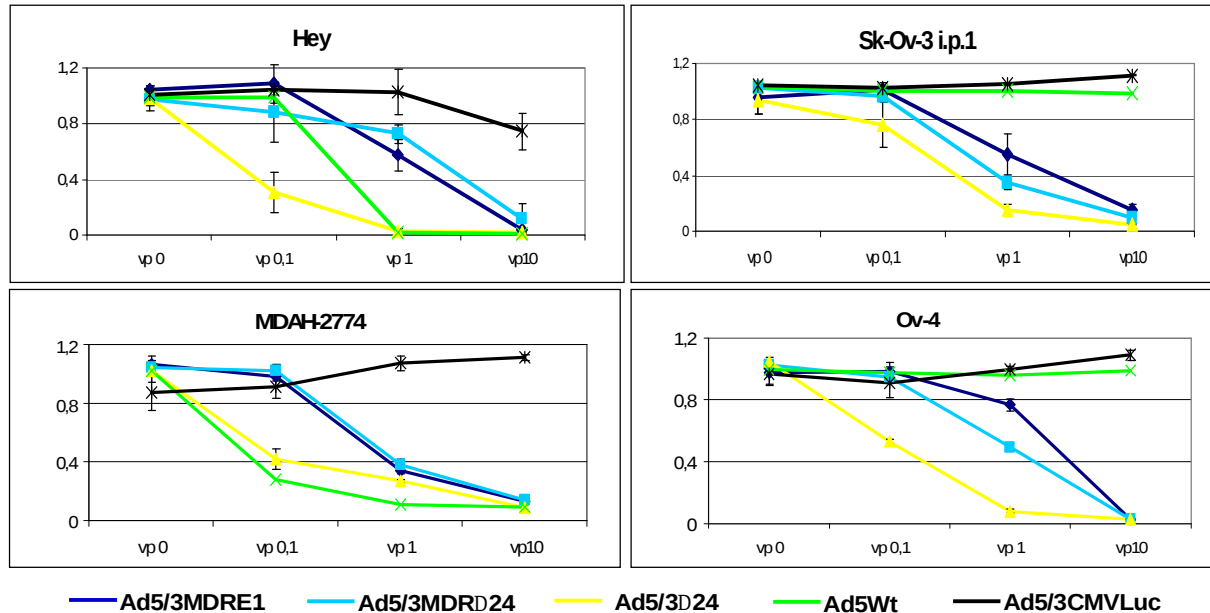


Abb. 23 Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDR Δ 24, Ad5/3 Δ 24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in OvCa-Zellen. Nach der Infektion mit den angegebenen Virustitern wurde die Zellvitalität im MTS-Assay bestimmt, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAd-induzierte Zellyse zu beobachten war. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

In OvCa-Zelllinien waren die induzierten Zytotoxizitäten von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 miteinander vergleichbar (s. Abb. 23), im Vergleich zu Ad5/3 Δ 24 jedoch schwächer ausgeprägt.

MDAH-2774 Zellen mit basaler MDR-Promotorexpression wurden am effizientesten durch die MDR-CRAds lysiert.

3.3.3.2 Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in Normalgewebe

Die Toxizität der MDR-Promotor vermittelten Onkolyse in Normalgewebe wurde im MTS-Zytotoxizitäts-Assay analysiert (s. Abb.24). In Fibroblasten induzierten Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 deutlich höhere Zytotoxizitäten als das Kontrollvirus Ad5/3 Δ 24. In etablierten MCF-12A Zellen, primären HMECs und Keratinozyten waren die MDR-Promotor vermittelten onkolytischen Aktivitäten im Vergleich zu Ad5/3 Δ 24 reduziert. Die Verwendung der Δ 24-Deletionsvariante konnte die MDR-Promotor vermittelte Zelllyse in HMEC und HepG2 Zellen, die zum Nachweis der Toxizität in Epithel- bzw. Leberzellen eingesetzt wurden, abschwächen.

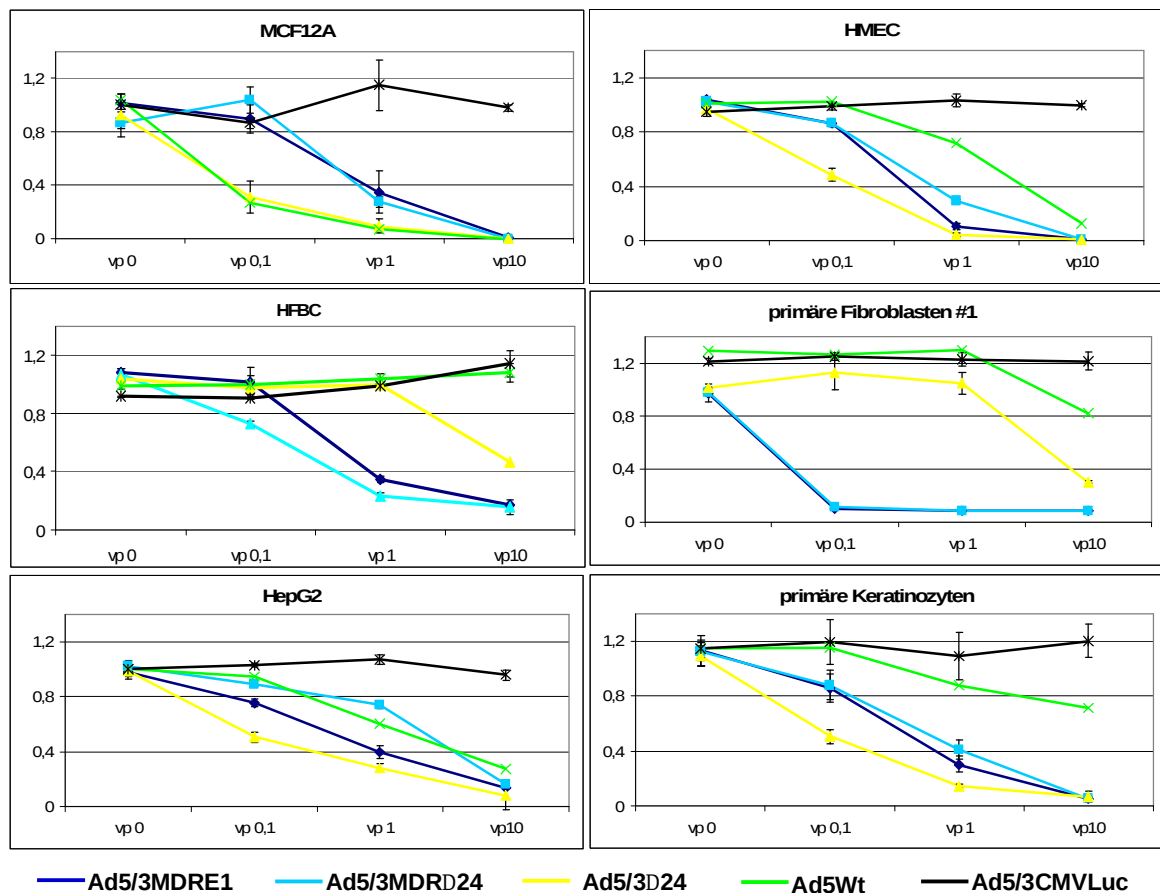


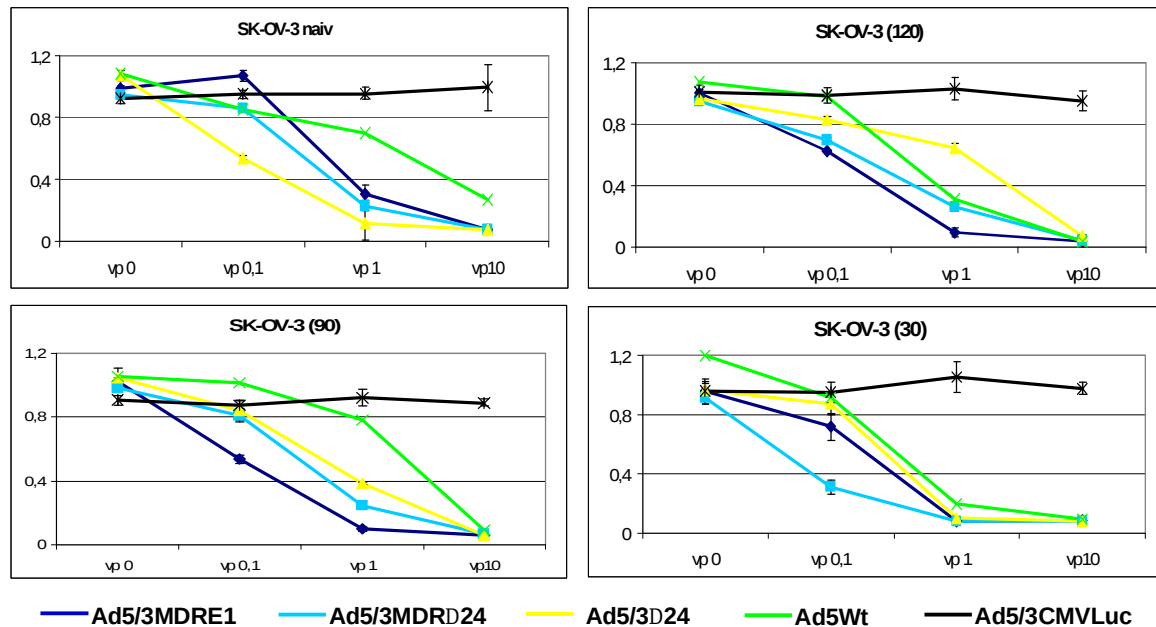
Abb.24 Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDR Δ 24, Ad5/3 Δ 24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in Kontrollzellen nach Infektion mit den angegebenen Virustitern. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

3.3.3.3 Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in chemoresistenten OvCa-Zellen

Die MDR-Promotor induzierte Onkolyse sollte in chemoresistenten SK-OV-3 Tumorzellen im Vergleich zu naiven SK-OV-3 Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde 7 Tage nach Infektion mit Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDR Δ 24, Ad5/3 Δ 24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc die Zellvitalität von parentalen und Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen im MTS-Zytotoxizitäts-Assay und Crystal-Violet-Assay bestimmt. In naiven SK-OV-3 Zellen wurden die höchsten Zytotoxizitäten von

Ad5/3Δ24 induziert. In Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen überstiegen Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDRΔ24 jedoch die onkolytischen Potenzen der Kontrollviren Ad5/3Δ24 und Ad5Wt (s. Abb.25). In Relation zu beiden MDR-CRAbs erforderte Ad5/3Δ24 einen 10fach erhöhten Virustiter, um in chemoresistenten SK-OV-3 Zellen eine vergleichbare Onkolyse zu induzieren (s. Abb.25b). Die Ad5-Resistenz naiver SK-OV-3 Zellen wurde in Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen aufgehoben, so dass die Ad5Wt vermittelte Onkolyse in Doxo-Resistenzzellen schließlich das Niveau der Ad5/3Δ24 vermittelten Onkolyse erreichte.

a



b

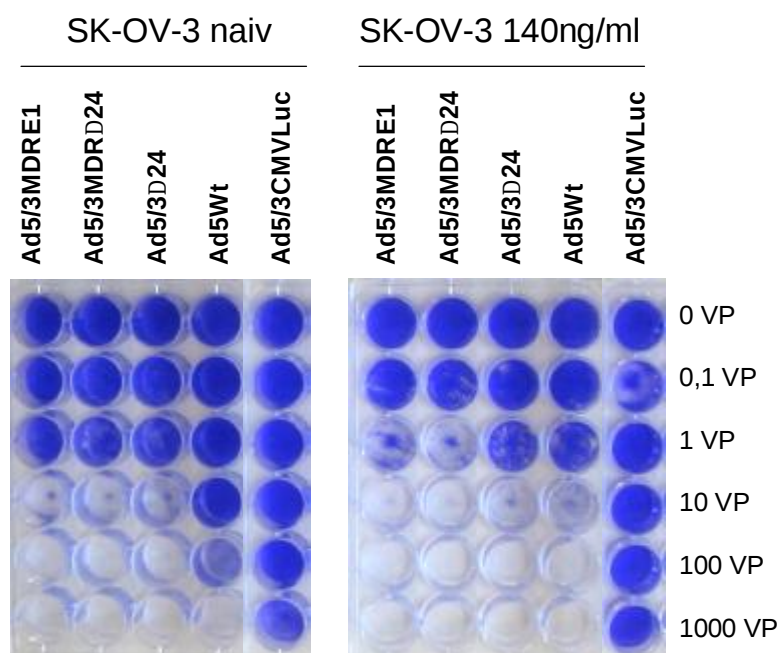


Abb.25 Induktion der onkolytischen Aktivität von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDRΔ24 in Doxo-Resistenzlinien. Nach der adenoviralen Infektion wurde die Zellvitalität nach 7 Tagen bestimmt. a) Die relative Zellvitalität (y-Achse) im MTS-Assay b) Crystal-Violet-Färbung der Zellen, wenn bei 0,1 VP/Zelle eine CRAbs-induzierte Zelllyse beobachtet wurde

Diese Ergebnisse bestätigen die Aktivierung der MDR-Promotor vermittelten Zytotoxizität in chemoresistenten Tumorzellen. Aufgrund der MDR-Promotor-Aktivierung in Doxo-Resistenzlinien wurden onkolytische Effizienzen erzielt, die der E1A-Promotor induzierten Onkolyse von Ad5/3Δ24 überlegen waren.

3.3.3.4 Analyse der Replikationseffizienz der MDR-CRAds

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die erhöhte onkolytische Aktivität der MDR-CRAds in Doxo-Resistenzzellen mit einer erhöhten viralen Replikationsrate einherging.

Naive und Doxorubicin-resistente SK-OV-3 Zellen wurden mit den korrespondierenden Adenoviren infiziert (10 VP/Zelle) und für 48h inkubiert. Die Analyse der Replikationseffizienz erfolgte mittels Western-Blot durch die Detektion des späten Fiberproteins sowie durch die Analyse der produzierten Virustiter im TCID-Assay.

Bei der morphologischen Bewertung zum Zeitpunkt der Zellernte verursachten beide MDR-CRAds in Doxorubicin-Resistenzzellen einen offensichtlichen CPE, während das Vergleichs-CRAAd Ad5/3Δ24 keinen CPE induzierte. Hingegen konnte in naiven SK-OV-3 Zellen nur bei Ad5/3Δ24 ein deutlicher CPE beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ließ eine erhöhte virale Replikation in chemoresistenten SK-OV-3 Zellen vermuten.

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen inklusive Überstand geerntet und Proteinlysate hergestellt. Die adenovirale Replikation wurde im Immunoblot durch die Detektion des späten adenoviralen Fiberproteins über den 4D2-Antikörper (Dianova) bestimmt. Je 10µg Gesamtprotein wurden in einem Ansatz auf die Fiber- und β-Aktin-Expression (interner Standard) untersucht. Bei der Detektion der Fiberexpression wurde keine Veränderung der Replikationsrate von Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDRΔ24 und Ad5/3Δ24 in naiven SK-OV-3 und Doxorubicin-resistenten SK-OV-3(155) Zellen beobachtet (s. Abb.26). In Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen wurde lediglich die Infektions- und Replikationseffizienz von Ad5Wt erhöht. Die Replikationseffizienz von Ad5/3MDRE1 war in Relation zu Ad5/3MDRΔ24 und Ad5/3Δ24 leicht erhöht. Für das E1-deletierte Ad5/3CMVLuc wurde keine Fiberexpression detektiert.

Demnach konnte eine Induktion der MDR-CRAAd-Replikation in Doxorubicin-resistenten OvCa-Zellen nicht nachgewiesen werden.

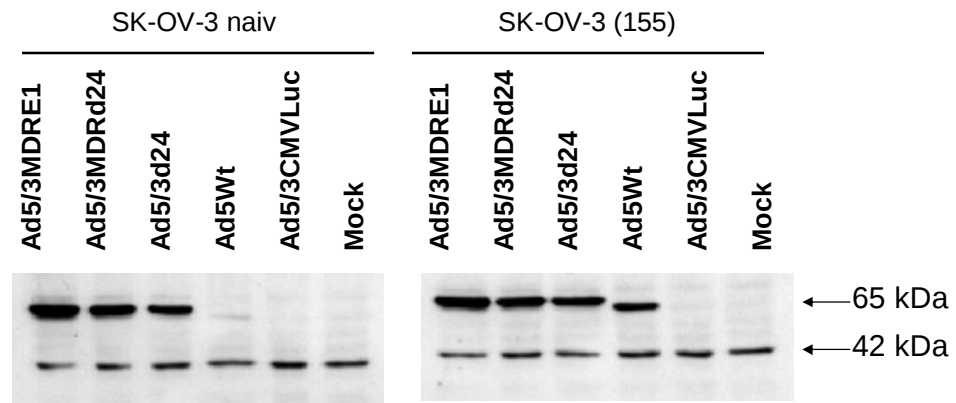


Abb.26 Analyse der CRAd-Replikation in naiven SK-OV-3 und Doxo-Resistenzlinien SK-OV-3(155) nach Infektion mit Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDRd24, Ad5/3d24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc (10 VP/Zelle) an Tag 2 p.i. Detektion des Fiberproteins im Immunoblot.

Ein weiteres Kriterium der onkolytischen Effizienz stellen die Produktion infektiöser Adenoviren sowie die Freisetzung der adenoviralen Partikel aus infizierten Zellen dar. Um die Virionproduktion und -entlassung zu quantifizieren, wurden naive sowie Doxorubicin-resistente SK-OV-3 Zellen mit Adenoviren (10 VP/Zelle) infiziert und an 6 aufeinander folgenden Tagen virusinfizierte Zellen einschließlich Zellüberstand geerntet. Der Titer produzierter Adenoviren wurde im TCID-Assay durch die Infektion von 293A Zellen bestimmt (s. Abb.27).

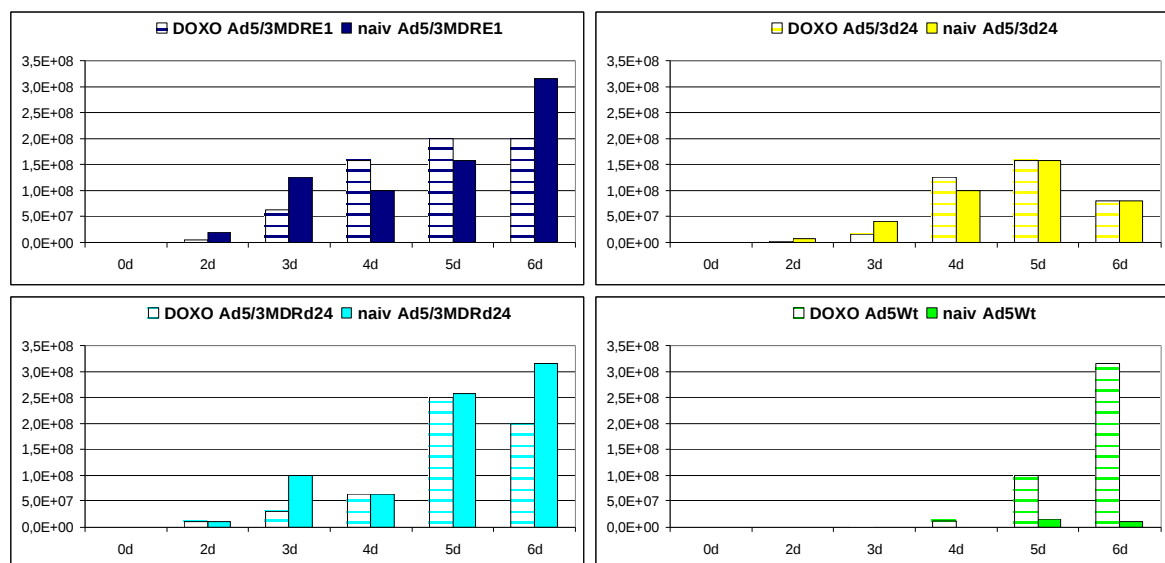


Abb.27 Bestimmung der produzierten Virustiter im TCID-Assay. Naive und resistente SK-OV-3 Zellen wurden mit Ad Vektoren infiziert (10 VP/Zelle) und an 6 aufeinander folgenden Tagen die viralen Titer der infizierten Zellen bestimmt. Dargestellt wurden Mittelwerte aus 2 Experimenten.

Während der 6-tägigen Inkubation wurde eine zunehmende Produktion infektiöser Adenoviren bestätigt, wodurch die Amplifikation der Virionenzahl einschließlich Virionenfreisetzung belegt wurde. Die Reduktion der Virionenproduktion an Tag 6 war auf die vollständige Zelllyse infolge der Virusreplikation zurückzuführen. Es konnte keine eindeutige Steigerung der MDR-CRAd-Replikationsrate in Doxo-Resistenzzellen nachgewiesen werden. Lediglich Ad5Wt verfügte infolge

der verbesserten Ad5 Infektion in chemoresistenten Tumorzellen über eine erhöhte Replikationseffizienz. Damit stand in Doxorubicin-Resistenzellen die marginal erhöhte Replikationsrate von Ad5/3MDRE1 im Gegensatz zu der hohen onkolytischen Aktivität. Weiterführende Analysen sind notwendig, um den Mechanismus der onkolytischen Aktivität der MDR-CRAds in Doxo-Resistenzellen aufzuklären.

3.3.3.5 Zytotoxizitätsprofil der MDR-CRAds in chemoresistenten Primärtumoren

Die Eignung MDR-Promotor kontrollierter CRAds als Therapieoption für chemoresistente Tumore wurde an unpassagierten primären Tumorzellen überprüft, die aus soliden Tumoren, Aszites oder Pleuraerguß von Patientinnen nach Polychemotherapie isoliert wurden. Da Anthrazykline (Doxorubicin) und Taxane (Taxol) potente Induktoren der MDR1-vermittelten Chemoresistenz sind, wurde zunächst die Resistenz der primären Tumorzellen gegen Doxorubicin und/oder Taxol bestätigt. Anschließend wurden die chemoresistenten Tumorzellen im MTS-Zytotoxizitäts-Assay auf die CRAd-induzierten Zytotoxizitäten untersucht (s. Abb.28).

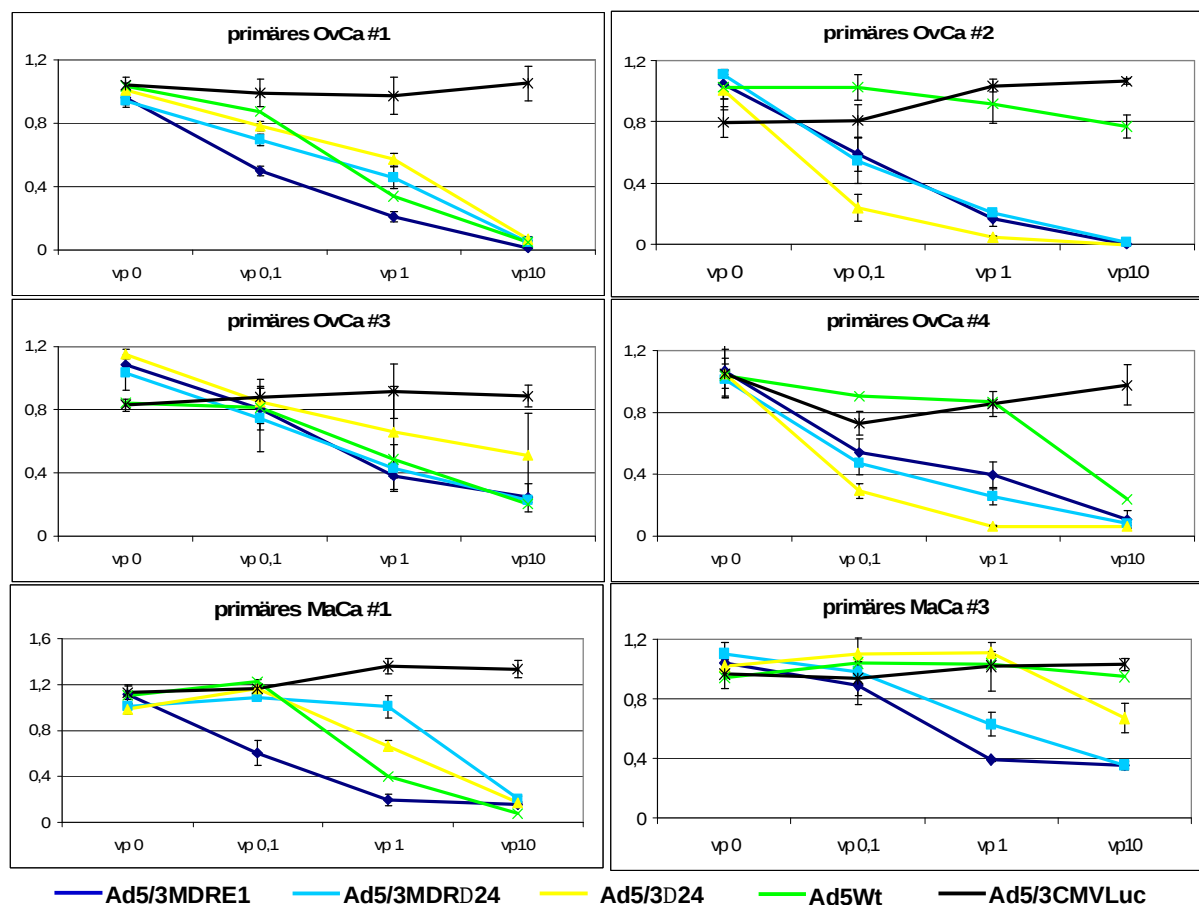


Abb.28 Ad5/3MDRE1, Ad5/3MDRD24, Ad5/3D24, Ad5Wt und Ad5/3CMVLuc induzierte Zytotoxizität in primären chemoresistenten OvCa- und MaCa-Zellen. Nach der Infektion mit den angegebenen Virustitern wurde die Zellvitalität dann im MTS-Assay bestimmt, wenn bei 0,1 VP/Zelle 50% der Zellen lysiert waren. Die relative Zellvitalität (y-Achse) wurde als Mittelwert aus 3 Experimenten +/- Standardabweichung dargestellt.

Die MDR-Promotoraktivität führte in chemoresistenten primären Tumorzellen (OvCa-Proben #1 und #3, MaCa-Proben #1 und #3) zu onkolytischen Aktivitäten, die die Zytotoxizitäten der potenten natürlichen adenoviralen E1A-Promotor kontrollierten Adenoviren, Ad5/3 Δ 24 und Ad5Wt, deutlich überstiegen. In OvCa-Proben waren die onkolytischen Aktivitäten von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 vergleichbar, wohingegen Ad5/3MDRE1 in MaCa-Proben eine stärkere Effizienz erzielte. Der Vergleich der MDR-CRAbs mit dem isogenetischen Vektor Ad5/3 Δ 24 belegte an primärem Tumormaterial die Eignung der MDR-Promotor aktivierten Virotherapie für fortgeschrittene polychemoresistente gynäkologische Karzinome.

Weiterführende Studien zur Toxizität und Biodistribution einer MDR-regulierten Virotherapie im Xenotransplantat-Mausmodell sind unerlässlich, um Aussagen über unspezifische zytotoxische Effekte in Normalgeweben und Organen treffen zu können.

4 Diskussion

Die moderne Tumorthherapie erfordert die Entwicklung innovativer Therapiekonzepte, da insbesondere fortgeschrittene Karzinome gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden resistent sind. Konditional replikative Adenoviren (CRAds) repräsentieren hoch-potente anti-tumorale Agenzien, die bereits in klinischen Studien gute Erfolge hinsichtlich Therapieeffizienz und klinischer Sicherheit erzielt haben.

ONYX-015 repräsentiert ein prominentes Typ I CRAd, das bereits in verschiedenen klinischen Studien (Phase I/II) zur Therapie von Kopf-Hals-Tumoren, des Lungen-, Mamma- oder Ovarialkarzinoms eingesetzt wurde. Eine Phase II Studie, in der ONYX-015 mit einer Kombination aus Cisplatin/5-Fluorouracil bei 30 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren simultan appliziert wurde, konnte eine 83%-ige Ansprechrates bestätigen (Khuri et al., 2000). Bei 63% der Patienten wurde eine über 50%-ige Reduktion der Tumormasse beobachtet. Gerade Kopf-Hals-Tumore sind häufig refraktär gegenüber herkömmlichen Therapiemodalitäten.

Der Erfolg der Virotherapie wird von der Fähigkeit der Adenoviren bestimmt, das Virusgenom in die Zielzellen einzuschleusen. Darüber hinaus belegen präklinische Studien, dass die adenovirale Transduktion durch die Modifikation der adenoviralen Fiber signifikant erhöht werden kann. Über die verbesserte Tumorpenetration können Fiber-modifizierte CRAds eine Steigerung der klinischen Effizienz bewirken. Zudem könnte die CRAd-Vektordosis in Relation zu Erstgenerationsvektoren gesenkt werden, wodurch das Risiko einer Immunantwort gegen adenovirale Vektoren vermindert würde. Da die Infektion der Zielzellen nicht selektiv erfolgt, ist die transkriptionelle Regulation der adenoviralen Replikation essentiell, um die ektopische CRAd Replikation in lebenswichtigen Organen zu verhindern.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Optimierung von CRAd-Vektoren für die Virotherapie gynäkologischer Karzinome. Zunächst konnte die Steigerung der onkolytischen Potenz durch die 5/3 Fiber-Pseudotypisierung von CRAd-Vektoren gegenüber Ad5 Capsid Vektoren bei fortgeschrittenen chemoresistenten Ovarial- und Mammakarzinomen belegt werden. Um eine hohe Therapieeffizienz sowie Spezifität der Virotherapie zu erzielen, wurden 5/3 pseudotypisierte CRAds generiert, bei denen die adenovirale Replikation über spezifische Promotoren transkriptionell kontrolliert wurde.

Für die Mammakarzinom-spezifische Virotherapie wurde ein 5/3 chimäres CRAd kloniert, das unter der transkriptionellen Kontrolle des ALA-Promotors spezifisch Onkolysen in MaCa-Zellen induzierte, während Normalgewebszellen nicht lysiert wurden. Die Regulation der Virusreplikation über den Zytostatika-induzierbaren MDR1-Promotor erzielte in chemoresistenten Karzinomen gegenüber isogenetischen Vergleichsvektoren gesteigerte Zytotoxizitäten.

Damit leistet diese Arbeit einen Beitrag zu der Entwicklung einer onkolytischen Virotherapie für das (i) fortgeschrittene Mammakarzinom sowie für das (ii) chemoresistente Ovarialkarzinom.

4.1 Transduktionelles Targeting

Die Expression des primären Ad5 Rezeptors CAR ist hauptsächlich für die adenovirale Transduktionseffizienz und Transgenexpression verantwortlich (Zabner et al., 1997). CAR wird in benignen epithelialen Geweben ubiquitär exprimiert. Für zahlreiche fortgeschrittene Primärtumore wurde eine verminderte CAR-Expression nachgewiesen (Shayakhmetov et al., 2002; Li et al., 1999), weshalb die Gentransferraten von Ad5-basierten Vektoren im klinischen Einsatz häufig gering sind. Obwohl die genaue Funktion von CAR noch ungeklärt ist, wird eine Rolle in der Zelladhäsion, Zellzykluskontrolle oder als Tumorsuppressorgen diskutiert (Okegawa et al., 2001; Okegawa et al., 2000; Seidman et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde eine inverse Korrelation der CAR-Expression mit der Tumormalignität beschrieben.

Um die Toxizität 5/3 Fiber-chimärisierter Adenoviren bestimmen zu können, ist ein besseres Verständnis des Infektionsweges von Adenoviren des Serotyp 3 (Ad3) essentiell. Während maligne Tumorzellen, hämatopoetische Stammzellen und dendritische Zellen resistent gegenüber der Ad5 Infektion sind, erlauben pseudotypisierte Ad, die die Fiber von Gruppe B Adenoviren enthalten, einen erhöhten Gentransfer in Ad5-resistente Zielzellen (Nilsson et al., 2004a; Nilsson et al., 2004b; Davidoff et al., 1999).

Bis heute wurden der Mechanismus der Primärrezeptorbindung und die Infektion des Adenovirus Serotyp 3 (Ad3) nicht vollständig aufgeklärt. Die Identifikation von CD46 als zellulären Rezeptor von Adenoviren der Gruppe B ermöglichte insgesamt ein besseres Verständnis der Virusbindung an die Wirtszelle sowie des viralen Zelleintritts. In Bezug auf Ad3 scheint es sich bei CD46 nicht um einen hoch-affinen Primärrezeptor zu handeln. CD46 wird ubiquitär auf nukleären Zellen z.B. Leukozyten, Epithelzellen oder Fibroblasten exprimiert und ist an der Regulation der Komplementaktivierung beteiligt. Neben der Beteiligung von CD46 verweisen neuere Studien auf eine Beteiligung von CD80 und CD86 an der zellulären Ad3 Bindung (Short et al., 2004; Sirena et al., 2004). Bei CD80/CD86 handelt es sich kostimulatorische Moleküle, die auf reifen dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert werden und an der Stimulation der T-Lymphozyten-Aktivierung beteiligt sind (Galea-Lauri et al., 1996).

Beim Xenotransplantat-Mausmodell handelt es sich um ein Tiermodell, das für die Testung neuer Therapieansätze etabliert ist. Dennoch ist die Verwendung dieser Mausmodelle für die präklinische Testung adenoviraler Gentherapien limitiert, da die Oberflächenexpression von Rezeptoren in der Maus im Vergleich zum Menschen abweicht (Bao et al., 2005). Daher sind nach heutigem Wissensstand Studien im Mausmodell nicht ohne weiteres auf das humane System übertragbar. So erfolgt in der Maus die Expression des Ad Gruppe B Rezeptors CD46 im Gegensatz zum Menschen, wo CD46 ubiquitär auf nukleären Zellen exprimiert wird, nur in der Testis (Ni et al., 2005). Damit sind Ergebnisse aus Mausmodellen über toxische Effekte von Ad3 pseudotypisierten CRAds für die klinische Anwendung nur von bedingter Relevanz.

Zudem konnten klinische Studien eine Diskrepanz der adenoviralen Gentransfereffizienzen zwischen Zelllinien und klinischen Tumoren bestätigen, die auf die CAR-Expression von Zelllinien im Gegensatz zu Primärtumoren zurückzuführen war (Miller et al., 1998; Nettelbeck et al., 2004). So ist gerade im Hinblick auf einen klinischen Einsatz gentherapeutischer Vektoren das Testen von primären Tumorzellen vielversprechend, da die *in-vivo* Situation des Tumors nachgeahmt wird.

Um auf die Klinik übertragbare Resultate zu erzielen, bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Optimierung der Isolierung von primären Tumorzellen aus Pleuraerguss, Aszites und soliden Tumoren der Mamma und des Ovars. Für die Testung von Normalgewebszellen wurde die Methode von Stampfer et. al. (Stampfer, 2004) zur Isolierung von Epithelzellen und Fibroblasten aus mammären Reduktionsplastiken etabliert und weiterentwickelt (s. Material und Methoden).

Der Vorteil von unpassagierten Primärzellen im Vergleich zu Zelllinien liegt einerseits in der Vermeidung geno- und phänotypischer Veränderungen, die infolge der klonalen Selektion während der Zellkultivierung auftreten. Im Vergleich zum Mausmodell eignen sich unpassagierte humane primäre Tumorzellen insbesondere für die Toxizitätsanalyse onkolytischer Adenoviren, da die adenovirale Replikation Spezies-spezifisch in humanen Zellen erfolgt (Volk et al., 2003; Vigne et al., 2003). Zellaggregate aus primären Tumorzellen, sogenannte Spheroide, imitieren die 3-D-Organstruktur eines soliden Tumors und ermöglichen eine Bewertung der CRAd-Gewebepenetration (Lam et al., 2003). Dennoch sind *in-vivo* Studien zwingend erforderlich, um die präklinischen Daten einer adenoviralen Virotherapie hinsichtlich onkolytischer Effizienz, Biodistribution und Toxizität in Vorbereitung auf die klinische Anwendung zu komplettieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Steigerung der onkolytischen Effizienz 5/3 Fiber-pseudotypisierter CRAds beim Ovarialkarzinom bestätigt und erstmalig beim Mammakarzinom demonstriert werden. Zudem zeichneten sich 5/3 pseudotypisierte CRAds in Relation zu RGD-inkorporierten CRAds durch eine abgeschwächte Zelllyse in mammären Normalgewebszellen (MCF-12A, HMEC) aus.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays demonstrieren, dass sowohl primäre Ovarialtumore (s. Abb.12) als auch primäre Mammatumore (s. Abb.19) häufig gegenüber der Ad5-Capsid vermittelten Onkolyse resistent sind. Hingegen wurden die Primärtumore durch Capsid-modifizierte CRAds lysiert. Dadurch konnte die Bedeutung von primärem Tumormaterial für die Analyse onkolytischer Adenoviren sowie die Notwendigkeit Tropismus-modifizierter Adenoviren für den effizienten Gentransfer belegt werden.

Hinsichtlich der Therapie des Mammakarzinoms belegen die Ergebnisse der Crystal-Violet-Assays (s. Abb.13) die erhöhte Infektion von Mammakarzinomzellen durch RGD-modifizierte und 5/3 Fiber-chimärisierte Adenoviren, wodurch insgesamt eine verstärkte Onkolyse in Relation zu Ad5 Capsid Vektoren induziert wurde. Das Infektionsprofil 5/3 pseudotypisierter CRAds wies in Relation zu

CRAds mit RGD-Modifikation eine erhöhte Spezifität auf, da die Ad5/3 Δ 24 induzierte Onkolyse in mammären Normalgewebszellen abgeschwächt war (s. Abb.14). Damit wurde erstmalig die erhöhte onkolytische Potenz 5/3 Fiber-chimärisierter CRAds gegenüber Ad5 Capsid CRAds in primären Mammakarzinomen beschrieben. Ferner korreliert die erhöhte Infektionsrate von 5/3 chimären CRAds bei primären Mammakarzinomen mit einer kürzlich publizierten Studie, in der Ad5/3 chimäre Vektoren die höchsten Gentransfereffizienzen bei Brusttumoren erzielten (Stoff-Khalili et al., 2005). In der klinischen Anwendung könnte eine Virotherapie mit 5/3 pseudotypisierten CRAds aufgrund der erhöhten Transduktionsrate in einer signifikanten Steigerung der Therapieeffizienz resultieren.

In etablierten und primären Ovarialkarzinomzellen erzielten 5/3 pseudotypisierte CRAds im Vergleich zu Ad5-Capsid Vektoren oder CRAds mit RGD-Modifikation die höchsten Infektionsraten sowie onkolytischen Aktivitäten (s. Abb.12). Die erhöhte Gentransferrate von 5/3 chimären Adenoviren beim Ovarialkarzinom korreliert mit publizierten Studien, in denen die Ad3 Substitution der Ad5 Fiber knob Domäne den Gentransfer in klinisch relevante Ovarialkarzinome signifikant erhöhen konnte. Kanerva et al. demonstrierten bei der *in-vivo* Testung 5/3 pseudotypisierter onkolytischer Vektoren, dass der antitumorale Effekt von Ad5/3 Δ 24 gegenüber Ad5 Capsid und RGD inkorporierten Vektoren überwog, während die Ad5/3 vermittelte Toxizität und Biodistribution mit Ad5 vergleichbar war (Kanerva et al., 2003).

Fortgeschrittene Ovarialtumore bilden sehr häufig Chemoresistenzen aus. Es ist nicht bekannt, ob und wie die onkolytische Effizienz durch die molekularen Mechanismen der Chemoresistenz beeinflusst wird. Doxorubicin wird aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die DNA- und RNA-Synthese standardmäßig für die Zytostatikatherapie solider Tumore, einschließlich Ovarialtumore, eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation der onkolytischen Effizienz wildtypischer und Fiber-modifizierter CRAds durch Doxorubicin-Behandlung in Ovarialkarzinomzellen beschrieben. Unter Chemotherapie konnte die Ad5-Resistenz von SK-OV-3 Zellen aufgehoben und die Infektionsrate von CRAds mit RGD-Modifikation der Fiber gesteigert werden, wohingegen die onkolytische Effizienz von Ad5/3 Δ 24 vor und nach Chemotherapie unverändert blieb. Adenoviren mit RGD-Fiber sind neben der alternativen Bindung von Integrinen immer noch befähigt, den klassischen Ad5-Infektionsweg über den primären Ad5 Rezeptor CAR einzuschlagen. Hemminki et al. konnten in Ovarialkarzinomzelllinien und Patientenproben eine Erhöhung der adenoviralen Gentransfereffizienz unter Etoposid-, Topotecan-, FR901228-, Trichostatin A-Behandlung beschreiben, die mit einer Erhöhung der CAR-Expression einher ging (Hemminki et al., 2003a). Darauf basierend demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse eine Erhöhung des Gentransfers sowie der onkolytischen Effizienz für Ad5 Capsid und RGD-modifizierte CRAds unter Doxorubicin-Behandlung (s. Abb.15), was möglicherweise auf eine erhöhte CAR- und Integrin-Expression zurückzuführen ist. Die Steigerung der CAR-Expression unter Chemotherapie bedeutet für Ad5 basierte Gentherapieansätze eine Verbesserung der klinischen Effizienz.

Schlussfolgernd ermöglicht die Zunahme der Gentransferrate durch transduktionell redirigierte CRAds eine Verbesserung der totalen Therapieeffizienz, die aus einer gesteigerten adenoviralen Infektion, Replikation und Virusverteilung resultiert (Kawakami et al., 2003).

4.2 Transkriptionelles Targeting

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung onkolytischer Adenoviren, die eine erhöhte Infektionseffizienz und damit eine gesteigerte Onkolyse aufwiesen. Dieser Ansatz bedingt jedoch eine strenge Kontrolle der adenoviralen Replikation, um die lytischen Effekte der CRAd-Replikation auf Tumorzellen zu begrenzen und damit ein gutes Sicherheitsprofil zu gewährleisten. Die transkriptionelle Kontrolle der adenoviralen Replikation über spezifische Promotoren bietet eine Möglichkeit, um die CRAd induzierte Toxizität in Normalgeweben wie Leber, Hirn oder Niere zu vermeiden. Gerade bei der adenoviralen Gentherapie muss gewährleistet werden, dass die Kandidatenpromotoren keine Aktivität in lebenswichtigen Organen wie der Leber aufweisen, um toxische Nebenwirkungen infolge einer ektopischen Transgenexpression zu vermeiden.

Bisher wurden über 1000 Patienten ohne gravierende Nebenwirkungen mit Adenoviren behandelt (Hemminki and Alvarez, 2002). Eine wichtige Rolle in Bezug auf die Aufnahme und den Abbau adenoviraler Partikel aus dem Blutstrom kommt den Kupfferschen Zellen der Leber zu (Tao et al., 2001; Raper et al., 2003). Aktuelle klinische Gentherapiestudien beschreiben infolge der intratumoralen oder intravenösen Administration von ONYX-015 eher mäßige Nebenwirkungen wie Grippe-ähnliche Symptome, Fieber oder Schnupfen (Nemunaitis et al., 2001; Nemunaitis et al., 2003; Hamid et al., 2003) oder abdominale Beschwerden nach intraperitonealer Administration (Vasey et al., 2002), wodurch die gute Verträglichkeit der adenoviralen Gentherapie klinisch belegt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der Promotoren ALA und MDR1 für die Virotherapie gynäkologischer Tumore demonstriert. Der ALA-Promotor wurde aufgrund seiner Gewebespezifität und damit aufgrund der fehlenden Aktivität in der Leber ausgewählt, wodurch eine ausreichende Spezifität einer ALA-regulierten Gentherapie in der potentiellen klinischen Anwendung gewährleistet werden sollte. Die Auswahl des chemoinduzierbaren MDR1-Promotors sollte eine Virotherapie für chemoresistente Tumore ermöglichen. Für die CRAd-Konstruktion wurde die Kombination aus transduktionellem und transkriptionellem Targeting gewählt, um eine hohe Infektionseffizienz sowie Tumorspezifität der Virotherapie zu gewährleisten. Als genetischer Hintergrund für die CRAd-Konstruktion wurde die 5/3 Fiberchimäre ausgesucht, da diese im Vergleich zu RGD- und Ad5-Capsiden sowohl bei Ovarial- als auch Mammarkarzinomzellen die höchsten Infektionsraten erzielte. Die Insertion der 24bp Deletion ($\Delta 24$) in das adenovirale E1A-Gen sollte in einer potentiellen klinischen Anwendung die Replikation von Ad5/3ALA $\Delta 24$ und Ad5/3MDR $\Delta 24$ in ruhenden Normalgewebeszellen vermeiden. Durch die Deletion der pRb-Bindedomäne ist deletiertes E1A $\Delta 24$ -

Protein nicht mehr fähig pRb zu binden und zu inaktivieren. Aufgrund der ausbleibenden S-Phase-Induktion wird die adenovirale Replikation in ruhenden Zellen mit aktivem pRb-Protein unterdrückt. Die Replikation E1A Δ 24-deletierter Adenoviren erfolgt nur noch in Tumor- oder proliferierenden Zellen, in denen pRb inaktiviert vorliegt (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000). Inaktivierende Mutationen des pRb-Signalweges, zu denen die Überexpression des CDK-bindenden CyclinD2 oder die Inaktivierung des CDK4-Inhibitors p16-Ink4A zählen (Sherr and McCormick, 2002; Yamasaki, 2003; Sherr, 1996), treten häufig in Tumoren auf. Demzufolge repräsentiert die 24bp Deletion in der funktionellen CR2-Domäne des E1A-Proteins eine Rationale für die Virotherapie maligner Tumore. Aufgrund der Inaktivierung des pRb-Proteins während der Zellzyklusprogression werden kultivierte Normalgewebszellen der *in-vivo* Situation differenzierter ruhender Zellen nicht gerecht. Dennoch könnte im klinischen Einsatz die E1A Δ 24-Deletion zu einer erhöhten Stringenz der CRAd-Replikation beitragen. Der Studienvergleich der onkolytischen Potenz zwischen E1A Δ 24- und E1B-55kDa-deletierten TypI CRAds zeigte für E1A-mutierte Adenoviren eine überlegene therapeutische Effizienz für maligne Gliome (Jiang et al., 2005), wodurch die Eignung der Δ 24-Deletion für die klinische Tumorthherapie belegt wurde.

4.3 Mammakarzinom-selektive Virotherapie

Obwohl Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen aus westlichen Industrienationen darstellt, wurden bisher nur wenige gentherapeutische Vektoren entwickelt, die auf die Therapie des Mammakarzinoms abzielen. Mittels cDNA Micro-Array-Technologie wurden diverse Kandidatenpromotoren wie VEGF, Heparanase, MUC1, CXCR4 oder Survivin identifiziert, deren korrespondierende Gene in gynäkologischen Tumoren überexprimiert wurden (Kurihara et al., 2000; Rein et al., 2004; Breidenbach et al., 2005b). Nach der Klonierung in Erstgenerations Ad-Vektoren konnten die Kandidatenpromotoren Heparanase und Survivin erfolgreich eine tumorspezifische Genexpression in MaCa-Zelllinien vermitteln (Breidenbach et al., 2005a; Zhu et al., 2004). Studien zur *in-vivo* Biodistribution bestätigten nach der systemischen Vektoradministration ein tumorspezifisches Aktivitätsprofil des ALA-Promotors in Mammakarzinom-Xenotransplantaten, während der ALA-Promotor in lebenswichtigen Organen wie der Leber keine Luziferase-Reportergen-Aktivität induzierte (Anderson et al., 1999).

Jedoch wurde die Anwendung der Kandidatenpromotoren für die gezielte Virotherapie des Mammakarzinoms versäumt. Kürzlich wurde der erste onkolytische CRAd-Vektor für die spezifische Therapie des Mammakarzinoms beschrieben. Ein Survivin-RGD-CRAd, bei dem die E1A-Expression transkriptionell über den Promotor des Survivin-Gens kontrolliert wird und der das Integrin bindende RGD-Motiv enthält, erzielte *in-vitro* und *in-vivo* eine spezifische Onkolyse von Mammakarzinomzellen (Zhu et al., 2005). Nichtsdestotrotz besteht eine Notwendigkeit für die weitere Entwicklung transkriptionell regulierter CRAds, um die Therapieoptionen gerade für das metastasierte fortgeschrittene Mammarkarzinom zu verbessern.

Auf der Grundlage der brustspezifischen Expression wurde ALA als Kandidatenpromotor für die Mammakarzinom-spezifische CRAd-Konstruktion ausgewählt. Die ALA-Expression in MaCa-Zelllinien wurde sowohl durch die Expressionsanalyse (s. Abb.1, Abb.2) als auch in Reporter-Gen-Assays (s. Abb.10) belegt.

Die Charakterisierung des ALA-Promotors resultierte im Vergleich zum MDR-Promotor in einer geringen Luziferase-Aktivität. Studien zum transkriptionellen Targeting belegen, dass eine hohe Promotorspezifität oftmals zu einer Abschwächung der Promotoraktivität führt (Lin and Nemunaitis, 2004; Shillitoe and Noonan, 2000). Die Promotoraktivität muss jedoch das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes gewährleisten, um die CRAd-Replikation sowie die effiziente Virionenproduktion mit nachfolgender Zelllyse zu ermöglichen (Nettelbeck et al., 2002b). Hinzu führen genetische Modifikationen, die eine erhöhte Tumorselektivität bewirken, zu einer Abschwächung der adenoviralen Replikationskompetenz (Bauerschmitz et al., 2002). Für die Virotherapie bedeutet eine Abschwächung der Replikationskompetenz eine Reduktion des onkolytischen Potentials und damit der Therapieeffizienz.

Dennoch war die ALA-Promotoraktivität ausreichend, um über die Aktivierung der E1A-Expression im CRAd-Hintergrund ein selektives Abtöten von Tumorzellen zu induzieren (s. Abb. 17). Die endogene ALA-Expression in Zelllinien korrelierte mit der Mammakarzinom-spezifischen Onkolyse von Ad5/3ALA Δ 24. Die potentielle Eignung einer Ad5/3ALA Δ 24 basierten Therapie für Östrogen-Rezeptor-negative Mammatumore wird durch die hohe ALA-Expression sowie die effiziente Zelllyse von Östrogen-Rezeptor-negativen Sk-Br-3 Zellen gestützt. Gerade Östrogen-Rezeptor-negative Mammakarzinome, die mit einem aggressiveren Phänotyp, einer schlechten Prognose und einem Versagen der Hormonersatztherapie einhergehen, erfordern innovative Therapieoptionen.

Die Eignung von Ad5/3ALA Δ 24 für einen klinischen Einsatz wurde durch die Onkolyse primärer unpassagierter Mammakarzinomzellen belegt (s. Abb.19). Die ALA-Promotor vermittelte Onkolyse wurde in 1/3 der Primärtumore (das entspricht 33%) festgestellt. Da in 2/3 Primärtumoren (entsprechend 66%) keine Zytotoxizitäten induziert wurden, wäre bei einer Virotherapie mit Ad5/3ALA Δ 24 lediglich das Therapieansprechen einiger spezieller Tumore zu erwarten.

Die Tumorspezifität von Ad5/3ALA Δ 24 konnte durch minimale Zytotoxizitäten und Replikationsraten in gesunden mammären Kontrollzellen, die im Vergleich zu Tumorzellen abgeschwächt waren, nachgewiesen werden (s. Abb.20, Abb.21).

Der Vergleich mit dem isogenetischen Vergleichs-CRAd Ad5/3 Δ 24 belegt die Tumorspezifität des ALA-Promotors im CRAd-Vektorhintergrund. Durch die transkriptionelle ALA-Promotorkontrolle der Virusreplikation konnten nach Infektion mit Ad5/3ALA Δ 24 zytotoxische Effekte auf Normalgewebszellen minimiert werden (s. Abb.20). Die transkriptionelle Kontrolle der E1A-Expression über den ALA-Promotor ermöglichte eine minimale CRAd-Replikation in MCF-12A Kontrollzellen (s. Abb.21), die Replikationseffizienz war dennoch nicht für die Induktion lytischer

Effekte ausreichend (s. Abb.20). So blieben trotz positiver ALA-Expression zytotoxische Effekte in gesunden MCF-12A nach Ad5/3ALA Δ 24-Infektion aus.

Die Diskrepanz der ALA-Expression in etablierten MCF-12A und primären HMEC Zellen, beides normale epitheliale Mammazellen, ist möglicherweise auf die geno- und phänotypischen Änderungen durch die Zellkultur zurückzuführen. Die zyklische Entwicklung der Mamma wird durch einen zeitweilig steigenden ALA-Spiegel während der Stillperiode widerspiegelt. Die hormonelle Supplementierung des Zellkulturmediums könnte die ALA-Induktion in MCF-12A Zellen bedingt haben, während HMECs mit einer limitierten Anzahl von Passagen der *in-vivo* Situation gesunden Mammagewebes eher entsprechen.

Die Spezifität der Virotherapie wurde im Kokulturmodell getestet, in das Epithelzellen und Fibroblasten simultan eingesetzt wurden, bevor sie mit Virus infiziert wurden.

Im Vergleich zum Einsatz einer einzelnen Zelllinie bietet das Kokulturmodell den Vorteil, dass der Einfluss von Fibroblasten auf die epitheliale Differenzierung berücksichtigt wird (Maeda et al., 2004; Maeda et al., 2006). Im Kokultorexperiment wurde die tumorspezifische onkolytische Aktivität von Ad5/3ALA Δ 24 sichtbar, da BT-20 MaCa-Zellen selektiv lysiert wurden. Darüber hinaus wurde die Replikation von Ad5/3ALA Δ 24 in kokultivierten HMECs unterdrückt. Durch den Vergleich mit dem isogenetischen CRAd Ad5/3 Δ 24, das alle Zelltypen des Kokultorexperiments lysierte, konnte die Tumorspezifität der Ad5/3ALA Δ 24 induzierten Zelllyse auf die ALA-Promotorkontrolle der CRAd-Replikation zurückgeführt werden.

Zusammenfassend bietet die Gewebespezifität des ALA-Promotors eine Option, um die ektopische Virusreplikation in lebenswichtigen Organen zu vermeiden, wodurch toxische Nebenwirkungen einer Virotherapie mit Ad5/3ALA Δ 24 vermieden werden können. Darüber hinaus könnten 5/3 pseudotypisierte CRAds in der klinischen Anwendung eine effiziente Tumorpenetration für gynäkologische Tumore und damit eine Steigerung der onkolytischen Therapieeffizienz bewirken. Aufgrund der Tumorspezifität ist die Administration von Ad5/3ALA Δ 24 für die systemische Therapie des Mammakarzinoms viel versprechend, die eine Eliminierung von Mikrometastasen ermöglichen könnte. In weiterführenden *in-vivo* Experimenten muss untersucht werden, ob die geringe Aktivität des ALA-Promotors eine effiziente Tumorregression bewirken kann. Eine wichtige Frage für die *in-vivo* Analyse ist, ob die Ad5/3ALA Δ 24 induzierte Onkolyse schnell genug induziert wird (innerhalb der ersten 48h nach Vektorgabe), damit die CRAd-Partikel nicht durch die Induktion einer zellulären Immunantwort gegen Adenoviren inaktiviert werden.

4.4 Virotherapie für chemoresistente Tumore

Die kurative Chemotherapie fortgeschrittener Karzinome wird oft durch assoziierte Zytostatika-Resistenzen verhindert. Häufig geht die Chemoresistenz von malignen Tumoren auf die Expression des MDR1-kodierten P-Glykoproteins zurück, das als Membrantransporter Zytostatika effizient aus der Zelle transportiert. In malignen Ovarialtumoren korreliert eine erhöhte p-Gp-Expression mit einem verminderten Ansprechen auf eine Chemotherapie (Raspollini et al., 2005).

Im Gegensatz zu ALA handelt es sich bei MDR1 nicht um einen tumorspezifischen, sondern um einen Zytostatika-induzierbaren Promotor (Walther et al., 1997c). Die Rationale einer MDR-regulierten Virotherapie gegen chemoresistente Karzinome basiert auf der Zytostatika-Responsivität des MDR1-Promotors. Die nachteilige Eigenschaft der MDR-vermittelten Chemoresistenz sollte als Therapietarget für die Virotherapie genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein proximales MDR1-Promotorfragment (-207 bis +158bp) verwendet, das multiple cis-regulatorische Elemente enthält, die in die Modulation der MDR1-Expression unter Chemotherapie involviert sind.

Studien konnten zeigen, dass durch die Zytostatika-Behandlung als Bestandteil der anti-tumoralen Chemotherapie eine Hochregulation der MDR1-Expression erfolgt. Dabei wird die Chemo-Responsivität des MDR-Promotors über drug responsive elements (DRE) vermittelt (Licht et al., 1991b). In dem relevanten MDR1-Promotorfragment sind zwei DRE zwischen -136 und -76bp sowie zwischen +1 und +121bp lokalisiert (Walther et al., 1997b).

Darüber hinaus wurde die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren YB-1 und NF-Y an der MDR-vermittelten Zytostatika-Response beschrieben, indem die Transkriptionsaktivatoren mit funktionellen cis-Elementen des humanen MDR1-Promotors, die zwischen -70 bis -100bp lokalisiert sind, interagieren (Goldsmith et al., 1993; Ohga et al., 1998; Walther et al., 1997a). In verschiedenen Tumorentitäten wie Brusttumoren und Osteosarkomen wurde eine Assoziation zwischen nukleärer YB-1-Lokalisation und MDR1/p-Gp Expression beschrieben (Bargou et al., 1997).

Ein weiterer Schlüsselmechanismus zur Modulation der MDR1-Expression basiert auf der Hyper-/Hypomethylierung von CpG-Inseln des MDR1-Promotors während der Behandlung mit zytotoxischen Agenzien. Experimente mit kultivierten Zelllinien verweisen auf eine enge Verbindung zwischen dem Methylierungsstatus der CpG-Inseln zwischen -80 und -100bp der Promotorregion und der MDR1-Genexpression (Kusaba et al., 1999; Kusaba et al., 1997).

Die Charakterisierung der basalen MDR-Expression ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Es konnte kein Korrelat der basalen MDR-Expression, MDR:Luziferase-Aktivitäten und induzierten Zytotoxizitäten der MDR-CRAds aufgezeigt werden (vgl. Abb.3, Abb.11 und Abb. 23). Die Diskrepanz zwischen den MDR-Expressionsdaten und den MDR:Luziferase-Aktivitäten könnte auf

die höhere Sensitivität des Luziferase-Reporter-Gen-Assays sowie auf die Messung exogener transkriptioneller MDR-Aktivitäten im Luziferase-Assay (s.u.) zurückgeführt werden.

In drei OvCa-Linien (Hey, SK-OV-3 i.p., Ov-4) sowie in allen getesteten MaCa-Linien stand die negative MDR1-mRNA-Expression im Widerspruch zu den gemessenen MDR1-Promotoraktivitäten (vgl. Abb.3 und Abb.11). Als mögliche Ursache der niedrigen MDR-Transkription könnte die Hypermethylierung des endogenen MDR1-Promotors angesehen werden (David et al., 2004c). Exogene MDR1-Promotorkopien, die über virale Vektoren in die Zellen eingebracht wurden und infolgedessen hypomethyliert vorlagen, wurden erfolgreich über zelluläre Transkriptionsfaktoren aktiviert und induzierten die Luziferase-Expression. Aktuelle Studien beschreiben die Regulation der MDR1-Expression über epigenetische Mechanismen (Baker and El Osta, 2003; Baker and El Osta, 2004). Interessanterweise konnten als relevante Mechanismen der Doxorubicin-Induktion sowohl die Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden im proximalen MDR1-Promotorbereich als auch die vermehrte H3-Histonacetylierung identifiziert werden (Baker et al., 2005; David et al., 2004b). Studien belegen die Hypomethylierung des MDR1-Promotors in Doxorubicin-resistenten MCF7 Zellen, in unbehandelten MCF-7 Zellen lag die MDR1-Promotorregion stark methyliert vor (Chekhun et al., 2006). David et al. konnten durch die Adriamycin (ADR)-Behandlung von MCF-7 MaCa-Zellen die MDR-Expression induzieren (David et al., 2004a). In Analogie dazu konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch die Doxorubicin (entspricht Adriamycin)-Behandlung von MCF-7 Zellen nach 7 Tagen die MDR1-Transkription nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), der Methylierungsstatus des MDR1-Promotors wurde nicht analysiert.

Im Hinblick auf MTS-Zytotoxizitäts-Assay induzierten Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDRA24 in OvCa-Zelllinien mit hoher (Ov-4) und geringer (Hey) transkriptioneller MDR-Aktivität vergleichbare Zytotoxizitäten, wobei die Zytotoxizitäten nicht mit den gemessenen MDR:Luziferase-Aktivitäten korrelierten.

Eine mögliche Erklärung könnte die Existenz eines Schwellenwertes der E1A-Expression darstellen, der für die Induktion der Virusreplikation erreicht werden muss (Nettelbeck et al., 2002a). Für die MDR-CRAbs bedeutet dies, dass es aufgrund der MDR-Promotoraktivität zur Expression des E1A Transkriptionsfaktors kommt und der E1A-Schwellenwert überschritten wird. Das E1A-Protein aktiviert nun seinerseits die Expression der frühen adenoviralen Gene, wodurch der virale Replikationszyklus induziert wird. Nach Überschreiten dieses Schwellenwertes wären variierende MDR-Promotoraktivitäten je Zelllinie nicht zu unterscheiden.

Trotz der minimalen MDR1-Transkription in Kontrollzellen wurden in Normalgewebszellen nach Infektion mit den MDR-CRAbs zytotoxische Effekte gemessen (s. Abb.24), die mit den onkolytischen Aktivitäten der MDR-CRAbs in Tumorzellen vergleichbar waren (s. Abb. 23). In Verbindung mit MDR-Promotoraktivitäten in 2/4 Subpopulationen wurden Fibroblasten effizient durch die MDR1-

regulierten CRAds lysiert. Im Vergleich zu Ad5/3 Δ 24 bewirkte die MDR1-Promotor-Regulation der CRAd-Replikation eine abgeschwächte Onkolyse in gesunden MCF-12A Mammaepithelzellen.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung liegt das Potential einer Virotherapie mit Ad5/3MDRE1 oder Ad5/3MDR Δ 24 in der lokalen Tumorthherapie, da aufgrund der basalen MDR1-Expression in Normalgeweben wie der Leber und Nebennierenrinde unspezifische toxische Effekte zu erwarten sind.

Im Vergleich zu Ad5/3MDRE1 wurde hinsichtlich der E1A Δ 24-Deletionsvariante Ad5/3MDR Δ 24 keine verminderte onkolytische Aktivität in Kontrollzellen beobachtet, obwohl die E1A Δ 24-Deletion die Virusreplikation in ruhenden Normalzellen verhindern sollte. Bei den getesteten Kontrollzellen handelte es sich um proliferierende Zellen, so dass die proliferierenden Zellkulturen kein geeignetes Modell für die Evaluierung der Δ 24-Deletion darstellten.

Voraussetzung zur Entwicklung einer Virotherapie für chemoresistente Karzinome war die Etablierung eines Zellkulturmodells, das die MDR1-vermittelte Chemo-Resistenz repräsentierte. Im Verlauf dieser Arbeit wurden durch die Doxorubicin-Selektion von SK-OV-3 Zellen erfolgreich Doxo-resistente Sublinien selektioniert, die in Abhängigkeit der verabreichten Doxorubicin-Dosis eine Induktion der transkriptionellen MDR1-Genaktivität zeigten. SK-OV-3 Zellen verfügen über eine intrinsische Multidrugresistenz, die zu einer erfolgreichen Doxorubicin-Selektion beitrug.

Nachdem die Induktion der MDR1-mRNA (s. Abb.6), des MDR1-Promotors (s. Abb.11) und des p-Glykoproteins (s. Abb.8) nach Doxorubicin-Behandlung demonstriert wurde, konnte die phänotypische Doxorubicin-Toleranz der SK-OV-3-Resistenzlinien auf die MDR1-Expression zurückgeführt werden. In Übereinstimmung mit der MDR1-Induktion über Anthrazykline (Licht et al., 1991a; Hu et al., 1995) resultierte die Doxorubicin-Selektion in einer spezifischen Resistenz der SK-OV-3 Zellen gegenüber Doxorubicin (s. Abb.5). Entgegen publizierter Studien vermittelte die MDR1-Resistenz keine Kreuzresistenz gegen Taxol.

In-vitro Studien an selektionierten Zelllinien mit MDR1-Resistenz belegen, dass Genamplifikation, Genrearrangements, CpG-Methylierung der Promotorregion sowie die Bindung des Transkriptionsfaktors YB-1 an der p-Gp-Überexpression beteiligt sind (Torigoe et al., 1998; Torigoe et al., 1995). Die aufgezeigte Amplifikation des MDR1-Gens in Doxo-Resistenzlinien und MaCa-Zelllinien (s. Abb.7) war mit einer Studie in Einklang, in der für Doxorubicin-selektionierte Zelllinien chromosomale Rearrangements des MDR1-Genlokus 7q21 beschrieben wurden (Harada et al., 2000).

Für das vorliegende Kollektiv primärer Ovarialtumore konnte die MDR1-Amplifikation nicht verifiziert werden. In humanen Tumoren mit p-Gp-vermittelter Drug-Resistenz scheint eher die transkriptionelle Regulation der MDR1-Expression von Bedeutung zu sein, die neben dem Mechanismus der Hypermethylierung des MDR1-Promotors die Regulation über den Transkriptionsaktivator YB-1 einschließt. Für Patienten mit myelonischer Leukämie oder mit Blasenkarzinom wurde eine inverse Korrelation zwischen Methylierungsstatus des MDR1-Promotors und MDR1-mRNA-Konzentration demonstriert (Nakayama et al., 1998; Tada et al., 2000). Beim

Blasenkarzinom wurde hinzu eine Erhöhung der MDR1-mRNA-Expression infolge systemischer oder lokaler Chemotherapie nachgewiesen.

Der genaue Mechanismus, mit dem die Methylierung des MDR1- und anderer Promotoren mit der Tumorentstehung und –progression assoziiert sind, ist weiterhin unklar.

Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 erzielten in Doxorubicin-resistenten SK-OV-3 Zellen im Vergleich zu dem isogenetischen Vergleichs-CRAAd Ad5/3 Δ 24 höhere Zytotoxizitäten, die durch den Vergleich mit Ad5/3 Δ 24 auf die Aktivierung des MDR-Promotors zurückgeführt werden konnten (s. Abb.25). Dabei konnte eine Modulation der onkolytischen Aktivität von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 in Abhängigkeit der verabreichten Zytostatika-Dosis beobachtet werden. Die onkolytische Aktivität der MDR-CRAAds korrelierte in SK-OV-3 Doxo-Resistenzlinien mit der MDR-mRNA-Expression, der MDR-Promotoraktivität sowie der p-Gp-Expression.

Ein entscheidendes Kriterium für die onkolytische Effizienz der Virotherapie ist die Freisetzung der produzierten Viruspartikel. Nur nach Virusfreisetzung können erneut Tumorzellen infiziert werden, wodurch dann erst die Amplifikation des onkolytischen Effektes ermöglicht wird.

In Bezug auf Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 korrelierten die zytotoxischen Aktivitäten vor und nach Chemoinduktion mit der Induktion des zytopathischen Effektes (vgl. Abb.25, Abb.26a). Allerdings wurde eine fehlende Korrelation zwischen Chemoinduktion, Replikationseffizienz und Virionenfreisetzung der MDR-Promotor regulierten CRAAds aufgezeigt. Die Bestimmung der Virionenproduktion im TCID-Assay (s. Abb.27) konnte lediglich eine marginale Erhöhung der Replikationseffizienzen von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 in Doxorubicin-Resistenzzellen aufzeigen, die nicht ausreichend war, um die onkolytischen Effizienzen in chemoresistenten Karzinomen zu erklären.

Die Diskrepanz zwischen hoher Chemoresponsivität und marginaler Replikationsinduktion der MDR-regulierten CRAAds könnte durch den „chemosensibilisierenden Effekt“ des adenoviralen E1A-Proteins zurückzuführen sein. Diese E1A-induzierte Sensitivität der Zelle gegenüber Zytostatika geht teilweise auf die p53-induzierte Apoptose zurück (Lowe et al., 1993). E1A gilt als potenter Induktor der p53-Proteinexpression in Adenovirus infizierten Zellen (Debbas and White, 1993). Nach der adenoviralen Infektion steigt das p53-Level der Wirtszelle an, wodurch die Sensitivität der Zelle gegenüber einer Chemotherapie-induzierten Apoptose verstärkt wird. Ferner bewirken die adenovirale Infektion und die adenovirale E1A-Expression die Sensibilisierung von Zellen gegenüber TRAIL induzierter Apoptose (Shao et al., 2005). Weitere Studien belegen, dass das Ad5 E1A-Protein in Mammakarzinomen und Fibroblasten eine Sensibilisierung gegenüber zytotoxischen Agenzien z.B. Paclitaxel und Cisplatin vermittelt (Viniegra et al., 2002; Liao and Hung, 2003b). Als möglicher Mechanismus der E1A-vermittelten Chemosensibilisierung wurde eine erleichterte Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien postuliert (Liao and Hung, 2003a).

Demnach könnte eine erhöhte apoptotische Sensitivität chemoresistenter Tumorzellen potentielle Ursache der überlegenen Onkolyse von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 sein. Möglicherweise ist ein additiver Effekt aus E1A-Chemosensibilisierung und Aktivierung des MDR-Promotors in chemoresistenten Tumoren für die erhöhte onkolytische Aktivität von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 in Relation zu Ad5/3 Δ 24 verantwortlich. Das abgeschwächte onkolytische Potential von Ad5/3MDR Δ 24 in Relation zu Ad5/3MDRE1 könnte auf die Deletion der CR2-domäne zurückzuführen sein, da die Fähigkeit von mutiertem E1A Δ 24-Protein zur Chemosensibilisierung nachweislich vermindert ist (Liao and Hung, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals MDR-Promotor regulierte CRAd-Vektoren beschrieben, die die Zytotoxizitäten, die durch den potenten natürlichen adenoviralen E1A-Promotor vermittelt wurde, überschreiten konnten. In 4/6 fortgeschrittenen Primärtumoren mit Polychemoresistenz waren die onkolytischen Aktivitäten von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 gegenüber Ad5/3 Δ 24 überlegen (s. Abb.28).

Als relevantes Modell chemoresistenter Karzinome wurden primäre unpassagierte Tumorzellen aus Patientinnen mit Ovarial- oder Mammakarzinomdiagnose nach Polychemotherapie isoliert. Unpassagierte primäre Karzinomzellen reflektieren die *in-vivo* Tumorbilogie und ermöglichen, im Gegensatz zu etablierten Zelllinien, die Übertragung von *in-vitro* erzielten Resultaten auf die klinische Situation.

Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 induzierten in 2/4 der primären Ovarialkarzinomen (das entspricht 50%) höchste Onkolysen. Bei 2/2 der primären Mammakarzinome wurde Ad5/3MDRE1 (entsprechend 100%) als CRAd mit höchster onkolytischer Effizienz identifiziert, wohingegen Ad5/3MDR Δ 24 in 1/2 der Mammakarzinomproben (entsprechend 50%) höhere Zytotoxizitäten als das isogenetische CRAd Ad5/3 Δ 24 induzierte.

Der Vergleich isogenetischer Vektoren lässt die Schlussfolgerung zu, dass das onkolytische Potential von Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 in Relation zu Ad5/3 Δ 24 auf die transkriptionelle Aktivität des MDR-Promotors zurückzuführen ist.

Aufgrund der Zytostatika-Induktion des MDR1-Promotors könnte in der klinischen Anwendung die kombinierte Chemo-Virotherapie einen erhöhten Therapieeffekt gegenüber der Einzelmodalität bewirken. Eine präklinische Studie mit dem Prostata-Karzinom spezifischen CRAd CV787 belegte die synergistische anti-tumorale Effizienz, wenn die Virotherapie durch eine Taxan-Applikation, Paclitaxel oder Docetaxel, begleitet wurde (Yu et al., 2001). Die Kombination des replikationskompetenten Adenovirus ONYX-015 mit 5-Fluorouracil oder cis-DDP zeigte in einer klinischen Phase II Studie einen stärkeren anti-tumoralen Effekt als jede Einzelmodalität und bewirkte ein erhöhtes Überleben (Heise et al., 1997; You et al., 2000). Auch die Kombination der tumorspezifischen HSV-Mutante HSV-1716 mit Chemotherapie enthüllte beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) einen synergistischen Effekt (Toyoizumi et al., 1999).

Als mögliche Mechanismen der synergistischen Aktivität wird einerseits die erhöhte Transduktion durch rekombinante Adenoviren nach Zytostatika-Behandlung postuliert. Beispielsweise inhibiert Paclitaxel die Progression mitotischer Zellen von der M-Phase in die G1-Phase, wodurch eine Verbesserung der adenoviralen Zellbindung und Gentransfereffizienz erzielt wurde (Jordan et al., 1993; Long and Fairchild, 1994).

Andererseits belegen Studien, dass die zelluläre Sensibilität gegenüber Zytostatika-Behandlung durch die Expression des adenoviralen E1A-Proteins zunimmt (Sanchez-Prieto et al., 1996). Die anti-tumorale Eigenschaft des E1A-Proteins wird gegenwärtig in klinischen Studien evaluiert.

Schlussfolgernd repräsentieren Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24 innovative onkolytische Agenzien für die Therapie polychemoresistenter Ovarial- und Mammakarzinome, die durch heutige Therapieoptionen nicht erreicht werden. Tumorreste, die durch Standard-Chemotherapeutika nicht erreicht werden, repräsentieren potentielle Ziele für eine lokale Virotherapie mit Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDR Δ 24. Zudem könnte die gesteigerte Infektionseffizienz bei Verwendung von 5/3 Fiber-chimären CRAds im klinischen Einsatz eine verbesserte Penetration gynäkologischer Tumore erzielen. Unter Berufung auf die hohe MDR-Promotoraktivität ist für die klinische Anwendung einer MDR-basierten Virotherapie eine schnelle und effiziente Onkolyse des Tumorgewebes zu erwarten. Das Auslösen der CRAd-Replikation innerhalb der ersten 48h nach Vektor-Administration ist essentiell, um die Inaktivierung adenoviraler Partikel durch eine zelluläre Immunantwort zu verhindern. Wird dennoch eine Immunantwort gegen Adenovirus-infizierte Tumorzellen ausgelöst, so könnte diese die anti-tumorale Wirkung der Virotherapie verstärken (Todo et al., 1999).

Die gesteigerte Gewebepenetration einerseits und die onkolytische Potenz der MDR-CRAds andererseits könnten in der klinischen Anwendung eine Reduktion der verabreichten Vektordosis in Relation zu nicht-replikativen adenoviralen Vektoren erlauben. Dadurch könnte die Gefahr einer Immunantwort gegen den Vektor und das Risiko toxischer Nebenwirkungen reduziert werden. Aufgrund der chemosensibilisierenden Wirkung könnte die vorangehende Administration von Doxorubicin die anti-tumorale Effizienz einer MDR-vermittelten Virotherapie verstärken.

Im Hinblick auf eine klinische Virotherapie mit Ad5/3MDR Δ 24 könnte die Insertion der Δ 24-Deletion in das MDR-CRAd-Genom für Patienten eine Zunahme der Spezifität der Virotherapie bedeuten, da die Virusreplikation in ruhenden Somazellen verhindert wird.

Fortführende Studien sind notwendig, um den Mechanismus der MDR-Promotoraktivierung im CRAd-Vektor aufzuklären. Im Tierversuch werden demnächst *in-vivo* Effizienz, Toxizität und Biodistribution einer MDR1-regulierten Virotherapie für chemoresistente Ovarialkarzinome evaluiert.

5 Zusammenfassung

Konditional replikative Adenoviren (CRAds) repräsentieren onkolytische Agenzien, die gegenüber nicht-replikativen Adenoviren (Ad) eine verbesserte Tumortransduktion bewirken. Die Virotherapie mit CRAd-Vektoren nutzt die tumorspezifische Virusreplikation, um eine Lyse des Tumorgewebes zu erzielen. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von CRAd-Vektoren, die hinsichtlich ihrer Gentransferrate und Spezifität für gynäkologische Tumorerkrankungen optimiert wurden. Der Promotor des Milchproteins „humanes α -Lactalbumin“ (ALA) eignet sich aufgrund der brustspezifischen Expression für die Therapie des Mammakarzinoms. Hingegen ermöglicht der Zytostatika-induzierbare Promotor des *multiple drug resistance gene 1* (MDR) das Erreichen von chemoresistenten Karzinomen.

Bei der Charakterisierung der Promotoren wurde die ALA-Promotoraktivität spezifisch in Mammakarzinomzellen nachgewiesen. Neben der basalen MDR-Expression in Ovarialkarzinomzellen wurde die Zytostatika-Responsivität des MDR-Promotors in Doxorubicin-resistenten Tumorzellen belegt.

Die Infektionsrate konnte bei gynäkologischen Karzinomen durch die Modifikation der Ad-Fiber gesteigert werden. Insbesondere primäre Tumorzellen, die häufig resistent gegenüber einer Ad5-Infektion sind, wurden effizient durch 5/3 Fiber-pseudotypisierte CRAds infiziert. Gleichzeitig wurde die unspezifische Toxizität des Ad5/3-Gentransfers an primären Normalgewebszellen reduziert.

Die CRAd-Konstruktion erfolgte durch die Insertion der Kandidatenpromotoren in ein 5/3 Fiber-pseudotypisiertes Ad-Genom, wobei die Expression des viralen *immediate early gene E1A* über den ALA- bzw. MDR-Promotor reguliert wurde. Eine 24bp-Deletion ($\Delta 24$) im E1A-Gen sollte die CRAd-Replikation in ruhenden Normalzellen verhindern.

Das resultierende CRAd Ad5/3ALAA $\Delta 24$ induzierte sowohl in etablierten als auch primären Mammakarzinomzellen spezifische Onkolysen, während die Vitalität primärer Normalgewebszellen nicht beeinträchtigt wurde. Die Tumorspezifität einer Ad5/3ALAA $\Delta 24$ vermittelten Virotherapie wurde durch die selektive Replikation in MaCa-Zellen belegt. Aufgrund der Tumorspezifität ist Ad5/3ALAA $\Delta 24$ potentiell für die Virotherapie des metastasierten Mammakarzinoms geeignet.

Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDRA $\Delta 24$ erzielten bei Primärtumoren mit Polychemoresistenz Zytotoxizitäten, die die Onkolysen der potenten Kontrollviren Ad5Wt und Ad5/3 $\Delta 24$ überstiegen. So könnten Ad5/3MDRE1 und Ad5/3MDRA $\Delta 24$ in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapien die Eliminierung polychemoresistenter Tumore ermöglichen, die durch heutige Therapieoptionen nicht erreicht werden.

Summary

Conditionally replicating Adenoviruses (CRAds) represent innovative oncolytic agents for combined chemo gene therapy to improve the outcome of advanced tumour disease. Virotherapy makes use of CRAd vectors as CRAds selectively replicate in cancer tissues and induce oncolysis of permissive tumour cells. Aim of this study was the optimisation of therapeutic CRAd vectors concerning gene transfer efficiency and specificity for gynaecological tumour disease.

Performing luciferase reporter assays, the activity of the promoter of the human α -lactalbumin (ALA) was specifically demonstrated in breast cancer cells. Beside the basal transcriptional activity of the multiple drug resistance gene 1 (MDR) in ovarian cancer cells, the MDR promoter activity was induced in chemo resistant ovarian tumour cells.

The infection efficiency of adenoviral vectors was enhanced by 5/3 fiber pseudotyping in relation to Ad5 vectors concerning gynaecological carcinomas. Particularly, clinical relevant primary tumours which are often resistant to Ad5 infection were most efficiently transduced by 5/3 chimeric CRAds. In addition, the unspecific toxicity to healthy normal tissue was dramatically reduced by 5/3 chimeric CRAds.

Regarding CRAd vector construction, the transcriptional targeting approach was introduced into a 5/3 fiber pseudotyped CRAd vector to increase both specificity and efficacy. Tight replication control was achieved by the insertion of the ALA or MDR1 promoters regulating the expression of the early adenoviral E1A gene. A 24bp deletion of the E1A gene ($\Delta 24$) aimed at the suppression of adenoviral replication in quiescent cells.

The ALA promoter controlled CRAd Ad5/3ALAD24 selectively killed established breast cancer cells as well as clinical relevant breast cancer specimens. Moreover, the oncolytic activity of Ad5/3ALAD24 was strongly suppressed in healthy mammary cells proving tumour specificity. Replication studies confirmed that the transcriptional activity of ALA selectively induced CRAd replication in cancer cells. Due to its tumour specificity Ad5/3ALAD24 is potentially suited for the systemic virotherapy of disseminated disease.

The outstanding potential of a MDR1 promoter regulated CRAd therapy was attested for advanced chemo resistant carcinomas where traditional therapy options fail today. The oncolytic activities of Ad5/3MDRE1 and Ad5/3MDRAD24 were superior to the potent control virus Ad5wt and Ad5/3 $\Delta 24$ in chemo resistant gynaecological primary tumours. Therefore, the combination of chemotherapy and a MDR-promoter regulated virotherapy represents a powerful tool for the elimination of chemo resistant cancer cells.

6 Literatur

- Abolhoda,A., Wilson,A.E., Ross,H., Danenberg,P.V., Burt,M., and Scotto,K.W. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 5, 3352-3356.
- AdEasy Vector System Application Manual, QBiogene. <http://www.qbiogene.com/literature/protocols/gene-expression/pdf/m-adeasy.pdf>. 2002.
- Aghajanian,C., Soignet,S., Dizon,D.S., Pien,C.S., Adams,J., Elliott,P.J., Sabbatini,P., Miller,V., Hensley,M.L., Pezzulli,S., Canales,C., Daud,A., and Spriggs,D.R. (2002). A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8, 2505-2511.
- Aiuti,A., Slavin,S., Aker,M., Ficara,F., Deola,S., Mortellaro,A., Morecki,S., Andolfi,G., Tabucchi,A., Carlucci,F., Marinello,E., Cattaneo,F., Vai,S., Servida,P., Miniero,R., Roncarolo,M.G., and Bordignon,C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Alvarez,R.D., Gomez-Navarro,J., Wang,M., Barnes,M.N., Strong,T.V., Arani,R.B., Arafat,W., Hughes,J.V., Siegal,G.P., and Curiel,D.T. (2000). Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol. Ther.* 2, 524-530.
- An,H.X., Niederacher,D., Beckmann,M.W., Gohring,U.J., Scharl,A., Picard,F., van Roeyen,C., Schnurch,H.G., and Bender,H.G. (1995). ERBB2 gene amplification detected by fluorescent differential polymerase chain reaction in paraffin-embedded breast carcinoma tissues. *Int. J. Cancer* 64, 291-297.
- Anderson,L.M., Swaminathan,S., Zackon,I., Tajuddin,A.K., Thimmapaya,B., and Weitzman,S.A. (1999). Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the HSVtk gene for the treatment of breast cancer. *Gene Ther.* 6, 854-864.
- Anderson,W.F. (1990). September 14, 1990: the beginning. *Hum. Gene Ther.* 1, 371-372.
- Asaoka,K., Tada,M., Sawamura,Y., Ikeda,J., and Abe,H. (2000). Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. *J. Neurosurg.* 92, 1002-1008.
- Babiss,L.E., Friedman,J.M., and Darnell,J.E., Jr. (1987). Cellular promoters incorporated into the adenovirus genome. Effect of viral DNA replication on endogenous and exogenous gene transcription. *J. Mol. Biol.* 193, 643-650.
- Baker,E.K. and El Osta,A. (2003). The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Exp. Cell Res.* 290, 177-194.
- Baker,E.K. and El Osta,A. (2004). MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling. *Cancer Biol. Ther.* 3, 819-824.
- Baker,E.K., Johnstone,R.W., Zalcborg,J.R., and El Osta,A. (2005). Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 24, 8061-8075.
- Bao,Y., Peng,W., Verbitsky,A., Chen,J., Wu,L., Rauen,K.A., and Sawicki,J.A. (2005). Human coxsackie adenovirus receptor (CAR) expression in transgenic mouse prostate tumors enhances adenoviral delivery of genes. *Prostate* 64, 401-407.
- Bargou,R.C., Jurchott,K., Wagener,C., Bergmann,S., Metzner,S., Bommert,K., Mapara,M.Y., Winzer,K.J., Dietel,M., Dorken,B., and Royer,H.D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* 3, 447-450.
- Barouch,D.H., Pau,M.G., Custers,J.H., Koudstaal,W., Kostense,S., Havenga,M.J., Truitt,D.M., Sumida,S.M., Kishko,M.G., Arthur,J.C., Koriath-Schmitz,B., Newberg,M.H., Gorgone,D.A., Lifton,M.A., Panicali,D.L., Nabel,G.J., Letvin,N.L., and Goudsmit,J. (2004). Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J. Immunol.* 172, 6290-6297.
- Barrington,R.E., Subler,M.A., Rands,E., Omer,C.A., Miller,P.J., Hundley,J.E., Koester,S.K., Troyer,D.A., Bearss,D.J., Conner,M.W., Gibbs,J.B., Hamilton,K., Koblan,K.S., Mosser,S.D., O'Neill,T.J., Schaber,M.D., Senderak,E.T., Windle,J.J., Oliff,A., and Kohl,N.E. (1998). A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice

- harboring multiple oncogenic mutations by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **18**, 85-92.
- Barton,K.N., Paielli,D., Zhang,Y., Koul,S., Brown,S.L., Lu,M., Seely,J., Kim,J.H., and Freytag,S.O. (2006). Second-generation replication-competent oncolytic adenovirus armed with improved suicide genes and ADP gene demonstrates greater efficacy without increased toxicity. *Mol. Ther.* **13**, 347-356.
- Bauerschmitz,G.J., Barker,S.D., and Hemminki,A. (2002a). Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). *Int. J. Oncol.* **21**, 1161-1174.
- 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. (2002b). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* **62**, 1266-1270.
- Beldegrun,A., Tso,C.L., Zisman,A., Naitoh,J., Said,J., Pantuck,A.J., Hinkel,A., deKernion,J., and Figlin,R. (2001). Interleukin 2 gene therapy for prostate cancer: phase I clinical trial and basic biology. *Hum. Gene Ther.* **12**, 883-892.
- Benjamin,R., Helman,L., Meyers,P., and Reaman,G. (2001). A phase I/II dose escalation and activity study of intravenous injections of OCaP1 for subjects with refractory osteosarcoma metastatic to lung. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1591-1593.
- Bischoff,J.R., Kirn,D.H., Williams,A., Heise,C., Horn,S., Muna,M., Ng,L., Nye,J.A., Sampson-Johannes,A., Fattaey,A., and McCormick,F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**, 373-376.
- Bookman,M.A., Darcy,K.M., Clarke-Pearson,D., Boothby,R.A., and Horowitz,I.R. (2003). Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **21**, 283-290.
- Breidenbach,M., Rein,D.T., Schondorf,T., Khan,K.N., Herrmann,I., Schmidt,T., Reynolds,P.N., Vlodavsky,I., Haviv,Y.S., and Curiel,D.T. (2005a). A new targeting approach for breast cancer gene therapy using the Heparanase promoter. *Cancer Lett.*
- Breidenbach,M., Rein,D.T., Schondorf,T., Khan,K.N., Herrmann,I., Schmidt,T., Reynolds,P.N., Vlodavsky,I., Haviv,Y.S., and Curiel,D.T. (2005b). A new targeting approach for breast cancer gene therapy using the Heparanase promoter. *Cancer Lett.*
- Buller,R.E., Runnebaum,I.B., Karlan,B.Y., Horowitz,J.A., Shahin,M., Buekers,T., Petruskas,S., Kreienberg,R., Slamon,D., and Pegram,M. (2002a). A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* **9**, 553-566.
- Buller,R.E., Shahin,M.S., Horowitz,J.A., Runnebaum,I.B., Mahavni,V., Petruskas,S., Kreienberg,R., Karlan,B., Slamon,D., and Pegram,M. (2002b). Long term follow-up of patients with recurrent ovarian cancer after Ad p53 gene replacement with SCH 58500. *Cancer Gene Ther.* **9**, 567-572.
- Casado,E., Gomez-Navarro,J., Yamamoto,M., Adachi,Y., Coolidge,C.J., Arafat,W.O., Barker,S.D., Wang,M.H., Mahasreshti,P.J., Hemminki,A., Gonzalez-Baron,M., Barnes,M.N., Pustilnik,T.B., Siegal,G.P., Alvarez,R.D., and Curiel,D.T. (2001). Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2496-2504.
- Cavazzana-Calvo,M., Hacein-Bey,S., de Saint,B.G., Gross,F., Yvon,E., Nusbaum,P., Selz,F., Hue,C., Certain,S., Casanova,J.L., Bousso,P., Deist,F.L., and Fischer,A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672.
- Chaudhary,P.M. and Roninson,I.B. (1993). Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 632-639.
- Chekhun,V.F., Kulik,G.I., Yurchenko,O.V., Tryndyak,V.P., Todor,I.N., Luniv,L.S., Tregubova,N.A., Pryzimirska,T.V., Montgomery,B., Rusetskaya,N.V., and Pogribny,I.P. (2006). Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* **231**, 87-93.

- Chirmule,N., Probert,K., Magosin,S., Qian,Y., Qian,R., and Wilson,J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 6, 1574-1583.
- Clayman,G.L., Frank,D.K., Bruso,P.A., and Goepfert,H. (1999). Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* 5, 1715-1722.
- Coldman,A.J. and Goldie,J.H. (1987). Impact of dose-intense chemotherapy on the development of permanent drug resistance. *Semin. Oncol.* 14, 29-33.
- Dall,P., Herrmann,I., Durst,B., Stoff-Khalili,M.A., Bauerschmitz,G., Hanstein,B., and Niederacher,D. (2005). In vivo cervical cancer growth inhibition by genetically engineered cytotoxic T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 51-60.
- Danthinne,X. and Imperiale,M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707-1714.
- David,G.L., Yegnasubramanian,S., Kumar,A., Marchi,V.L., De Marzo,A.M., Lin,X., and Nelson,W.G. (2004). MDR1 promoter hypermethylation in MCF-7 human breast cancer cells: changes in chromatin structure induced by treatment with 5-Aza-cytidine. *Cancer Biol. Ther.* 3, 540-548.
- Davidoff,A.M., Stevenson,S.C., McClelland,A., Shochat,S.J., and Vanin,E.F. (1999). Enhanced neuroblastoma transduction for an improved antitumor vaccine. *J. Surg. Res.* 83, 95-99.
- Debbas,M. and White,E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7, 546-554.
- Denkert,C., Winzer,K.J., Muller,B.M., Weichert,W., Pest,S., Kobel,M., Kristiansen,G., Reles,A., Siegert,A., Guski,H., and Hauptmann,S. (2003). Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97, 2978-2987.
- Deutsche Krebsgesellschaft. www.info.krebsgesellschaft.de. 2002.
- Deutsche Krebsgesellschaft. www.info.krebsgesellschaft.de. 2005.
- Deutsche Krebsgesellschaft. www.info.krebsgesellschaft.de. 2006.
- DeWeese,T.L., van der,P.H., Li,S., Mikhak,B., Drew,R., Goemann,M., Hamper,U., DeJong,R., Detorie,N., Rodriguez,R., Haulk,T., DeMarzo,A.M., Piantadosi,S., Yu,D.C., Chen,Y., Henderson,D.R., Carducci,M.A., Nelson,W.G., and Simons,J.W. (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res.* 61, 7464-7472.
- Dmitriev,I., Kashentseva,E., Rogers,B.E., Krasnykh,V., and Curiel,D.T. (2000). Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J. Virol.* 74, 6875-6884.
- 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.
- Doronin,K., Kuppuswamy,M., Toth,K., Tollefson,A.E., Krajcsi,P., Krougliak,V., and Wold,W.S. (2001). Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *J. Virol.* 75, 3314-3324.
- Douglas,J.T., Rogers,B.E., Rosenfeld,M.E., Michael,S.I., Feng,M., and Curiel,D.T. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat. Biotechnol.* 14, 1574-1578.
- Dummer,R., Bergh,J., Karlsson,Y., Horowitz,J.A., Mulder,N.H., Huinink,D.T.B., Burg,G., Hofbauer,G., and Osanto,S. (2000). Biological activity and safety of adenoviral vector-expressed wild-type p53 after intratumoral injection in melanoma and breast cancer patients with p53-overexpressing tumors. *Cancer Gene Ther.* 7, 1069-1076.
- Dykxhoorn,D.M., Palliser,D., and Lieberman,J. (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.*

- Eck, S.L., Alavi, J.B., Judy, K., Phillips, P., Alavi, A., Hackney, D., Cross, P., Hughes, J., Gao, G., Wilson, J.M., and Probert, K. (2001). Treatment of recurrent or progressive malignant glioma with a recombinant adenovirus expressing human interferon-beta (H5.010CMVhIFN-beta): a phase I trial. *Hum. Gene Ther.* 12, 97-113.
- Ethier, S.P., Mahacek, M.L., Gullick, W.J., Frank, T.S., and Weber, B.L. (1993). Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res.* 53, 627-635.
- Fessler, S.P. and Young, C.S. (1998). Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J. Virol.* 72, 4049-4056.
- Fojo, T. and Bates, S. (2003). Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 22, 7512-7523.
- Freytag, S.O., Khil, M., Stricker, H., Peabody, J., Menon, M., DePeralta-Venturina, M., Nafziger, D., Pegg, J., Paielli, D., Brown, S., Barton, K., Lu, M., Aguilar-Cordova, E., and Kim, J.H. (2002). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res.* 62, 4968-4976.
- Freytag, S.O., Rogulski, K.R., Paielli, D.L., Gilbert, J.D., and Kim, J.H. (1998). A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum. Gene Ther.* 9, 1323-1333.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K., and Kyritsis, A.P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2-12.
- Furman, P.A., McGuirt, P.V., Keller, P.M., Fyfe, J.A., and Elion, G.B. (1980). Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Virology* 102, 420-430.
- Gahery-Segard, H., Molinier-Frenkel, V., Le Boulaire, C., Saulnier, P., Opolon, P., Lengagne, R., Gautier, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., Venet, A., Schatz, C., Courtney, M., Le Chevalier, T., Tursz, T., Guillet, J.G., and Farace, F. (1997). Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study of the immune responses to transgene and viral products. *J. Clin. Invest* 100, 2218-2226.
- Galanis, E., Okuno, S.H., Nascimento, A.G., Lewis, B.D., Lee, R.A., Oliveira, A.M., Sloan, J.A., Atherton, P., Edmonson, J.H., Erlichman, C., Randlev, B., Wang, Q., Freeman, S., and Rubin, J. (2005). Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Ther.* 12, 437-445.
- Ganly, I., Soutar, D.S., and Kaye, S.B. (2000). Current role of gene therapy in head and neck cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 26, 338-343.
- Gasparini, G., Longo, R., Sarmiento, R., and Morabito, A. (2003). Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol.* 4, 605-615.
- Goldie, J.H. (1994). Modelling the process of drug resistance. *Lung Cancer* 10 Suppl 1, S91-S96.
- Goldsmith, M.E., Madden, M.J., Morrow, C.S., and Cowan, K.H. (1993). A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *J. Biol. Chem.* 268, 5856-5860.
- Gonzalez, R., Vereecque, R., Wickham, T.J., Facon, T., Hetuin, D., Kovesdi, I., Bauters, F., Fenaux, P., and Quesnel, B. (1999). Transduction of bone marrow cells by the AdZ.F(pK7) modified adenovirus demonstrates preferential gene transfer in myeloma cells. *Hum. Gene Ther.* 10, 2709-2717.
- Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.* 72, 9479-9490.
- Gordon, A.N., Finkler, N., Edwards, R.P., Garcia, A.A., Crozier, M., Irwin, D.H., and Barrett, E. (2005). Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *Int. J. Gynecol. Cancer* 15, 785-792.
- Gorziglia, M.I., Kadan, M.J., Yei, S., Lim, J., Lee, G.M., Luthra, R., and Trapnell, B.C. (1996). Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. *J. Virol.* 70, 4173-4178.

- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255-256.
- Haisma, H.J., Grill, J., Curiel, D.T., Hoogeland, S., Van Beusechem, V.W., Pinedo, H.M., and Gerritsen, W.R. (2000). Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther.* **7**, 901-904.
- Haisma, H.J., Pinedo, H.M., Rijswijk, A., der Meulen-Muileman, I., Sosnowski, B.A., Ying, W., Beusechem, V.W., Tillman, B.W., Gerritsen, W.R., and Curiel, D.T. (1999). Tumor-specific gene transfer via an adenoviral vector targeted to the pan-carcinoma antigen EpCAM. *Gene Ther.* **6**, 1469-1474.
- Hall, L., Craig, R.K., Davies, M.S., Ralphs, D.N., and Campbell, P.N. (1981). alpha-Lactalbumin is not a marker of human hormone-dependent breast cancer. *Nature* **290**, 602-604.
- Hallenbeck, P.L., Chang, Y.N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., and Chiang, Y.L. (1999). A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1721-1733.
- Hamid, O., Varterasian, M.L., Wadler, S., Hecht, J.R., Benson, A., III, Galanis, E., Uprichard, M., Omer, C., Bycott, P., Hackman, R.C., and Shields, A.F. (2003). Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1498-1504.
- Harada, T., Nagayama, J., Kohno, K., Mickley, L.A., Fojo, T., Kuwano, M., and Wada, M. (2000). Alu-associated interstitial deletions and chromosomal re-arrangement in 2 human multidrug-resistant cell lines. *Int. J. Cancer* **86**, 506-511.
- Harding, J. and Burtneiss, B. (2005). Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc.)* **41**, 107-127.
- Harvey, B.G., Hackett, N.R., El Sawy, T., Rosengart, T.K., Hirschowitz, E.A., Lieberman, M.D., Lesser, M.L., and Crystal, R.G. (1999). Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J. Virol.* **73**, 6729-6742.
- Hecht, J.R., Bedford, R., Abbruzzese, J.L., Lahoti, S., Reid, T.R., Soetikno, R.M., Kim, D.H., and Freeman, S.M. (2003). A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 555-561.
- Heise, C., Ganly, I., Kim, Y.T., Sampson-Johannes, A., Brown, R., and Kirn, D. (2000). Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status. *Gene Ther.* **7**, 1925-1929.
- Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D., and Kirn, D.H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* **3**, 639-645.
- Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M., and Kirn, D.H. (1999). Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res.* **59**, 2623-2628.
- Hemminki, A. and Alvarez, R.D. (2002). Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs.* **16**, 77-87.
- Hemminki, A., Kanerva, A., Liu, B., Wang, M., Alvarez, R.D., Siegal, G.P., and Curiel, D.T. (2003). Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression. *Cancer Res.* **63**, 847-853.
- Henning, P., Andersson, K.M., Frykholm, K., Ali, A., Magnusson, M.K., Nygren, P.A., Granio, O., Hong, S.S., Boulanger, P., and Lindholm, L. (2005). Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains. *Gene Ther.* **12**, 211-224.
- Hernandez-Alcoceba, R., Pihlaja, M., Qian, D., and Clarke, M.F. (2002). New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1737-1750.

- Hernandez-Alcoceba,R., Pihalja,M., Wicha,M.S., and Clarke,M.F. (2000). A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* *11*, 2009-2024.
- Hu,X.F., Slater,A., Wall,D.M., Kantharidis,P., Parkin,J.D., Cowman,A., and Zalcborg,J.R. (1995). Rapid up-regulation of *mdr1* expression by anthracyclines in a classical multidrug-resistant cell line. *Br. J. Cancer* *71*, 931-936.
- HUEBNER,R.J., ROWE,W.P., SCHATTE,W.E., SMITH,R.R., and THOMAS,L.B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* *9*, 1211-1218.
- Immonen,A., Vapalahti,M., Tynnela,K., Hurskainen,H., Sandmair,A., Vanninen,R., Langford,G., Murray,N., and Yla-Herttuala,S. (2004). AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol. Ther.* *10*, 967-972.
- Iqbal,S. and Lenz,H.J. (2004). Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *54 Suppl 1*, S32-S39.
- Israeli,D., Ziaei,S., Gonin,P., and Garcia,L. (2005). A proposal for the physiological significance of *mdr1* and *Bcrp1/Abcg2* gene expression in normal tissue regeneration and after cancer therapy. *J. Theor. Biol.* *232*, 41-45.
- Jiang,H., Gomez-Manzano,C., Alemany,R., Medrano,D., Alonso,M., Bekele,B.N., Lin,E., Conrad,C.C., Yung,W.K., and Fueyo,J. (2005). Comparative effect of oncolytic adenoviruses with E1A-55 kDa or E1B-55 kDa deletions in malignant gliomas. *Neoplasia* *7*, 48-56.
- Jordan,M.A., Toso,R.J., Thrower,D., and Wilson,L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 9552-9556.
- Kanerva,A., Wang,M., Bauerschmitz,G.J., Lam,J.T., Desmond,R.A., Bhoola,S.M., Barnes,M.N., Alvarez,R.D., Siegal,G.P., Curiel,D.T., and Hemminki,A. (2002). Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol. Ther.* *5*, 695-704.
- Kanerva,A., Zinn,K.R., Chaudhuri,T.R., Lam,J.T., Suzuki,K., Uil,T.G., Hakkarainen,T., Bauerschmitz,G.J., Wang,M., Liu,B., Cao,Z., Alvarez,R.D., Curiel,D.T., and Hemminki,A. (2003). Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol. Ther.* *8*, 449-458.
- Kanerva,A., Bauerschmitz,G.J., Yamamoto,M., Lam,J.T., Alvarez,R.D., Siegal,G.P., Curiel,D.T., and Hemminki,A. (2004). A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma. *Gene Ther.* *11*, 552-559.
- Kasuya,H., Takeda,S., Nomoto,S., and Nakao,A. (2005). The potential of oncolytic virus therapy for pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* *12*, 725-736.
- Kawakami,Y., Li,H., Lam,J.T., Krasnykh,V., Curiel,D.T., and Blackwell,J.L. (2003). Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* *63*, 1262-1269.
- Kelly,F.J., Miller,C.R., Buchsbaum,D.J., Gomez-Navarro,J., Barnes,M.N., Alvarez,R.D., and Curiel,D.T. (2000). Selectivity of TAG-72-targeted adenovirus gene transfer to primary ovarian carcinoma cells versus autologous mesothelial cells in vitro. *Clin. Cancer Res.* *6*, 4323-4333.
- Kerb,R., Hoffmeyer,S., and Brinkmann,U. (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics.* *2*, 51-64.
- Khuri,F.R., Nemunaitis,J., Ganly,I., Arseneau,J., Tannock,I.F., Romel,L., Gore,M., Ironside,J., MacDougall,R.H., Heise,C., Randlev,B., Gillenwater,A.M., Bruso,P., Kaye,S.B., Hong,W.K., and Kim,D.H. (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* *6*, 879-885.
- Kurihara,T., Brough,D.E., Kovesdi,I., and Kufe,D.W. (2000). Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J. Clin. Invest* *106*, 763-771.

- Kim,M., Zinn,K.R., Barnett,B.G., Sumerel,L.A., Krasnykh,V., Curiel,D.T., and Douglas,J.T. (2002). The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells. *Eur. J. Cancer* 38, 1917-1926.
- Kirn,D. (2001). Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther.* 8, 89-98.
- Kleinberg,D.L., Todd,J., and Groves,M.L. (1977). Studies on human alpha-lactalbumin: radioimmunoassay measurements in normal human breast and breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 45, 1238-1250.
- Kochanek,S., Clemens,P.R., Mitani,K., Chen,H.H., Chan,S., and Caskey,C.T. (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5731-5736.
- Kraaij,R., van Rijswijk,A.L., Oomen,M.H., Haisma,H.J., and Bangma,C.H. (2005). Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a tissue-specific target for adenoviral transduction of prostate cancer in vitro. *Prostate* 62, 253-259.
- Krasnykh,V., Belousova,N., Korokhov,N., Mikheeva,G., and Curiel,D.T. (2001). Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibrin. *J. Virol.* 75, 4176-4183.
- Krasnykh,V., Dmitriev,I., Mikheeva,G., Miller,C.R., Belousova,N., and Curiel,D.T. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72, 1844-1852.
- Krasnykh,V., Dmitriev,I., Navarro,J.G., Belousova,N., Kashentseva,E., Xiang,J., Douglas,J.T., and Curiel,D.T. (2000). Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer Res.* 60, 6784-6787.
- Kurbacher,C.M., Bruckner,H.W., Cree,I.A., Kurbacher,J.A., Wilhelm,L., Poch,G., Indefrei,D., Mallmann,P., and Andreotti,P.E. (1997). Mitoxantrone combined with paclitaxel as salvage therapy for platinum-refractory ovarian cancer: laboratory study and clinical pilot trial. *Clin. Cancer Res.* 3, 1527-1533.
- Kusaba,H., Nakayama,M., Harada,T., Nomoto,M., Kohno,K., Kuwano,M., and Wada,M. (1999). Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 262, 924-932.
- Kusaba,H., Nakayama,M., Harada,T., Torigoe,K., Green,E.D., Scherer,S.W., Kohno,K., Kuwano,M., and Wada,M. (1997). Maintenance of hypomethylation status and preferential expression of exogenous human MDR1/PGY1 gene in mouse L cells by YAC mediated transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23, 259-274.
- Labialle,S., Dayan,G., Michaud,M., Barakat,S., Rigal,D., and Baggetto,L.G. (2005). Gene therapy of the typical multidrug resistance phenotype of cancers: a new hope? *Semin. Oncol.* 32, 583-590.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam,J.T., Bauerschmitz,G.J., Kanerva,A., Barker,S.D., Straughn,J.M., Wang,M., Barnes,M.N., Blackwell,J.L., Siegal,G.P., Alvarez,R.D., Curiel,D.T., and Hemminki,A. (2003). Replication of an integrin targeted conditionally replicating adenovirus on primary ovarian cancer spheroids. *Cancer Gene Ther.* 10, 377-387.
- Lamont,J.P., Nemunaitis,J., Kuhn,J.A., Landers,S.A., and McCarty,T.M. (2000). A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann. Surg. Oncol.* 7, 588-592.
- Lang,F.F., Bruner,J.M., Fuller,G.N., Aldape,K., Prados,M.D., Chang,S., Berger,M.S., McDermott,M.W., Kunwar,S.M., Junck,L.R., Chandler,W., Zwiebel,J.A., Kaplan,R.S., and Yung,W.K. (2003). Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J. Clin. Oncol.* 21, 2508-2518.
- Larsson,S., Svensson,C., and Akusjarvi,G. (1992). Control of adenovirus major late gene expression at multiple levels. *J. Mol. Biol.* 225, 287-298.
- Li,S. and Huang,L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7, 31-34.

- Li,X., Zhang,Y.P., Kim,H.S., Bae,K.H., Stantz,K.M., Lee,S.J., Jung,C., Jimenez,J.A., Gardner,T.A., Jeng,M.H., and Kao,C. (2005). Gene therapy for prostate cancer by controlling adenovirus E1a and E4 gene expression with PSES enhancer. *Cancer Res.* 65, 1941-1951.
- Li,Y., Pong,R.C., Bergelson,J.M., Hall,M.C., Sagalowsky,A.I., Tseng,C.P., Wang,Z., and Hsieh,J.T. (1999). Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res.* 59, 325-330.
- Liao,Y. and Hung,M.C. (2003). Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 23, 6836-6848.
- Liao,Y. and Hung,M.C. (2004). A new role of protein phosphatase 2a in adenoviral E1A protein-mediated sensitization to anticancer drug-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 64, 5938-5942.
- Licht,T., Fiebig,H.H., Bross,K.J., Herrmann,F., Berger,D.P., Shoemaker,R., and Mertelsmann,R. (1991). Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro. *Int. J. Cancer* 49, 630-637.
- Lin,E. and Nemunaitis,J. (2004). Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.* 11, 643-664.
- Long,B.H. and Fairchild,C.R. (1994). Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res.* 54, 4355-4361.
- Lopez,C.A., Kimchi,E.T., Mauceri,H.J., Park,J.O., Mehta,N., Murphy,K.T., Beckett,M.A., Hellman,S., Posner,M.C., Kufe,D.W., and Weichselbaum,R.R. (2004). Chemoinducible gene therapy: a strategy to enhance doxorubicin antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1167-1175.
- Lowe,S.W., Ruley,H.E., Jacks,T., and Housman,D.E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967.
- Maeda,T., Alexander,C.M., and Friedl,A. (2004). Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 64, 612-621.
- Maeda,T., Desouky,J., and Friedl,A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene* 25, 1408-1412.
- Magnusson,M.K., Hong,S.S., Boulanger,P., and Lindholm,L. (2001). Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *J. Virol.* 75, 7280-7289.
- Manome,Y., Kunieda,T., Wen,P.Y., Koga,T., Kufe,D.W., and Ohno,T. (1998). Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum. Gene Ther.* 9, 1409-1417.
- Mccormick,F. (2001). Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat. Rev. Cancer* 1, 130-141.
- McDonald,D., Stockwin,L., Matzow,T., Blair Zajdel,M.E., and Blair,G.E. (1999). Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Ther.* 6, 1512-1519.
- Miles,B.J., Shalev,M., Aguilar-Cordova,E., Timme,T.L., Lee,H.M., Yang,G., Adler,H.L., Kernen,K., Pramudji,C.K., Satoh,T., Gdor,Y., Ren,C., Ayala,G., Wheeler,T.M., Butler,E.B., Kadmon,D., and Thompson,T.C. (2001). Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum. Gene Ther.* 12, 1955-1967.
- Miller,C.R., Buchsbaum,D.J., Reynolds,P.N., Douglas,J.T., Gillespie,G.Y., Mayo,M.S., Raben,D., and Curiel,D.T. (1998). Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res.* 58, 5738-5748.
- Molnar-Kimber,K.L., Serman,D.H., Chang,M., Kang,E.H., ElBash,M., Lanuti,M., Elshami,A., Gelfand,K., Wilson,J.M., Kaiser,L.R., and Albelda,S.M. (1998). Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma. *Hum. Gene Ther.* 9, 2121-2133.

- Moolten, F.L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* **46**, 5276-5281.
- Morris, J.C., Ramsey, W.J., Wildner, O., Muslow, H.A., Aguilar-Cordova, E., and Blaese, R.M. (2000). A phase I study of intralesional administration of an adenovirus vector expressing the HSV-1 thymidine kinase gene (AdV.RSV-TK) in combination with escalating doses of ganciclovir in patients with cutaneous metastatic malignant melanoma. *Hum. Gene Ther.* **11**, 487-503.
- Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.* **18**, 119-128.
- Mulvihill, S., Warren, R., Venook, A., Adler, A., Randlev, B., Heise, C., and Kirn, D. (2001). Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Ther.* **8**, 308-315.
- Nakayama, M., Wada, M., Harada, T., Nagayama, J., Kusaba, H., Ohshima, K., Kozuru, M., Komatsu, H., Ueda, R., and Kuwano, M. (1998). Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* **92**, 4296-4307.
- Nemunaitis, J., Cunningham, C., Tong, A.W., Post, L., Netto, G., Paulson, A.S., Rich, D., Blackburn, A., Sands, B., Gibson, B., Randlev, B., and Freeman, S. (2003). Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in combination with chemotherapy or IL-2 treatment in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* **10**, 341-352.
- Nemunaitis, J., Fong, T., Robbins, J.M., Edelman, G., Edwards, W., Paulson, R.S., Bruce, J., Ognoskie, N., Wynne, D., Pike, M., Kowal, K., Merritt, J., and Ando, D. (1999). Phase I trial of interferon-gamma (IFN-gamma) retroviral vector administered intratumorally to patients with metastatic melanoma. *Cancer Gene Ther.* **6**, 322-330.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., Reid, T., Kaye, S., and Kirn, D. (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* **60**, 6359-6366.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., Romel, L., Randlev, B., Kaye, S., and Kirn, D. (2001). Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* **19**, 289-298.
- Nemunaitis, J., Cunningham, C., Tong, A.W., Post, L., Netto, G., Paulson, A.S., Rich, D., Blackburn, A., Sands, B., Gibson, B., Randlev, B., and Freeman, S. (2003). Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in combination with chemotherapy or IL-2 treatment in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* **10**, 341-352.
- Nettelbeck, D.M., Jerome, V., and Muller, R. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* **16**, 174-181.
- Nettelbeck, D.M., Rivera, A.A., Balague, C., Alemany, R., and Curiel, D.T. (2002). Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res.* **62**, 4663-4670.
- Nettelbeck, D.M., Rivera, A.A., Kupsch, J., Dieckmann, D., Douglas, J.T., Kontermann, R.E., Alemany, R., and Curiel, D.T. (2004). Retargeting of adenoviral infection to melanoma: combining genetic ablation of native tropism with a recombinant bispecific single-chain diabody (scDb) adapter that binds to fiber knob and HMWMAA. *Int. J. Cancer* **108**, 136-145.
- Ni, S., Bernt, K., Gaggar, A., Li, Z.Y., Kiem, H.P., and Lieber, A. (2005). Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons. *Hum. Gene Ther.* **16**, 664-677.
- Nwanegbo, E., Vardas, E., Gao, W., Whittle, H., Sun, H., Rowe, D., Robbins, P.D., and Gambotto, A. (2004). Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **11**, 351-357.
- Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., and Kohno, K. (1998). Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 5997-6000.

- Okegawa,T., Li,Y., Pong,R.C., Bergelson,J.M., Zhou,J., and Hsieh,J.T. (2000). The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res.* **60**, 5031-5036.
- Okegawa,T., Pong,R.C., Li,Y., Bergelson,J.M., Sagalowsky,A.I., and Hsieh,J.T. (2001). The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* **61**, 6592-6600.
- Onmeda. www.onmeda.de/krankheiten/brustkrebs.html. 2005.
- Patel,V.A., Dunn,M.J., and Sorokin,A. (2002). Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 38915-38920.
- Printz,M.A., Gonzalez,A.M., Cunningham,M., Gu,D.L., Ong,M., Pierce,G.F., and Aukerman,S.L. (2000). Fibroblast growth factor 2-retargeted adenoviral vectors exhibit a modified biolocalization pattern and display reduced toxicity relative to native adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **11**, 191-204.
- Rancourt,C., Rogers,B.E., Sosnowski,B.A., Wang,M., Piche,A., Pierce,G.F., Alvarez,R.D., Siegal,G.P., Douglas,J.T., and Curiel,D.T. (1998). Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2455-2461.
- Raper,S.E., Chirmule,N., Lee,F.S., Wivel,N.A., Bagg,A., Gao,G.P., Wilson,J.M., and Batshaw,M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab* **80**, 148-158.
- Raspollini,M.R., Amunni,G., Villanucci,A., Boddi,V., and Taddei,G.L. (2005). Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival. *Int. J. Gynecol. Cancer* **15**, 255-260.
- Ratnasinghe,D., Daschner,P.J., Anver,M.R., Kasprzak,B.H., Taylor,P.R., Yeh,G.C., and Tangrea,J.A. (2001). Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res.* **21**, 2141-2147.
- Reid,T., Galanis,E., Abbruzzese,J., Sze,D., Andrews,J., Romel,L., Hatfield,M., Rubin,J., and Kirn,D. (2001). Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther.* **8**, 1618-1626.
- Reid,T., Warren,R., and Kirn,D. (2002). Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* **9**, 979-986.
- Rein,D.T., Breidenbach,M., Wu,H., Han,T., Haviv,Y.S., Wang,M., Kirby,T.O., Kawakami,Y., Dall,P., Alvarez,R.D., and Curiel,D.T. (2004a). Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int. J. Cancer* **111**, 698-704.
- Rein,D.T., Breidenbach,M., Nettelbeck,D.M., Kawakami,Y., Siegal,G.P., Huh,W.K., Wang,M., Hemminki,A., Bauerschmitz,G.J., Yamamoto,M., Adachi,Y., Takayama,K., Dall,P., and Curiel,D.T. (2004b). Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J. Gene Med.* **6**, 1281-1289.
- Rein,D.T., Breidenbach,M., Kirby,T.O., Han,T., Siegal,G.P., Bauerschmitz,G.J., Wang,M., Nettelbeck,D.M., Tsuruta,Y., Yamamoto,M., Dall,P., Hemminki,A., and Curiel,D.T. (2005b). A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1327-1335.
- Rein,D.T., Breidenbach,M., Kirby,T.O., Han,T., Siegal,G.P., Bauerschmitz,G.J., Wang,M., Nettelbeck,D.M., Tsuruta,Y., Yamamoto,M., Dall,P., Hemminki,A., and Curiel,D.T. (2005a). A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1327-1335.
- Remmele,W. and Stegner,H.E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* **8**, 138-140.
- Reynolds,P.N., Zinn,K.R., Gavrilyuk,V.D., Balyasnikova,I.V., Rogers,B.E., Buchsbaum,D.J., Wang,M.H., Miletich,D.J., Grizzle,W.E., Douglas,J.T., Danilov,S.M., and Curiel,D.T. (2000). A targetable, injectable adenoviral vector for selective gene delivery to pulmonary endothelium in vivo. *Mol. Ther.* **2**, 562-578.

- Rivera, A.A., Davydova, J., Schierer, S., Wang, M., Krasnykh, V., Yamamoto, M., Curiel, D.T., and Nettelbeck, D.M. (2004). Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells. *Gene Ther.* **11**, 1694-1702.
- Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W., and Henderson, D.R. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* **57**, 2559-2563.
- Roth, J.A. (2006). Adenovirus p53 gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **6**, 55-61.
- Roth, J.A., Swisher, S.G., Merritt, J.A., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., El Naggar, A.K., Fossella, F.V., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Nesbitt, J.C., Pisters, K., Putnam, J.B., Schrupp, D.S., Shin, D.M., and Walsh, G.L. (1998). Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Semin. Oncol.* **25**, 33-37.
- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Scheffner, M., and zur, H.H. (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* **72**, 9470-9478.
- Russell, I.A., Royds, J.A., and Braithwaite, A.W. (2004). Exploitation of cell cycle and cell death controls by adenoviruses: the road to a productive infection. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **36**, 207-243.
- Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**, 2573-2604.
- Sanchez-Prieto, R., Quintanilla, M., Cano, A., Leonart, M.L., Martin, P., Anaya, A., and Cajal, S. (1996). Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* **13**, 1083-1092.
- Sandmair, A.M., Vapalahti, M., and Yla-Herttuala, S. (2000). Adenovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene therapy for brain tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**, 163-170.
- Schuler, M., Rochlitz, C., Horowitz, J.A., Schlegel, J., Perruchoud, A.P., Kommos, F., Bolliger, C.T., Kauczor, H.U., Dalquen, P., Fritz, M.A., Swanson, S., Herrmann, R., and Huber, C. (1998). A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2075-2082.
- Seidman, M.A., Hogan, S.M., Wendland, R.L., Worgall, S., Crystal, R.G., and Leopold, P.L. (2001). Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle. *Mol. Ther.* **4**, 13-21.
- Seliger, B., Ritz, U., and Ferrone, S. (2006). Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int. J. Cancer* **118**, 129-138.
- Seshidhar, R.P., Ganesh, S., Limbach, M.P., Brann, T., Pinkstaff, A., Kaloss, M., Kaleko, M., and Connelly, S. (2003). Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology* **311**, 384-393.
- Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ni, S., and Lieber, A. (2002). Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res.* **62**, 1063-1068.
- Short, J.J., Pereboev, A.V., Kawakami, Y., Vasu, C., Holterman, M.J., and Curiel, D.T. (2004). Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* **322**, 349-359.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kalin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., and Hemmi, S. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* **78**, 4454-4462.
- Smitt, P.S., Driesse, M., Wolbers, J., Kros, M., and Avezaat, C. (2003). Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Mol. Ther.* **7**, 851-858.
- Somia, N. and Verma, I.M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 91-99.
- Sommerfelt, M.A. (1999). Retrovirus receptors. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 12), 3049-3064.

- Song,J.S., Kim,H.P., Yoon,W.S., Lee,K.W., Kim,M.H., Kim,K.T., Kim,H.S., and Kim,Y.T. (2003). Adenovirus-mediated suicide gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter induced apoptosis of ovarian cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2344-2350.
- Stallwood,Y., Fisher,K.D., Gallimore,P.H., and Mautner,V. (2000). Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther.* 7, 637-643.
- Stampfer, M. Review of the HMEC culture system; www.lbl.gov/mrgs/mindex.html. 2004.
- Stec,D.E., Morimoto,S., and Sigmund,C.D. (2001). Vectors for high-level expression of cDNAs controlled by tissue-specific promoters in transgenic mice. *Biotechniques* 31, 256-8, 260.
- Sterman,D.H., Recio,A., Vachani,A., Sun,J., Cheung,L., DeLong,P., Amin,K.M., Litzky,L.A., Wilson,J.M., Kaiser,L.R., and Albelda,S.M. (2005). Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 7444-7453.
- Stewart,A.K., Lassam,N.J., Quirt,I.C., Bailey,D.J., Rotstein,L.E., Krajden,M., Dessureault,S., Gallinger,S., Cappe,D., Wan,Y., Addison,C.L., Moen,R.C., Gauldie,J., and Graham,F.L. (1999). Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther.* 6, 350-363.
- Stingl,G., Brocker,E.B., Mertelsmann,R., Wolff,K., Schreiber,S., Kampgen,E., Schneeberger,A., Dummer,W., Brennscheid,U., Veelken,H., Birnstiel,M.L., Zatloukal,K., Schmidt,W., Maass,G., Wagner,E., Baschle,M., Giese,M., Kempe,E.R., Weber,H.A., and Voigt,T. (1996). Phase I study to the immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a cancer vaccine consisting of autologous cancer cells transfected with the human IL-2 gene. *Hum. Gene Ther.* 7, 551-563.
- Stoff-Khalili,M.A., Stoff,A., Rivera,A.A., Mathis,J.M., Everts,M., Wang,M., Kawakami,Y., Waehler,R., Mathews,Q.L., Yamamoto,M., Rocconi,R.P., Siegal,G.P., Richter,D.F., Dall,P., Zhu,Z.B., and Curiel,D.T. (2005). Gene Transfer to Carcinoma of the Breast with Fiber-Modified Adenoviral Vectors in a Tissue Slice Model System. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1203-1210.
- Sugawara,I., Akiyama,S., Scheper,R.J., and Itoyama,S. (1997). Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett.* 112, 23-31.
- Surowiak,P., Materna,V., Denkert,C., Kaplenko,I., Spaczynski,M., Dietel,M., Zabel,M., and Lage,H. (2005a). Significance of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein coexpression in ovarian cancers. *Cancer Lett.*
- Surowiak,P., Materna,V., Matkowski,R., Szczuraszek,K., Kornafel,J., Wojnar,A., Pudelko,M., Dietel,M., Denkert,C., Zabel,M., and Lage,H. (2005b). Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res.* 7, R862-R870.
- Tada,Y., Wada,M., Kuroiwa,K., Kinugawa,N., Harada,T., Nagayama,J., Nakagawa,M., Naito,S., and Kuwano,M. (2000). MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clin. Cancer Res.* 6, 4618-4627.
- Tait,D.L., Obermiller,P.S., Hatmaker,A.R., Redlin-Frazier,S., and Holt,J.T. (1999). Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin. Cancer Res.* 5, 1708-1714.
- Tait,D.L., Obermiller,P.S., Redlin-Frazier,S., Jensen,R.A., Welch,P., Dann,J., King,M.C., Johnson,D.H., and Holt,J.T. (1997). A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, 1959-1968.
- The Journal of Gene Medicine. www.wiley.co.uk/genemed/clinical. 2005.
- Thean,E.T. and Toh,B.H. (1990). Serum human alpha-lactalbumin as a marker for breast cancer. *Br. J. Cancer* 61, 773-775.
- Tillman,B.W., Hayes,T.L., DeGrujil,T.D., Douglas,J.T., and Curiel,D.T. (2000). Adenoviral vectors targeted to CD40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. *Cancer Res.* 60, 5456-5463.
- Tao,N., Gao,G.P., Parr,M., Johnston,J., Baradet,T., Wilson,J.M., Barsoum,J., and Fawell,S.E. (2001). Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol. Ther.* 3, 28-35.

- Todo,T., Rabkin,S.D., Sundaresan,P., Wu,A., Meehan,K.R., Herscowitz,H.B., and Martuza,R.L. (1999). Systemic antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multimitated, replication-competent herpes simplex virus. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2741-2755.
- Tumorzentrum München. Manual Maligne Ovarialtumore. 2004. W.Zuckschwerdt-Verlag GmbH.
- Tumorzentrum München. Manual Mammakarzinome. 2005. W.Zuckschwerdt-Verlag GmbH.
- Torigoe,K., Sato,S., Kusaba,H., Kohno,K., Kuwano,M., Okumura,K., Green,E.D., Tsui,L.C., Scherer,S.W., Schlessinger,D., and . (1995). A YAC-based contig of 1.5 Mb spanning the human multidrug resistance gene region and delineating the amplification unit in three human multidrug-resistant cell lines. *Genome Res.* **5**, 233-244.
- Torigoe,K., Harada,T., Kusaba,H., Uchiumi,T., Kohno,K., Green,E.D., Scherer,S.W., Tsui,L.C., Schlessinger,D., Kuwano,M., and Wada,M. (1998). Localization of 67 exons on a YAC contig spanning 1.5 Mb around the multidrug resistance gene region of human chromosome 7q21.1. *Genomics* **49**, 14-22.
- Toyoizumi,T., Mick,R., Abbas,A.E., Kang,E.H., Kaiser,L.R., and Molnar-Kimber,K.L. (1999). Combined therapy with chemotherapeutic agents and herpes simplex virus type 1 ICP34.5 mutant (HSV-1716) in human non-small cell lung cancer. *Hum. Gene Ther.* **10**, 3013-3029.
- Varga,M.J., Weibull,C., and Everitt,E. (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.* **65**, 6061-6070.
- Vasey,P.A., Shulman,L.N., Campos,S., Davis,J., Gore,M., Johnston,S., Kim,D.H., O'Neill,V., Siddiqui,N., Seiden,M.V., and Kaye,S.B. (2002). Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1562-1569.
- Venetianer,A., Purity,M., and Hever-Szabo,A. (1994). The function of heat-shock proteins in stress tolerance. *Cell Biol. Int.* **18**, 605-615.
- Vigne,E., Dedieu,J.F., Brie,A., Gillardeaux,A., Briot,D., Benihoud,K., Latta-Mahieu,M., Saulnier,P., Perricaudet,M., and Yeh,P. (2003). Genetic manipulations of adenovirus type 5 fiber resulting in liver tropism attenuation. *Gene Ther.* **10**, 153-162.
- Viniegra,J.G., Losa,J.H., Sanchez-Arevalo,V.J., Parada,C.C., Soria,V.M., Cajal,S., and Sanchez-Prieto,R. (2002). Modulation of PI3K/Akt pathway by E1a mediates sensitivity to cisplatin. *Oncogene* **21**, 7131-7136.
- Volk,A.L., Rivera,A.A., Kanerva,A., Bauerschmitz,G., Dmitriev,I., Nettelbeck,D.M., and Curiel,D.T. (2003). Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 511-515.
- Volpers,C. and Kochanek,S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med.* **6 Suppl 1**, S164-S171.
- Wall,N.R. and Shi,Y. (2003). Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet* **362**, 1401-1403.
- Walther,W., Stein,U., and Schlag,P.M. (2002). Use of the human MDR1 promoter for heat-inducible expression of therapeutic genes. *Int. J. Cancer* **98**, 291-296.
- Walther,W., Wendt,J., and Stein,U. (1997). Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. *Gene Ther.* **4**, 544-552.
- Wang,L., Hernandez-Alcoceba,R., Shankar,V., Zabala,M., Kochanek,S., Sangro,B., Kramer,M.G., Prieto,J., and Qian,C. (2004). Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: a potential therapy for liver cancer. *Gastroenterology* **126**, 278-289.
- Whiteside,T.L. (2004). Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 865-878.
- Wickham,T.J., Lee,G.M., Titus,J.A., Sconocchia,G., Bakacs,T., Kovesdi,I., and Segal,D.M. (1997). Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J. Virol.* **71**, 7663-7669.

- Wickham,T.J., Mathias,P., Cheresch,D.A., and Nemerow,G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.
- Wickham,T.J., Roelvink,P.W., Brough,D.E., and Kovesdi,I. (1996). Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat. Biotechnol.* 14, 1570-1573.
- Windbichler,G.H., Hausmaninger,H., Stummvoll,W., Graf,A.H., Kainz,C., Lahodny,J., Denison,U., Muller-Holzner,E., and Marth,C. (2000). Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer* 82, 1138-1144.
- Wiseman,B.S. and Werb,Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296, 1046-1049.
- Wu,H., Seki,T., Dmitriev,I., Uil,T., Kashentseva,E., Han,T., and Curiel,D.T. (2002). Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* 13, 1647-1653.
- Yamamoto,M., Alemany,R., Adachi,Y., Grizzle,W.E., and Curiel,D.T. (2001). Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol. Ther.* 3, 385-394.
- You,L., Yang,C.T., and Jablons,D.M. (2000). ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients. *Cancer Res.* 60, 1009-1013.
- Yu,D.C., Sakamoto,G.T., and Henderson,D.R. (1999). Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res.* 59, 1498-1504.
- Yu,D.C., Chen,Y., Dilley,J., Li,Y., Embry,M., Zhang,H., Nguyen,N., Amin,P., Oh,J., and Henderson,D.R. (2001). Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res.* 61, 517-525.
- Zabner,J., Freimuth,P., Puga,A., Fabrega,A., and Welsh,M.J. (1997). Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J. Clin. Invest* 100, 1144-1149.
- Zhu,Z.B., Makhija,S.K., Lu,B., Wang,M., Rivera,A.A., Kim-Park,S., Ulasov,I.V., Zhou,F., Alvarez,R.D., Siegal,G.P., and Curiel,D.T. (2005). Incorporating the survivin promoter in an infectivity enhanced CRAd-analysis of oncolysis and anti-tumor effects in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 27, 237-246.

7 Abkürzungen

%	Prozent
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
μm	Micrometer
5/3	Fiberchimäre aus Ad5 Fiber (tail, shaft) und Ad3 Fiber (knob)
Ad3	Adenovirus des Serotyp 3
Ad5	Adenovirus des Serotyp 5
ADA	Adenosindesaminase
ADR	Adriamycin (=Doxorubicin)
A.L.F.	Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer
Abb.	Abbildung
ALA	alpha-Lactalbumin
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CCQ	Carboxycholesteryl- modifizierte Chloroquine
cDNA	komplementäre DNA
GMP	good manufacturing practice
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CMV	immediate early Promotor des Cytomegalovirus
CRAD	konditional replikative Adenoviren
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DOPE	1,2-Dioleylglycerol-3-Phosphoethanolamin
Doxo	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol

dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Extinktion
E-Gene	adenovirale frühe Gene (E1 bis E4)
E1A	adenovirales <i>immediate early</i> E1A Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir ([$\pm$]-9-[1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl]guanine)
h	Stunde
HS	Pferde-Serum
HSVtk	Thymidin-Kinase aus Herpes simplex-Virus
i.h.a.	intra hepatisch arteriell
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
L-Gene	adenovirale späte Gene (L1 bis L5)
Luc	Luziferase
MaCa	Mammakarzinom
MCS	multiple cloning site
MDR	multiple drug resistance gene 1
MDR1	multiple drug resistance gene 1
min	Minute
ml	Milliliter
mol%	molare Prozent
mRNA	messenger RNA
MTS	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-2yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OTC	Ornithintranscarbamylase
OvCa	Ovarialkarzinom
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	Plaque forming unit
p.i.	post infection
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SCID	Severe Combined Immune Deficiency
SDS	Natrium-dodecyl-Sulfat
sek	Sekunde
s.u.	siehe unten
t	Zeit
Taq	Taq-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
TSP	Tumorspezifischer Promotor
U	Unit (Enzymaktivität)
u.g.	unten genannte
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VP	Virus Partikel
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

8.1 Promotorsequenzen

Promotor des humanen α -Lactalbumin (ALA)-Gens (761bp, Acc.No. X05153)

```
GATCTTCGAG CTCCTGGGCT CAAGTGATCC ACCAGACTCG GCCTCCCAAA ATGCCGGGAT
TACAGGTGTG AGCCACTGTG CCTGGCCTAG ATGCTTTCAT ACAGGCTTTT CAATTATGCA
TTTTCCTTAA GTAGGAAGTC TTAAGATCCA AGTTATATCG GATTGTTGTA GTCTACGTTT
CCATATTCTA TTCCTATTTT TGAGCCTTCA GTCATGAGCT ACCATATTAA AGAACTAATT
CTGGGCCTTG TTACATGGCT GGATTGGTTG GACAAGTGCC AGCTCTGATC CTGGGACTGT
GGCATGTGAT GACATACACC CCCTCTCCAC ATTCTGCATG TCTCTAGGGG GGAAGGGGGA
AGCTCGGTAT AGAACCTTTA TTGTATTTTC TGATTGCCTC ACTTCTTATA TTGCCCCCAT
GCCCTTCTTT GTTCCTCAAG TAACCAGAGA CAGTGCTTCC CAGAACCAAC CCTACAAGAA
ACAAAGGGCT AAACAAAGCC AAATGGGAAG CAGGATCATG GTTTGAACTC TTTCTGGCCA
GAGAACAATA CCTGCTATGG ACTAGATACT GGGAGAGGGA AAGGAAAAGT AGGGTGAATT
ATGGAAGGAA GCTGGCAGGC TCAGCGTTTC TGTCTTGGCA TGACCAGTCT CTCTTCATTC
TCTTCCTAGA TGTAGGGCTT GGTACCAGAG CCCCTGAGGC TTTCTGCATG AATATAAATA
AATGAAACTG AGTGATGCTT CCATTTTCAGG TTCTTGGCCA
```

Promotor des multiple drug resistance gene 1 (420bp, Acc.No. X58723)

```
GATCTGATAT CATCGATGAA TTCCTTGCCC TTTCTAGAGA GGTGCAACGG AAGCCAGAAC
ATTCTCCTG GAAATTCAAC CTGTTTCGCA GTTTCTCGAG GAATCAGCAT TCAGTCAATC
CGGGCCGGGA GCAGTCATCT GTGGTGAGGC TGATTGGCTG GGCAGGAACA GCGCCGGGGC
GTGGGCTGAG CACAGCCGCT TCGCTCTCTT TGCCACAGGA AGCCTGAGCT CATTGAGTA
GCGGCTCTTC CAAGCTCAAA GAAGCAGAGG CCGCTGTTCT TTTCTTTAG GTCTTTCCAC
TAAAGTCGGA GTATCTTCTT CCAAAATTTT ACGTCTTGGT GGCCGTTCCA AGGAGCGCGA
GGTAGGGGCA CGCAAAGCTG GGAGCTACTG GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAGGCATGCA
```

8.2 Primersequenzen

Primerbezeichnung	Primersequenz
5'β-Aktin	5'-aga gat ggc cac ggc tgc tt-3'
3'β-Aktin	5'-att tgc ggt gga cga tgg ag-3'
5'GAPDH-Cy5	5'-cca tgg aga agg ctg ggg-3'*
3'GAPDH	5'-caa agt tgt cat gga tga cc-3'
5'ALA-Prom	5'-gaa gat ctt cga gct cct ggg ctc aag tga tcc acc aga c-3'
3'ALA-Prom	5'-ccc aag ctt ggg cca aga acc tga aat gga-3'
5'ALA-NotI	5'-gcg gcc gcg agc tcc tgg gct caa gtg atc cac cag ac-3'
3'ALA-XhoI	5'-ggg gct cga gcc aag aac ctg aaa tgg a-3'
5'MDR-Prom	5'- cga gct ctt acg cgt gct a-3'
3'MDR-Prom	5'-aaa gcc tga cac ttg gga ac-3'
5'MDR-NotI	5'-gcg gcc gcc ttg ccc ttt cta g-3'
3'MDR-XhoI	5'-ctc gag agt agc tcc cag ctt-3'
5'MDR-Expression-Cy5	5'-tca ttc gag tag cgg ctc tt-3'*
3'MDR-Expression	5'-ctt ctt tgc tcc tcc att gc-3'
5'Sequenzierprimer	5'-cga cgt tgt aaa acg acg gcc ag-3'*
3'Sequenzierprimer	5'-cag gaa aca gct atg ac-3'*
5'SeqITR	5'-cgg gaa aac tga ata aga gga agt ga-3'
3'Ad1124-1100	5'- att ttc act tac tgt aga caa aca t-3'
5'D24-L1	5'- gtc cgc ttt cta tgc caa ac-3'
3'D24-R1	5'- tca ccc tct tca tcc tcg tc-3'
5'-Ad5 Fiber-knob	5'-agg cag ttt ggc tcc aat atc tgg-3'
5'-Ad3 Fiber-knob	5'-tta atg tag aac tat act ttg atg c-3'
3'SeqMfiber3	5'-tgt ata agc tat gtg gtg ggg-3'
5'E3-L1	5'-cct gaa aca cct ggt cca ct-3'
3'E3-R1	5'-gcc aca gtt agg gct tct ga-3'
3'MDR-Intron	5'-aaa gcc tga cac ttg gga ac-3'
5'GAPDH-F	5'-atg ctg gcg ctg agt acg t-3'
3'GAPDH-R-Cy5	5'-ccc tgc aaa tga gcc tac ag-3'

8.3 Glossar Adenoviren

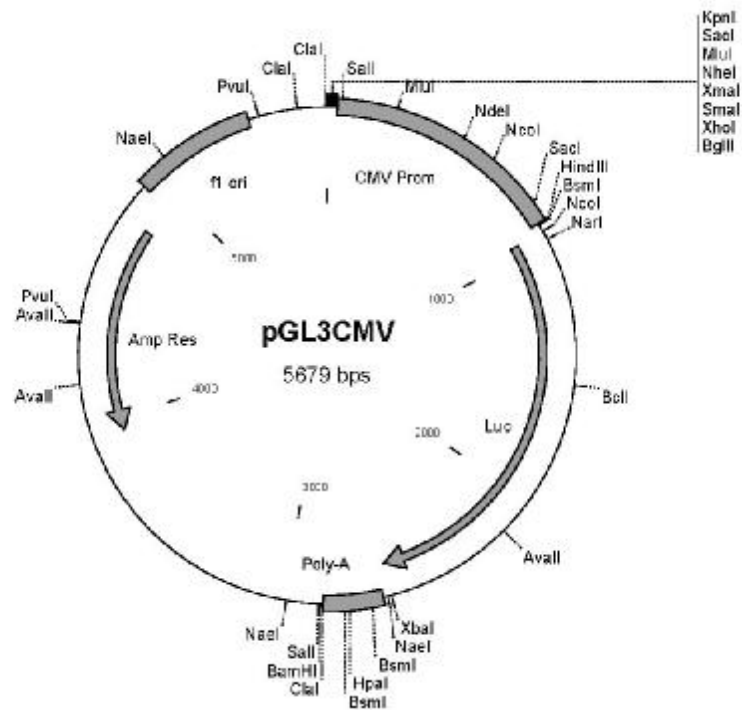
Name	Vektor-Typ	Fiber	Promotor	Promotor reguliertes Gen
Ad5 Δ 24RGD	CRAAd-Vektor	Integrin-Bindemotif (RGD) in der Fiber	adenoviraler E1A-Promotor	E1A-Gen mit Deletion der pRb-Bindedomäne (Δ 24)
Ad5 Δ 24	CRAAd-Vektor	Ad5 Fiber	adenoviraler E1A-Promotor	E1A-Gen mit Deletion der pRb-Bindedomäne (Δ 24)
Ad5Wt	Adenovirus Serotyp 5, Wildtyp	Ad5 Fiber	adenoviraler E1A-Promotor	E1A-Gen mit pRb-Bindedomäne
Ad5/3 Δ 24	CRAAd-Vektor	Fiberchimäre aus Ad5 tail und shaft und Ad3 knob	adenoviraler E1A-Promotor	E1A-Gen mit Deletion der pRb-Bindedomäne (Δ 24)
Ad5/3MDRE1	CRAAd-Vektor	Fiberchimäre aus Ad5 tail und shaft und Ad3 knob	Humaner MDR1-Promotor	E1A-Gen mit pRb-Bindedomäne
Ad5/3MDR Δ 24	CRAAd-Vektor	Fiberchimäre aus Ad5 tail und shaft und Ad3 knob	adenoviraler E1A-Promotor	E1A-Gen mit Deletion der pRb-Bindedomäne (Δ 24)
Ad5/3ALA Δ 24	CRAAd-Vektor	Fiberchimäre aus Ad5 tail und shaft und Ad3 knob	Humaner ALA-Promotor	E1A-Gen mit Deletion der pRb-Bindedomäne (Δ 24)
Ad5/3CMVLuc	Luziferase-Expressions-Vektor (Δ E1 Δ E3)	Fiberchimäre aus Ad5 tail und shaft und Ad3 knob	CMV-Promotor des Cytomegalovirus	Luziferase-Reporterger
Ad5CMVLuc	Luziferase-Expressions-Vektor (Δ E1 Δ E3)	Ad5 Fiber	CMV-Promotor des Cytomegalovirus	Luziferase-Reporterger
Ad5ALALuc	Luziferase-Expressions-Vektor (Δ E1 Δ E3)	Ad5 Fiber	Humaner ALA-Promotor	Luziferase-Reporterger
Ad5MDRLuc	Luziferase-Expressions-Vektor (Δ E1 Δ E3)	Ad5 Fiber	Humaner MDR1-Promotor	Luziferase-Reporterger

8.4 Adenovirale Titer

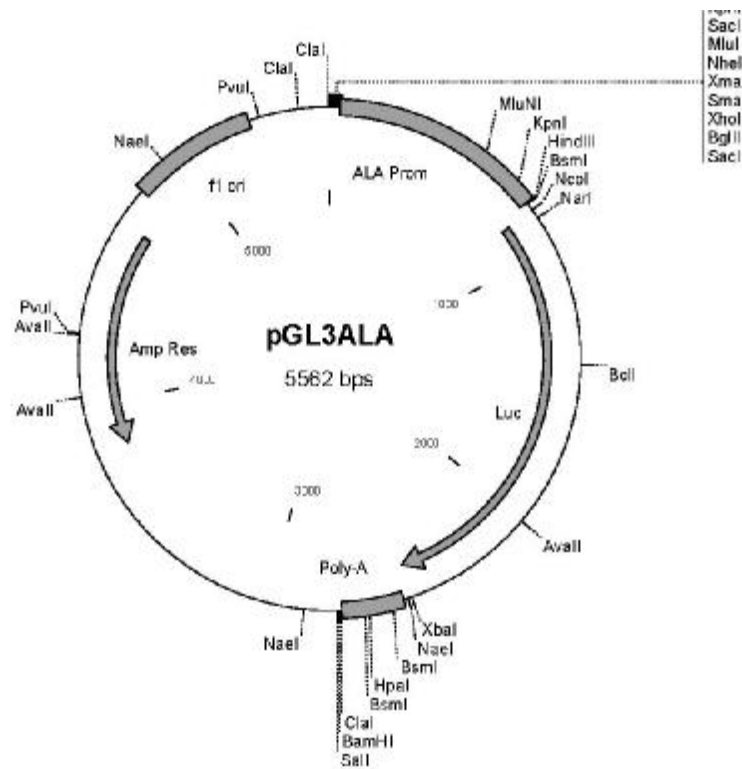
Virus	VP/ml	PFU/ml	TCID/ml
Ad5Δ24RGD	$2,3 \times 10^{12}$	$8,97 \times 10^9$	$4,5 \times 10^{10}$
Ad5Δ24	$2,6 \times 10^{12}$	$1,9 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$
Ad5Wt	$5,2 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$
Ad5/3Δ24	$2,8 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{11}$
Ad5/3MDRE1	$6,5 \times 10^{11}$	$9,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^{10}$
Ad5/3MDRΔ24	$4,9 \times 10^{11}$	$8,2 \times 10^9$	$4,1 \times 10^{10}$
Ad5/3ALAΔ24	$7,9 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$
Ad5/3CMVLuc	$9,1 \times 10^{11}$	$7,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^{10}$
Ad5CMVLuc	$1,7 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^{10}$	$7,1 \times 10^{10}$
Ad5ALALuc	$1,8 \times 10^{12}$	$1,9 \times 10^9$	$9,5 \times 10^9$
Ad5MDRLuc	$1,3 \times 10^{12}$	$5,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$

8.5 Plasmidkarten

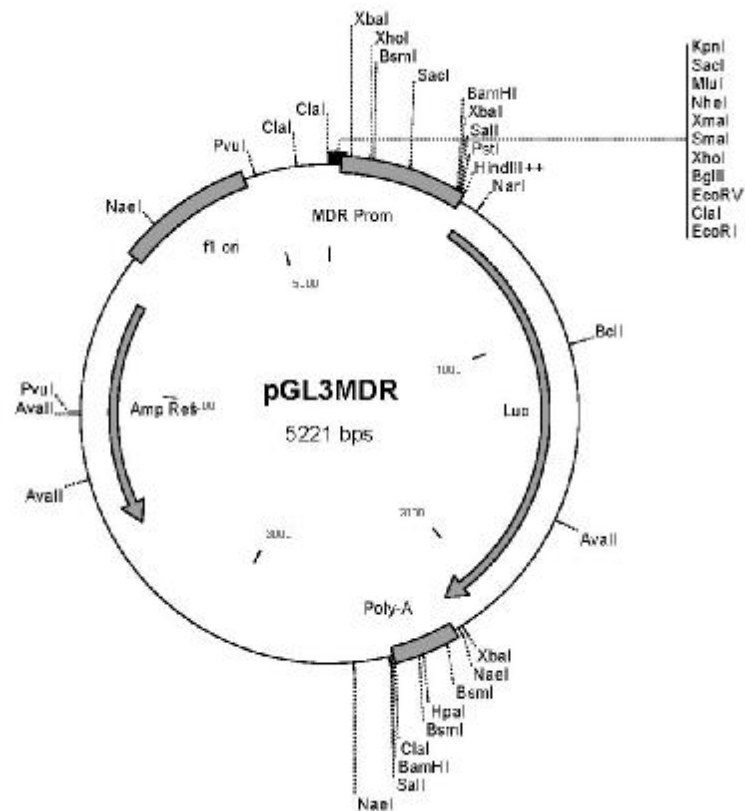
pGL3CMV



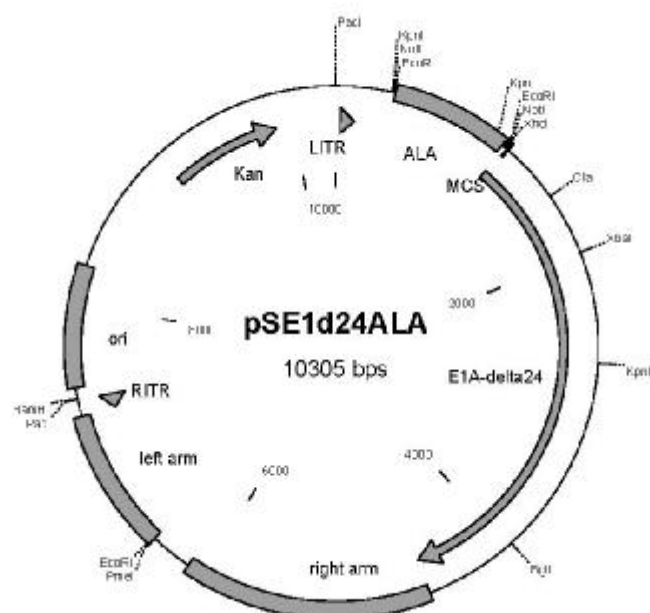
pGL3ALA



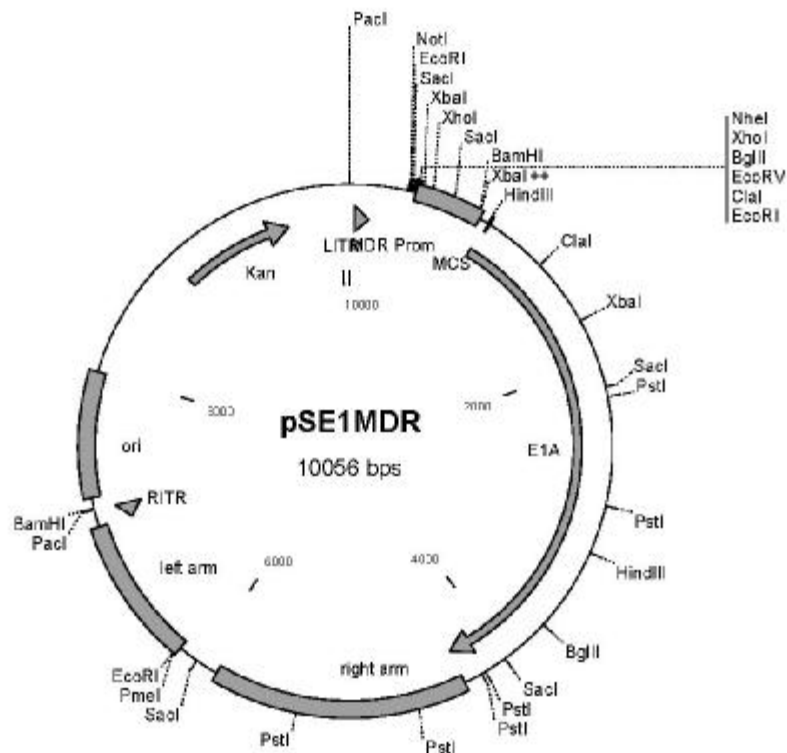
pGL3MDR



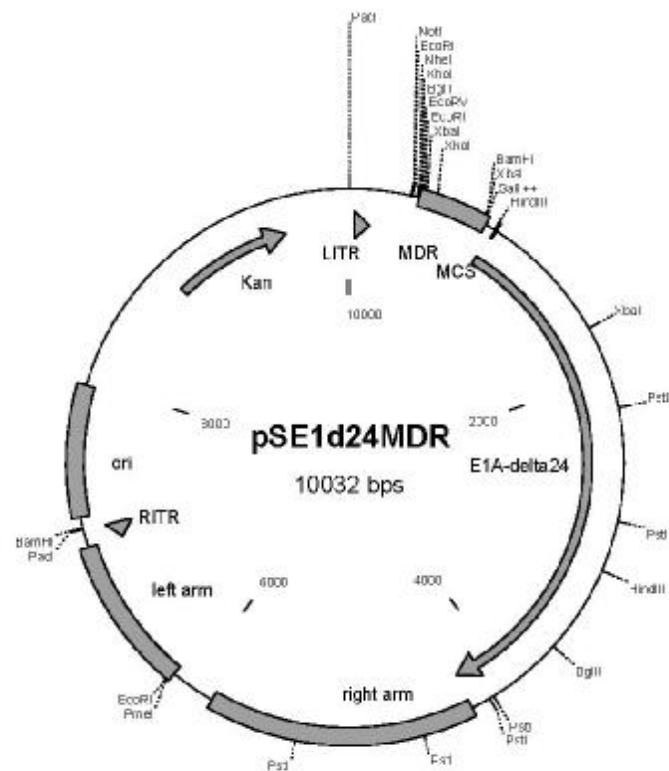
pSALAD24



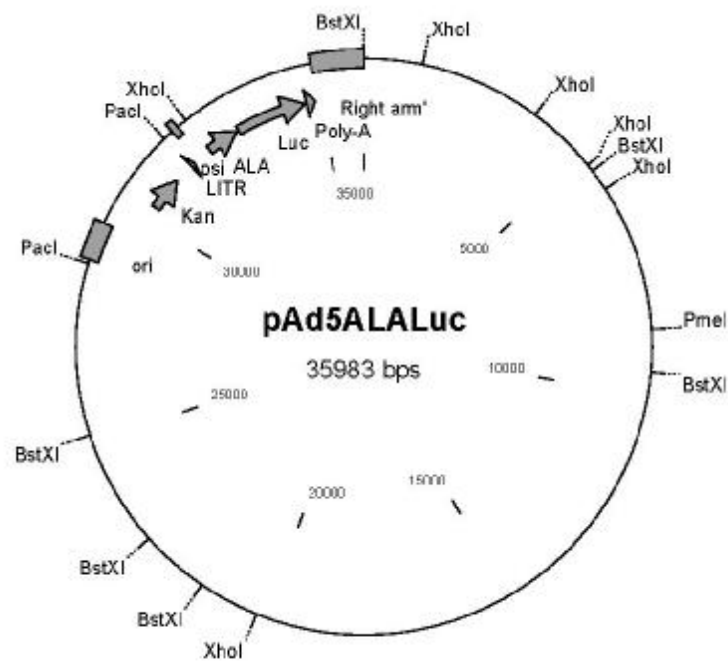
pSMDRE1



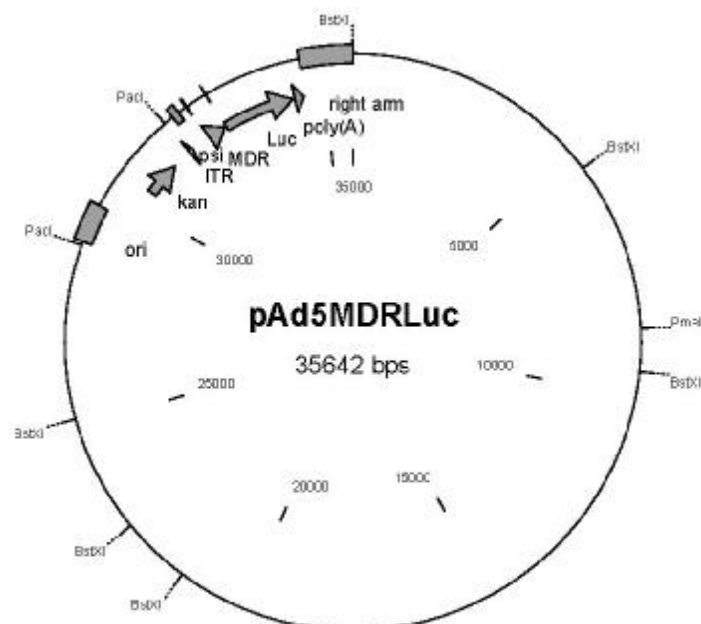
pSMDRD24



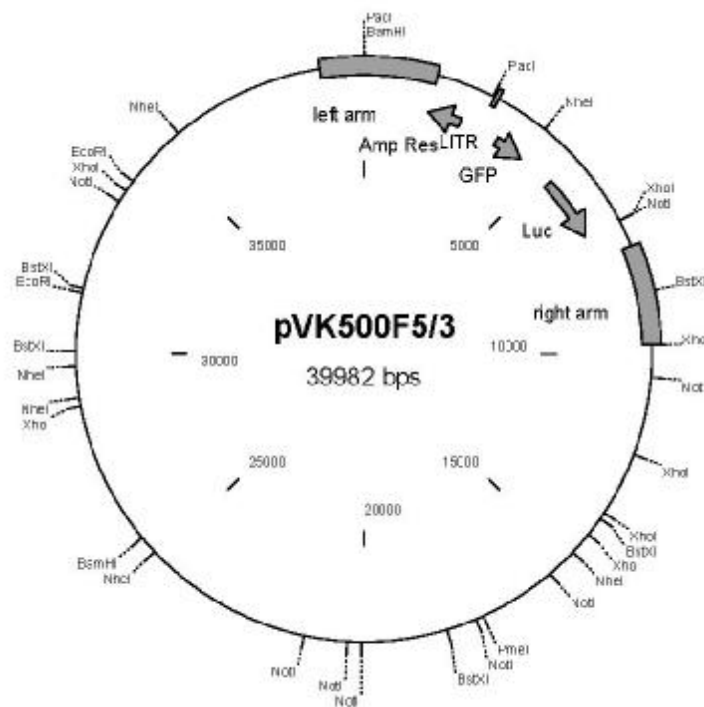
pAd5ALALuc



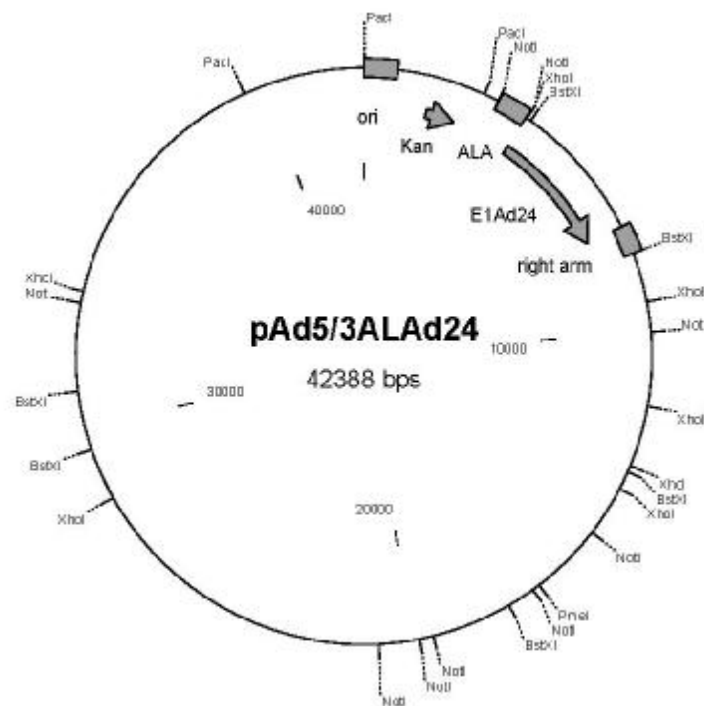
pAd5MDRLuc



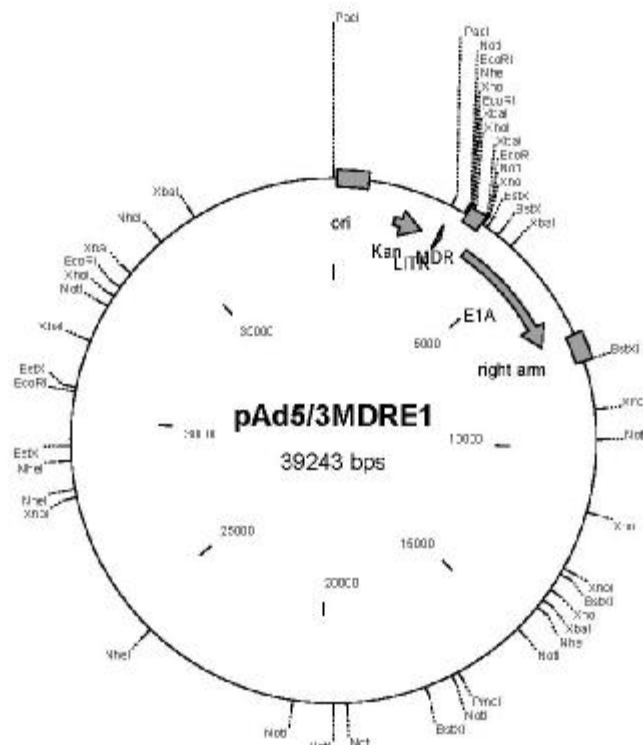
pVK500F5/3



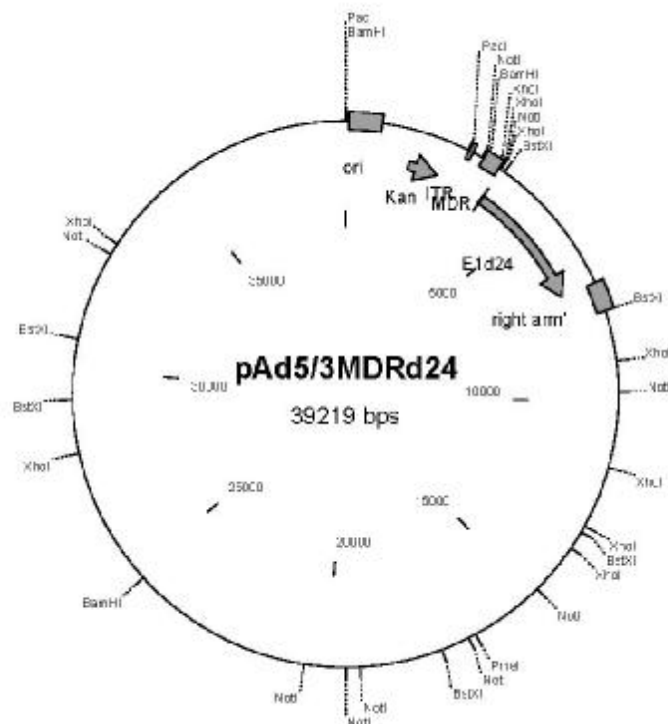
pAd5/3ALAD24



pAd5/3MDRE1



pAd5/3MDRD24



9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. P. Dall, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an einem innovativen Forschungsthema in einer interdisziplinären AG zu forschen und zu lernen. Ich möchte ihm für sein großes Interesse an meinem wissenschaftlichen Vorankommen und der engagierten Förderung meiner Teilnahme an fachlichen Kongressen von der ersten Minute an danken.

Herrn Prof. F. Wunderlich danke ich freundlichst dafür, dass er sich bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen.

Herrn Dr. D. Niederacher danke ich insbesondere für die kritische Diskussion meiner Arbeit, das Anleiten zum wissenschaftlichen Arbeiten und für so manche aufbauenden Worte.

Prof. D. Curiel danke ich für die Bereitstellung der Adenoviren Ad5Wt, Ad5 Δ 24, Ad5 Δ 24RGD und Ad5/3CMVLuc, Dr. A. Kanerva für die Bereitstellung des Adenovirus Ad5/3 Δ 24

Dr. B. Prisack, Dr. G. Röder und dem gesamten Institut für Onkologische Chemie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der TCA-Assay, für die unkomplizierte Bereitstellung von primärem Tumormaterial und die permanente Hilfsbereitschaft.

Darüber hinaus danke ich Frau Grollig, Frau Löhrmann und Katja Quenders aus dem morphologischen Labor der Frauenklinik für ihre ständige experimentelle und moralische Unterstützung.

Artur Menzel, Dr. D. Rein und Dr. G. Bauerschmitz danke ich für die fachliche Diskussion während unserer Besprechungen an so manchem (schier endlosen) Montagabend.

Ein besonderer Dank geht an Marius Porten für sein Super-Engagement und die professionelle und engagierte Unterstützung im MDR-CRAD-Projekt.

Ein weiteres Dankeschön an Heimi - für die aufbauenden Gespräche, Deine Hilfsbereitschaft und die eine oder andere gemütliche Tasse Kaffee.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des MolGenLabs, insbesondere Nora, Artur, Dagmar, Heike, Britta und Birgit, danke ich für die super Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und so manche schönen Kaffeerunden in unserer Aufenthalts-Nische. Frau Dr. B. Betz danke ich für ihren fachlichen Rat und ihre Hilfsbereitschaft.

An dieser Stelle noch ein abschließender Gruß an das Wagen-Team!

Dörte, danke für Deine immer ehrlich gemeinten Worte während diverser Krisen und Dein offenes Ohr! Roman, danke, dass Du für Gero da warst und für Deine spontane Hilfsbereitschaft. Weiterhin danke ich Katja & Family, Birgit und Dr. Butz, ihr habt mich immer unterstützt.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bedanken bei:

Gero: Danke für Deine unendliche Geduld und Rücksichtnahme während der letzten vier Jahre & ganz besonders während der letzten Monate. Danke, dass du mich immer wieder aufgebaut und an mich geglaubt hast.

meiner Mutter: Danke, dass Du immer für mich da warst, immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich stets darin, was ich getan habe, unterstützt hast.

Elke & Familie: Danke für Eure Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte.

10 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 29.03.2006

Isabell Herrmann