

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Frau Univ.-Prof. Dr. med. T. N. Fehm

Triple Level Targeting
zur zielgerichteten Virotherapie
beim Mamma-Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Heike Creutz
2014

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

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

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Bauerschmitz

Korreferent: Prof. Dr. med. Höhn

Für meine Familie



INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	Seite
1.1.	Prävalenz und Inzidenz des Mamma-Karzinoms	9
1.2.	Klassische Therapieoptionen	11
1.3.	Immuntherapie	11
1.4.	Gentherapie	12
1.4.1.	Morphologie des Adenovirus	14
1.4.2.	Adenovirale Infektion und Replikation	15
1.4.3.	Adenovirale Vektoren	17
1.5.	Bedeutung von Adenoviren für die Gentherapie von Tumoren	18
1.5.1.	Transduktionales Targeting	18
1.5.2.	Transkriptionales Targeting	19
1.5.3.	Translationales Targeting	19
1.6.	Ziel der Doktorarbeit	20
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Reagenzien und Lösungen	21
2.1.1.	10% DMEM-F12	21
2.1.2.	MEGM mit BPE	22
2.1.3.	FBM + 2% FBS	22
2.2.	Virusvorbereitung	22
2.3.	Untersuchung modifizierter Adenoviren	23
2.3.1.	Ad5/3-CXCR4-E1A-PIX-RFP (#I)	23
2.3.2.	Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-PIX-RFP (#II)	23
2.3.3.	Ad5-wt	23
2.3.4.	Ad5/3-wt	23

2.3.5.	Ad5-GFP	24
2.4.	Zellkulturen	24
2.4.1.	MB-435s	24
2.4.2.	MB-361	24
2.4.3.	MB-231	25
2.4.4.	ZR-75-1	25
2.4.5.	MCF-7	25
2.4.6.	HEK-293	25
2.4.7.	HMEC	26
2.4.8.	Fibroblasten	26
2.5.	Purifikation der Adenovirusstämme	26
2.6.	Experimentaufbau	28
	Untersuchung der Infektivität von #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Flow-Zytometrie in verschiedenen Zelllinien	
3.	Ergebnisse	34
	Untersuchung der Infektivität zweier CRADs in unterschiedlichen Zelllinien:	
	#I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP	
	und	
	#II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP	
	Durchfluss-Zytometrie	
	Crystal violet	
	Tissue slide Technik	
4.	Diskussion	51
4.1.	Kritische Betrachtung	55
4.2.	Methoden der Karzinomtherapie	56

4.3.	Gentransfermethoden	57
4.4.	Adenoviren in der Gentherapie	58
4.5.	Klinische Studien mit adenoviralen Methoden	60
4.6.	Transkriptionales Targeting	61
4.6.1.	Tumor-spezifische Promotoren	61
4.6.2.	Tumorgefäß-spezifische Promotoren	63
4.6.3.	Therapie-induzierte Promotoren	63
4.7.	Transduktionales Targeting	64
4.7.2.	Genetisches transduktionales Targeting	64
4.7.3.	Fiberchimären	65
4.7.4.	Physikalisches transduktionales Targeting	65
4.8.	Konditional replizierende Adenoviren, so genannte CRAbs als onkolytische Agenzien	68
4.9.	Gerichtete konditional replizierende Adenoviren	70
4.10.	Klinische Studien mit CRAbs	71
4.11.	Modellsysteme – primäre Tumorzellen und Spheroide	71
4.12.	Zukunftsperspektiven	73
5.	Zusammenfassung	74
6.	Quellenverzeichnis	76
7.	Abbildungsverzeichnis	89
8.	Tabellenverzeichnis	90

9.	Abkürzungsverzeichnis	90
10.	Lebenslauf	92
11.	Danksagung	95

1. Einleitung

1.1. Prävalenz und Inzidenz des Mamma-Karzinoms

In den Industrienationen stellen Karzinom-Erkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Die Inzidenz maligner Tumoren in Deutschland per anno beträgt laut Angaben des Robert-Koch-Institutes von 2006 (1), bzw. des epidemiologischen Krebsregisters von 2002 (2) bei Frauen ca. 206.000 Fälle, bei Männern ca. 218.250 Fälle.

In den westlichen Industrienationen sind Malignome der Frau mit rund 40% aller Neuerkrankungen vertreten, in 2008 57.000 Fälle. Bei Frauen unter 50 Jahren stehen in den westlichen Industrienationen gynäkologische Malignome sogar an erster Stelle der Todesursachen. In Deutschland im Besonderen sind in dieser Altersgruppe für das Jahr 2008 17.500 Todesfälle verzeichnet (3), (BMG, BMU, Kooperationsgemeinschaft Mammographie).

Das Mamma-Karzinom ist mit 27,8% der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Industrienationen, jede 8. bis 10. Frau ist betroffen (1). Innerhalb des breit gefächerten Spektrums von Erkrankungsrisiken wie frühe Menarche und späte Menopause, positive Familienanamnese (Nachweis von BRCA1 und BRCA2), späte erste Schwangerschaft oder Kinderlosigkeit, westliche Lebensweise, Hormontherapie mit Östrogenen, Übergewicht, atypisch proliferierende Mastopathie, Alkohol- und Nikotinabusus ist derzeit das fortgeschrittene Lebensalter als wesentlichster Faktor einzustufen. In Hinblick auf die ansteigende Lebenserwartung in den Industrieländern gewinnt dieses Risiko kontinuierlich an Bedeutung.

Aufgrund ausgedehnter Vorsorgeuntersuchungen und modifizierter Früherkennungsangeboten, insbesondere der Mammographie, hat sich die Mortalitätsrate im Jahr 2003 in Europa mit 26,5%/100.000 Fälle gegenüber 1997 mit 30,3%/100.000 Fälle leicht gesenkt (1). Männer erkranken im Durchschnitt 10 Jahre später als Frauen an einem Mamma-Karzinom, die Inzidenz liegt bei ca. 400 Fällen pro Jahr.

Weltweit waren im Jahr 2004 insgesamt 275.000 Frauen betroffen (4) (IARC, International Agency for Research of Cancer).

Wenn auch die bekannten konventionellen Therapiemethoden wie Hormon-, Chemo- und Strahlentherapie signifikante Erfolge in der Behandlung des Mammakarzinoms erzielt haben,

liegt die 5-Jahres-Überlebensrate zur Zeit stagnierend bei 81% (2008) und hat sich damit gegenüber dem Jahr 2002 nur minimal, d. h. um 3%, erhöht (3, 5) (Tab. 1).

Während die Zahl an Neuerkrankungen bei Brustkrebs weiter ansteigt, nimmt die Mortalität seit Mitte der 90er Jahre leicht ab.

So erreichte man mit etablierten Therapieverfahren bereits eine deutliche Verbesserung der Überlebensraten. Molekulargenetische Verfahren könnten zukünftig im Sinne einer selektiven viralen Onkolyse an diesem Punkt viel versprechende Ansätze für neue Therapieformen bieten. In dieser Doktorarbeit zeigen Funktionsanalysen von zwei modifizierten Adenovirus-Vektoren die potentielle Wirksamkeit der Adenovirotherapie als neue, ergänzende Therapieform beim Mamma-Karzinom.

Möglicherweise werden im Zuge der Virotherapie als neuartiges Therapieverfahren weitere Erfolge verzeichnet und die Überlebenschancen weiterhin verbessert werden können.

DEUTSCHLAND	90er Jahre	2002	2004	2006	2008
Krebsneuerkrankungen p. a.		55.689	57.230	55.100	57.000
mittleres Erkrankungsalter				62 J.	63 J.
Anteil an Krebsneuerkrankungen		26,8%		26,85	27,8%
Sterbefälle p. a.		17.994	17.592	17.455	17.500
Anteil an Krebssterbefällen	19,7%	17,9%			
5-Jahres-Überlebensrate	71,7%	79%		79%	81%

Tab. 1. Epidemiologie des Mammakarzinoms bei Frauen in Deutschland.
(Schätzung für die Jahre 1990 bis 2008 nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregisters, des statistischen Bundesamtes sowie des Robert-Koch-Institutes).

1.2. Klassische Therapieoptionen

Zu den klassischen Therapieoptionen bei Karzinomerkrankungen im Allgemeinen sowie bei der Behandlung des Mamma-Karzinoms im Besonderen zählen operative Interventionen, die Radiatio und die Chemotherapie. Welche Therapieform für einen Patienten in Frage kommt, ist hierbei abhängig von der UICC-Klassifikation, bzw. dem FIGO-Stadium. Üblicherweise werden mehrere Therapieoptionen kombiniert, um optimierte Behandlungserfolge zu erzielen.

Unbestritten stehen bei niedrigen Tumorstadien operative Verfahren mit dem Ziel einer vollständigen Tumorreduktion an vorrangiger Position in der Karzinomtherapie. Im Rahmen einer Operation werden Tumormassen entfernt, benachbarte Organe auf mögliche Tumordinfiltrationen untersucht sowie regionäre, bzw. den Lymphabflussbahnen des Primärtumors folgende Lymphknotenlokalisationen zur weiteren histologischen Untersuchung (Staging) gewonnen. Wenn auch ein operativer Eingriff regelmäßig der Entfernung oder Reduktion der Tumormasse dient, so sind operative Interventionen, gerade bei fortgeschrittenen Karzinomerkrankungen, häufig unzureichend, um eine Heilung oder eine günstige Prognose zu erzielen. Verbleibende, makroskopisch nicht nachweisbare oder inoperable Tumormassen können zu Rezidiverkrankungen mit erschwerten Therapiemöglichkeiten führen. Daher werden chemotherapeutische und/oder strahlentherapeutische Verfahren mit der operativen Sanierung kombiniert, um Mikrometastasen oder Tumorreste zu eliminieren.

Im Falle eines hormonsensiblen Tumors werden ergänzend endokrine Therapien eingesetzt, welche den das Tumorwachstum fördernden Effekt, beispielsweise von Östrogen und Progesteron, verringern. Die Wirkung der sogenannten Antihormone wird über eine Hemmung der Blockade der zellulären Hormonrezeptoren oder durch direkte Hemmung des spezifischen Hormons erzielt.

Trotz stetig neuer Entwicklungen von Strahlen- und Chemotherapie sowie trotz des Einsatzes von Kombinationsverfahren ist daher eine weitere Verbesserung der Überlebensrate mittels neuer Therapieverfahren anzustreben.

1.3. Immuntherapie

Hormonrezeptoren können Zellwachstum und Zellteilung fördern und an der Krebsentstehung beteiligt sein. Sie reagieren auf die Bindung sogenannter

Wachstumsfaktoren. Je mehr von diesen Rezeptoren vorhanden sind, desto höher ist die Teilungsrate der Zellen. HER-2 ist eine solche „Andockstelle“, die bei der Entstehung und dem Wachstum von Mammakarzinomen eine Rolle spielen kann. In etwa einem Viertel (20-30%) der Fälle findet man erhöhte Mengen des Rezeptors. HER-2 lässt sich ähnlich wie die Hormonrezeptoren in mikroskopischen Präparaten aus der Biopsie oder aus dem operierten Tumor nachweisen. Tragen die Tumorzellen vermehrt HER-2, man spricht dann von HER-2-positiven Tumoren, gibt es einen weiteren effektiven Therapieansatz: eine gezielte Antikörper-Therapie. Ein Wirkstoff dieser Klasse hemmt speziell den HER-2-Rezeptor und unterbindet so die wachstumsfördernde Wirkung. Die Zellteilungsrate sinkt und damit auch das Tumorstadium. Dieser Wirkstoff unterstützt somit eine lang anhaltende Hemmung des Krebswachstums. Zugelassen ist dieser Antikörper bei metastasiertem, HER-2-positivem Brustkrebs, d.h. es finden sich bereits Tumorabsiedlungen in anderen Organen, und als adjuvante Therapie. Der Wirkstoff ist keine Alternative zu bewährten Behandlungsverfahren, der Antikörper kann sie jedoch in ihrer Wirkung unterstützen. Interessanterweise ist HER-2 besonders häufig auf Tumoren vorhanden, die keine Hormonrezeptoren tragen, bei denen also keine antihormonelle Therapie in Frage kommt. Bei diesen Patientinnen war bisher die Chemotherapie die einzige adjuvante Therapieoption. Der Antikörper hat somit die therapeutischen Möglichkeiten für diese Patientinnen erheblich erweitert. Ein großer Vorteil des Antikörpers gegenüber den meisten herkömmlichen Chemotherapien besteht darin, dass er auch solche Tumorzellen angreift, die sich gerade in der Ruhephase befinden, also nicht teilungsaktiv sind.

Zur Behandlung von Brustkrebs, auch in der Adjuvanz, wurde ein als “Trastuzumab” bezeichneter monoklonaler Antikörper entwickelt, der erstmals im August 2000 in der EU zugelassen wurde. Als monoklonaler Antikörper dockt Herceptin® im Organismus an die für das Wachstum der Zellen verantwortlichen HER2-Rezeptoren an und blockiert diese. Die Folge ist, dass die Fortentwicklung des Tumors gestoppt oder zumindest verlangsamt wird.

1.4. Genterapie

Innerhalb der letzten Jahre ist die Entwicklung neuer Therapieformen in der Krebsbehandlung durch genterapeutische Methoden mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses getreten. Hierbei stellt die Virotherapie einen interessanten Ansatz in der Behandlung des Mammakarzinoms dar.

Unter onkolytischer Therapie versteht man die Infektion von Tumorzellen mit Viren, welche in der Lage sind, die Tumorzelle durch Virus-Replikation und nachfolgende Onkolyse zu

zerstören. Ziel der Arbeit ist die Darstellung und Untersuchung dreifach modifizierter Adenoviren, welche zur selektiven Infektion von Tumorzellen und zur Schonung benachbarten Gewebes befähigt sind. Der Virus selbst ist zur Replikation und Verteilung in den Tumorzellen befähigt, ausgehend von der Infektion einer einzigen Tumorzelle (Abb. 1). Darüber hinaus wird als unverzichtbare Voraussetzung für die Anwendbarkeit im Patienten eine nebenwirkungsfreie Applikation erwartet, entsprechend dem tumor-on/liver-off-System, das bedeutet, Tumorzellen werden selektiv adenoviral infiziert (Abb. 2) bei reduzierter oder nahezu ausgeschlossener Lebertoxizität, was typisch für den Wildtypvirus ist.

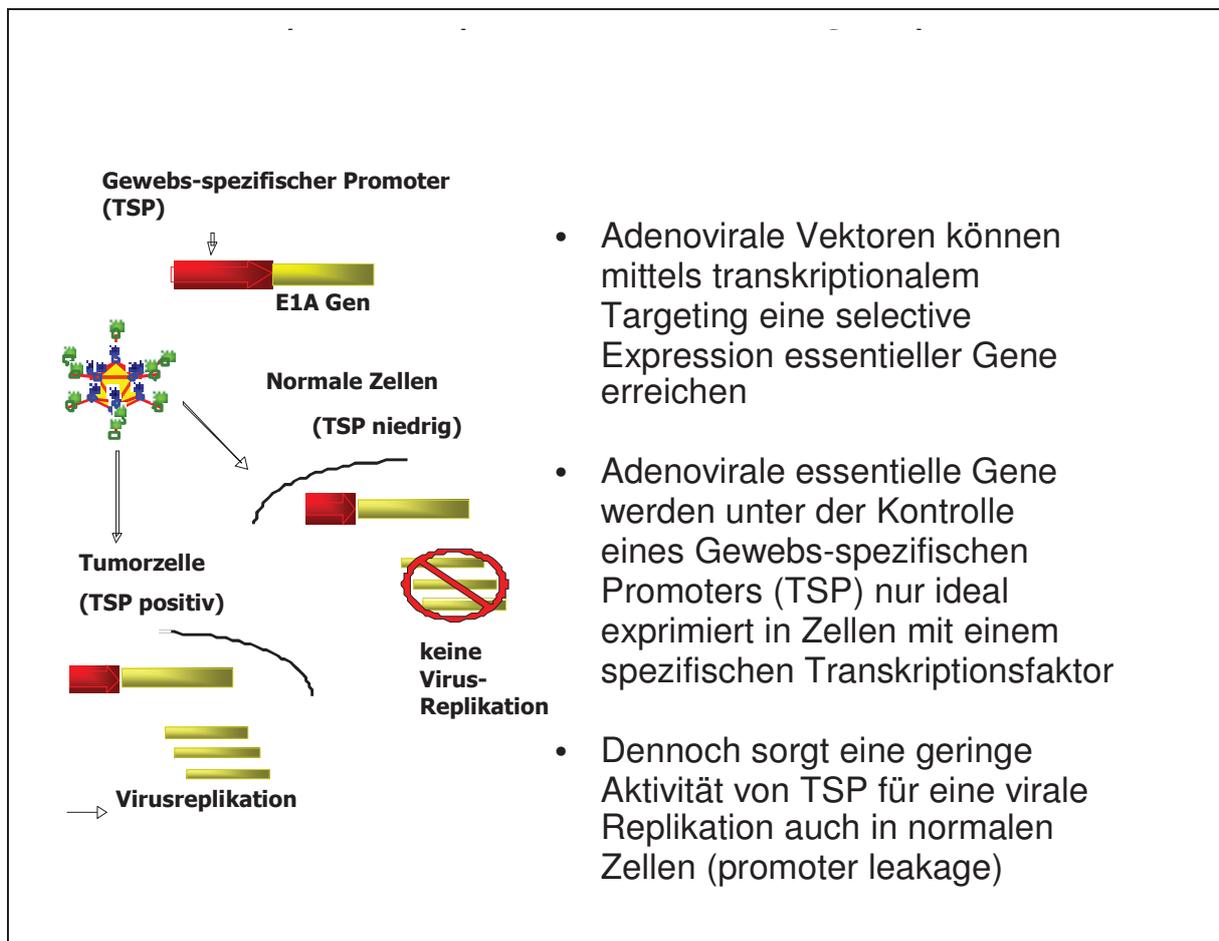


Abb. 1: Transkriptionales Targeting von CRAds mittels eines Tumor-selektiven Promoters; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA

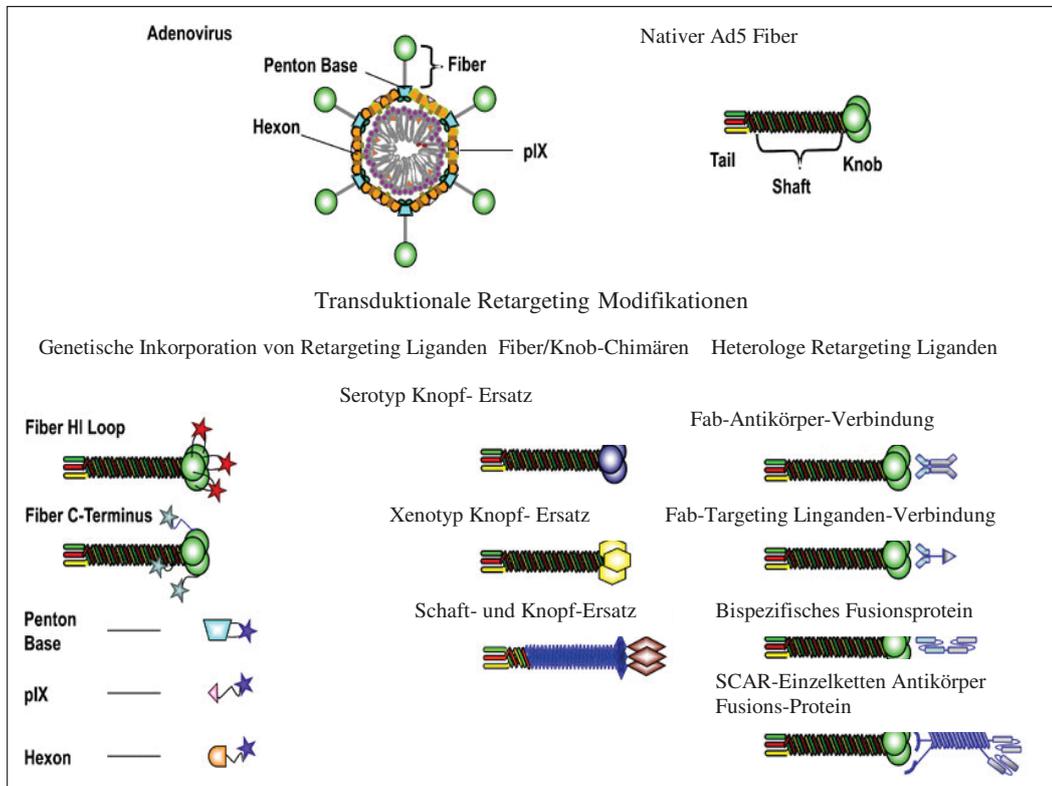


Abb. 2: Verstärkung der tumorselektiven Infektivität durch ein transduktionales Targeting; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA

1.4.1. Morphologie des Adenovirus

Adenoviren sind DNA-Viren, die ubiquitär vorkommen. Sie werden in zwei Gattungen unterteilt, die Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind. Man unterscheidet mehr als 100 serologische Formen (Serotypen), für den Menschen ca. 48 relevante Serotypen. Adenoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. Es werden sechs Subtypen, A – F unterschieden, die sowohl Bagatellerkrankungen, wie nicht behandlungsbedürftige fieberhafte Infekte (5-15% aller Erkältungskrankheiten, akute febrile Pharyngitis) verursachen als auch schwerwiegende Infektionen menschlicher Zellen. Im Tierversuch wurde ihre Fähigkeit zur Inflammation ohne virale Replikation nachgewiesen. Eine hohe Viruslast ist bei immunsupprimierten Patienten und Neugeborenen zu finden. Hier kann in sehr seltenen Fällen die Adenovirus-Infektion

auch zum Tode führen, wenn die Viren Organe und Gewebe befallen, die außerhalb des normalen Spektrums liegen.

Die hier untersuchten modifizierten Adenoviren gehören zur Gruppe B (Ad3) und C (Ad5) und besitzen die Fähigkeit zur Replikation.

Nicht modifizierte Adenoviren benötigen im Schnitt 32-36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Bei der Bindung des Virus an die Zielzelle spielt die Wechselwirkung der viralen Fiberproteine mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle. Die Effizienz einer Infektion mit Adenoviren ist abhängig von deren primären zellulären Rezeptor CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor), den die meisten Adenoviren, mit Ausnahme der Gruppe B binden. CAR wird in hohem Maße von gesundem Oberflächenepithel exprimiert, jedoch in deutlich geringerem Maße von Karzinomzellen. Bisher limitierte die CAR-Abhängigkeit der Adenoviren deren therapeutischen Einsatz wegen nicht zu beseitigender Nebenwirkungen in Leber, Milz und Niere.

1.4.2. Adenovirale Infektion und Replikation

Nach Anlagerung des Viruspartikels kommt es zur Interaktion zwischen den Pentonbasisproteinen und den zellulären Integrinen. Danach wird der Viruspartikel über Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt. Die Ansäuerung in diesen Endosomen führt zu einer Konformationsänderung der viralen Capsidproteine, wodurch das „Uncoating“ und somit die Freisetzung des Virus-Core in das Zytoplasma erfolgt. Bestimmte Signale (nuclear localization signals) der Core-Proteine erleichtern den Transport des Core in den Zellkern, hier bleibt die virale DNA als Episom bestehen. (Abb. 3)

Darüber hinaus enthalten Adenoviren sogenannte „trans-activating-regions“, welche auf Transkriptions-Ebene die Expression anderer „early proteines“ kontrollieren. E1A ist das erste exprimierte adenovirale Gen und wird von zellulären Transkriptionsfaktoren gesteuert (Abb. 1). Mehrere RNA-Transkripte codieren für die E1A-Proteine, die bei der Aktivierung der Transkription der späteren frühen (delayed early) Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4 eine Rolle spielen. Die E1B-, E2- und E4-Genregionen codieren für Proteine mit essentiellen regulatorischen Funktionen.

Die Expression von E1B beendet durch Komplexbildung mit E1A die frühe Gen-Expression, die andernfalls infolge des kontinuierlichen Ablaufs vor Fertigstellung neuer Viruspartikel zum Zelltod führen würde. Gleichzeitig schützt E1B die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau. Die zelluläre RNA-Translation wird gehemmt, die späte virale Genexpression beschleunigt.

Ein von der E4-Region codiertes Protein ist an der Regulation der E2-Transkription, an der viralen Replikation und der Fertigstellung der Virionen beteiligt.

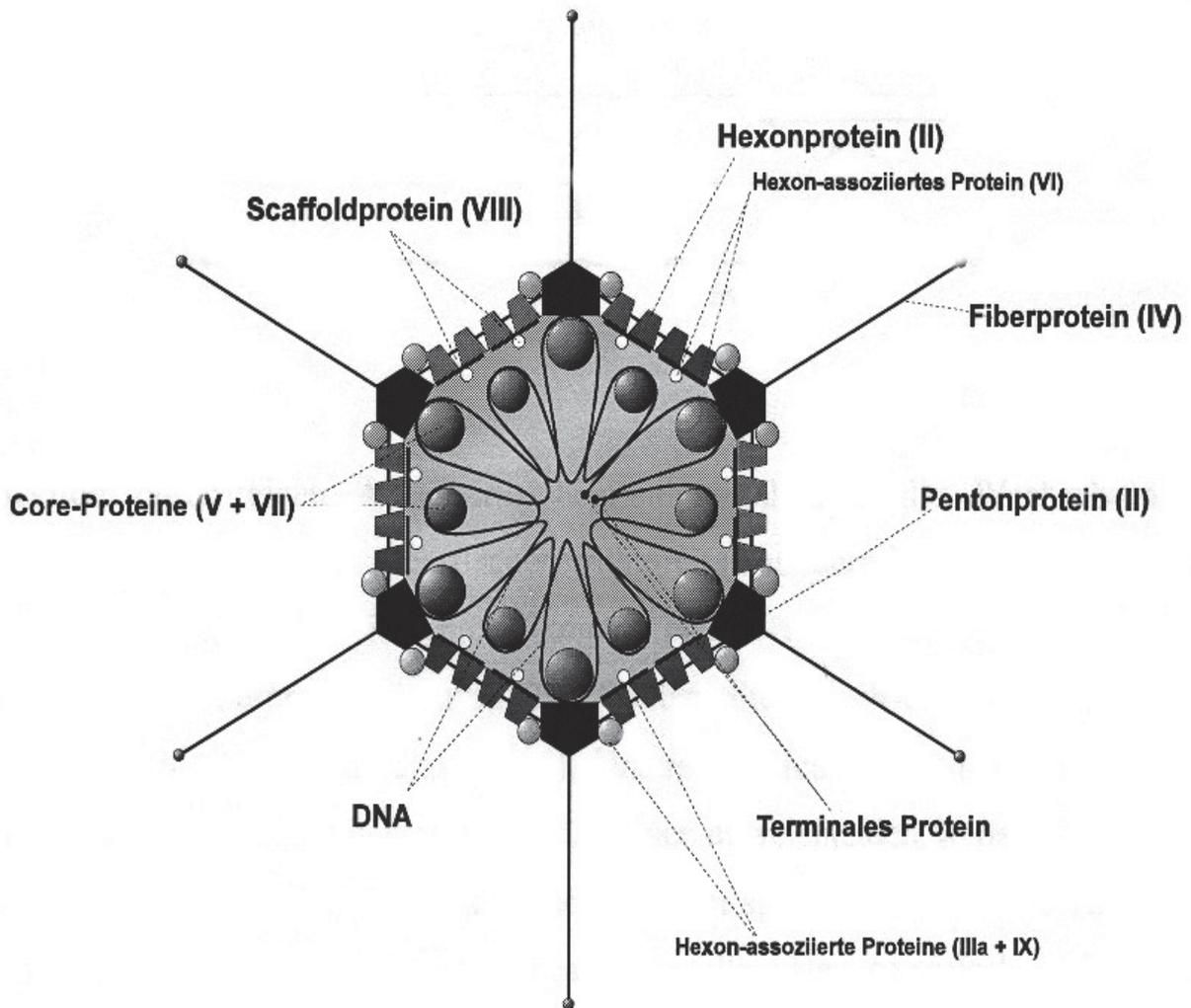


Abb.3: Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf, Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel, Dr. med. Ole Dannenberg

Adenovirus-infizierte Zellen sind durch die E3-Proteine resistent gegen FAS- und TNF-vermittelte Zell-Lyse.

Die E2-Region codiert für Proteine, die vor allem an der viralen Replikation beteiligt sind, die etwa sechs bis acht Stunden nach der Infektion beginnt, nach ca. 18 bis 20 Stunden ihr Maximum erreicht und nach 24 Stunden beendet ist.

Das adenovirale Genom ist eine lineare doppelsträngige DNA, die „inverted terminal repeats“ (ITR) von 100-165 bp an jedem Ende aufweist. An die 5'-Enden der ITRs sind kovalent von

E2-codierte Terminal Proteine (TP) gebunden, die als Primer der Initiation der DNA-Synthese dienen. Die Initiation erfolgt kontinuierlich in 5'-3'-Richtung durch E2-viruscodierte DNA-Polymerase mittels Strang-Displacement. Der verdrängte DNA-Strang wird mit E2A-Proteinen komplexiert, die es verhindern, dass die Einzelstrang-DNA durch zelluläre Nukleasen abgebaut wird.

Es entstehen $10^4 - 10^5$ Viren pro Zelle, die Zelle verkümmert innerhalb von 30 - 40 Stunden nach der Infektion und setzt die neu synthetisierten Virionen durch Lyse frei.

Die Biologie von Adenoviren, insbesondere Serotyp 5 (Gruppe C, die ebenso die Serotypen 1, 2 und 6 enthält) ist seit Jahren Gegenstand der Molekular-Forschung und daher gut bekannt. Typ B-Adenoviren werden in B1- (Serotypen 3, 7, 16, 21 und 50) und B2-Adenoviren (Serotypen 11, 14, 34 und 35) eingeteilt. Diese Gruppen zeigen einen unterschiedlichen Tropismus in-vivo.

Adenoviren sind befähigt in vielen verschiedenen Zelltypen eine Infektion hervorzurufen und können in großer Anzahl in Gewebekulturen angezüchtet werden. Sie weisen eine hohe Stabilität auf und sind zur nicht integrativen Replikation befähigt.

1.4.3. Adenovirale Vektoren

Adenoviren sind viel versprechende Vektoren für gentherapeutische Anwendungen bei zahlreichen angeborenen und erworbenen Erkrankungen.

Die Anforderungen, die an einen Vektor gestellt werden sind unterschiedlicher Art. Einerseits ist die Effizienz des Gentransfers, die Pathogenität und Immunogenität des Vektors von entscheidender Bedeutung. Andererseits muss auch auf die Verpackungskapazität, den Zielzelltropismus und die erzielbare Transgenstabilität geachtet werden. Die Methode, die diesen Anforderungen bis heute klinisch gerecht wird, sind Vektoren viralen Ursprunges. Insbesondere konnten mit Retroviren und Adenoviren Erfolge erzielt werden. Das Prinzip der Modifikation eines viralen Vektors beruht auf der Löschung eines Teils der genetischen Information des Wildtyp-Virus und dem Ersatz durch ein gentechnisches Konstrukt.

Retroviren sind Viren der RNA-Gruppe mit einer Größe von 8 kb. Ihr viraler Zyklus beinhaltet die reverse Transkription ihres Genoms in doppelsträngige DNA und dessen stabile Integration in das Wirtsgenom mit der möglichen Aktivierung von Onkogenen. Während Retroviren in vitro eine hohe Transferrate erreichen, werden sie in vivo sehr schnell durch das humane Komplementsystem deaktiviert. Zwei weitere Nachteile sind erstens die

Integration in nur proliferierendes Gewebe (Miller et al., 1990), und zweitens die geringe Verpackungskapazität von lediglich 7 kb.

Das Adenovirus, ein sowohl auf proliferierende als auch ruhende Zellen wirkendes Virus, scheint zur Zeit aus onkologischer Sicht ein viel versprechender Vektor für die in-vivo-Strategie zu sein.

1.5. Bedeutung von Adenoviren für die Gentherapie von Tumoren

Mit der Entwicklung sogenannter CRAds, conditionally replicative adenoviruses, soll einerseits die gezielte virusvermittelte Onkolyse infizierter Krebszellen, andererseits die Vermeidung nicht tumorspezifischer Replikation in gesunden Zellen erreicht werden. Wenn in der Vergangenheit die Effektivität dieser CRAds in Hinblick auf deren Toxizität auf gesunde Organe noch begrenzt war, stehen heute mit der Möglichkeit eines Triple Level Targetings neue, viel versprechende Wege offen.

1.5.1. Transduktionales Targeting

Ziel der Gentherapie ist das Erreichen eines bestimmten therapeutischen Effektes durch die sichere Übertragung von genetischem Material. Hierfür erforderlich ist ein zuverlässiger Gentransfer in das Zielgewebe sowie eine zellspezifische Aktivierung des übertragenen therapeutischen Genmaterials, um gesundes Gewebe zu schonen. Ein geeigneter Vektor ist das humane Adenovirus Serotyp 5, welches vielfältig modifizierbar und sowohl in vitro als auch in vivo stabil ist .

Erste klinische Erfahrungen zeigten in vitro jedoch unbefriedigende Erfolge. Die Ursache hierfür findet sich im Verteilungsmuster des primären Rezeptors von Adenovirus Typ 5, des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor „CAR“, welcher ungleichmäßig verteilt ist (6). Ad5 (Adenovirus 5) zeigt in humanen Zellen eine CAR-abhängige Infektion, so dass die Infektivität von Adenoviren in Relation zur Rezeptordichte steht. CAR ist fast ausschließlich in epithelalem Gewebe vorhanden und die Rezeptordichte kann bei Malignität immens abnehmen oder nicht vorhanden sein. Dieses erschwert in vivo den ausreichenden Gentransfer mit unmodifizierten Adenoviren (6).

Der Ad5-Tropismus wird über zwei Kapsid-Proteine vermittelt: das Fiber-Protein und die Penton-Base. Diese Proteine binden den CAR-Rezeptor und an die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$. Allerdings weisen im Gegensatz zu gesunden epithelialen Zellen gerade Karzinomzellen eine weitaus niedrigere Rezeptordichte auf (7). In Hinblick auf die Virotherapie resultiert

hieraus die kritisch zu betrachtende unselektive Infektivität von Zellen mit einer einhergehenden hohen Nebenwirkungsrate in Nicht-Zielzellen. Die Integration des Serotyps 3-Knobs in die Ad5-Fiber (Ad5/3) bewirkt die Veränderung des Kapsids insofern, als der normalerweise bestehende Tropismus zwischen Adenovirus und CAR modifiziert wird. Auf diese Weise gelingt es einerseits die Infektivität über Fiber-Knob-Chimäre zu verstärken, andererseits gleichsam die Leber-Toxizität herabzusetzen und so die unselektive adenovirale Infektion zu kontrollieren.

1.5.2. Transkriptionales Targeting

Um die therapeutische Anwendbarkeit von Adenoviren zu verbessern, müssen diese so modifiziert werden, dass sie zu einer tumorspezifischen Replikation befähigt sind und eine Replikation im gesunden Gewebe nahezu ausgeschlossen wird.

Die Entstehung transkriptionaler Kontrollelemente (Promoter) hat zu spezifischeren CRAd-Modellen geführt, welche die E1A-Gene unter die Kontrolle sog. „Tumor-specific-Promoter“ (TSP) stellen, um eine höhere Spezifität der CRAds zu erreichen. Dennoch wurde die therapeutische Anwendbarkeit durch eine nachweisbare Hintergrundaktivität von TSP in Normal- und speziell in Lebergewebe (erhöhte Lebertoxizität) eingeschränkt.

Wenn auch die Anzahl verfügbarer krebsspezifischer Promoter begrenzt ist, hat man doch im CXCR4-Promoter (Cyclooxygenase 4) ein tumorspezifisches Protein für die selektive Virus-Replikation gerade in Brustkrebszellen gefunden (8).

1.5.3. Translationales Targeting

Ein neuer Forschungsansatz zur Verbesserung der selektiven Infektivität von Adenoviren besteht in der Kontrolle der Gen-Expression über die mRNA-Translation, vor allem über die Initiation der Translation mittels eIF4E (eucaryotic trans initiation factor 4). Der eIF4E findet sich überexprimiert in Tumorzellen, bindet an die GC-reiche 5'UTR und dient als Botschafter für die Übersetzung langer und komplexer UTR, insbesondere FGF2 (fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor). Schnelles Wachstum maligner Zellen und Letalität beim Mamma-Karzinom korrelieren mit einem erhöhten Vorhandensein von eIF4E, ebenso wie die Entstehung von Rezidiven (Prognoseparameter) (9). Dabei ist noch unbekannt, ob ein erhöhtes Vorhandensein von eIF4E die Karzinomentstehung auslöst, oder eine Überexpression durch den Tumor selbst erfolgt. Das Ziel ist, eIF4E zu nutzen, um die Reproduktion von CRAd-Vektoren für die Krebstherapie zu kontrollieren. Die mRNA-

Translation wird über ein langes, GC-reiches 5'UTR-Element (aus FGF2) kontrolliert, geht dem E1A-Leseraster voraus und soll bewirken, dass die Protein-Expression an zahlreichen Bindungsstellen des E1A nur Krebszellen mit hohem Gehalt an eIF4E vorbehalten ist. Vor diesem Hintergrund wird eine verbesserte Effizienz und damit adenovirale Selektivität durch eine mRNA-Stabilisierung oder erhöhte mRNA-Translation erwartet.

1.6. Ziel dieser Doktorarbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist das molekulargenetische Konzept zur Entwicklung effektiver Behandlungsstrategien mittels modifizierter Adenoviren darzustellen. In diesem Zusammenhang wird die Anwendbarkeit einer Virotherapie in Zukunft als zusätzliches Therapieverfahren im Sinne eines neuartigen Ansatzes neben den bekannten herkömmlichen Behandlungsmethoden des Mammakarzinoms geprüft.

Durch Kombination der genannten drei Strategien, transduktionales, transkriptionales und translationales Targeting, wird die Verwirklichung adenoviraler Therapieformen angestrebt, die sich durch eine erhöhte Infektivität spezifischer CRAds und anti-karzinomatöse Selektivität der Replikation in Mammakarzinom-Zellen auszeichnet. Zudem wird mit der Kontrolle der Replikation eine Vermeidung von Nebenwirkungen in Nicht-Zielorganen angestrebt.

Beschrieben wird die Effizienz der Kapsidmodifikation, die eine CAR-unabhängige Infektion ermöglicht, gemessen an der multiplicity of infectivity (m.o.i.) mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Flow-Zytometrie.

Hierzu wurden Funktionsprüfungen der Infektivität unterschiedlicher Adenoviren durchgeführt, ebenso wie ein Monitoring mittels RFP gefunden wurde, das neben der adenoviralen Selektivität in Tumorgewebe ebenso die fehlende Infektivität in Normalgewebe sichtbar macht.

Mit dem Crystal Violet-Verfahren konnte die fehlende Toxizität in normalen Zellen wie Fibroblasten als Vertreter gesunden Gewebes gezeigt werden, sowie im direkten Vergleich die hohe selektive Infektivität und Onkolyse-Fähigkeit von Adenoviren in Tumorzelllinien.

Zum jetzigen Zeitpunkt stellen adenovirale Strategien lediglich eine aussichtsreiche Therapieform parallel zu den etablierten Behandlungsmethoden des Mamma-Karzinoms dar. Es ist anzunehmen, dass sich anschließende, zukünftige Untersuchungen wie Virus-

Replikation-rt-PCR-E4 und rt-PCR-E1A den Nachweis der Onkolyse-Fähigkeit der vorhandenen CRAbs erhärten können. Entsprechende Fortschritte, so ist zu hoffen, wird die adenovirale Forschung der nächsten Jahre zeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien und Lösungen

2.1.1. 10% DMEM-F12

Um die Zellen zum Wachstum anzuregen wurde 10% DMEM-F12 verwendet.

Dieses spezielle Nährmedium wurde unter Verwendung von FBS und D-MEM/F-12-Trockensubstanz hergestellt.

FBS: Fetal Bovine Serum
BenchMark™, GEMINI BIO-PRODUCTS
Triple 0.1-ungefiltert, Lagerung bei -20°C
Cat. 100-106
Lot A64008D

D-MEM/F-12: GIBCO Invitrogen Corporation
Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (1:1)
15,6 g/pkg für 1l Medium
Cat. No. 12400-016
Lot No. 1309837
mit 15 mM HEPES-Puffer
L-Glutamin
Pyridoxin-Hydrochlorid (nicht für reguläres Medium)
ohne Natriumbikarbonat (NaHCO₃)

Das DMEM-Trockenpulver wurde mit einem geringen Volumen an destilliertem Wasser, später mit insgesamt einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde zur besseren Durchmischung über mehrere Minuten bewegt. Hinzugefügt wurden 1,2 g NaHCO₃ zur pH-Neutralisierung zwischen 7,0 und 7,2 sowie 10.000 µg/ml Streptomycin,

10.000 i.U. Penicillin und 25µg/ml Amphotericin B (1 ml zur Herstellung von 1l Lösung, als Mixtur erhältlich mit der Cat. No. 30-004.CI, Lot No. 300004078 von cellgro, Mediatech Incorporation, Hemdon, VA 20171). Die Filtration der Lösung erfolgte mittels NALGENE-Filter und Vakuum-Technik. Für die Herstellung von 100 ml einer 10%-Lösung werden 10 ml FBS (aufgetaut im 56°C warmen Wasserbad) und 90 ml der gefilterten DMEM-Lösung vermischt, beschriftet und kühl gestellt. Die Lösung ist unmittelbar nach Herstellung nutzbar.

2.1.2. MEGM mit BPE

HMEC benötigen zum Wachstum ein spezielles Medium, bestehend aus MEGM (mammary epithelial growth medium) und BPE (bovine pituitary extract). Hierfür wird 1 ml BPA (Cat. No. CC-4009, LOT No. 08104929) zu 250 ml MEGM mit 10 mg/ml hEGF, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µl/ml Hydrocortison, Gentamicin und Amphotericin B, als fertige Lösung unter der Cat. No. CC-3051A, LOT No. 01114310 erhältlich bei Cambrex Bio Science, Walkersville Inc., USA, hinzugefügt und vermischt.

2.1.3. FBM + 2% FBS

Dieses Medium dient der Wachstumsförderung von Fibroblasten. Hierzu werden jeweils 0,5 ml Gentamicinsulfat, Amphotericin B (CAT.No. CC-4081Z, LOT.No. 08104651), bovines Insulin (cat.no. CC-4021Z) und rhFGF-B (cat.no. CC-4065Z) mit 500 ml FBM vermischt. Anschliessend werden 2% FBS (das entspricht 10 ml FBS auf 500 ml FBM) hinzugefügt. Zur besseren Haltbarkeit wird das Volumen in fünf Plastikröhrchen zu jeweils 50 ml portioniert, die restlichen 250 ml verbleiben zur sicheren Aufbewahrung im Kühlschrank in der mit Parafilm verschlossenen Flasche.

2.2. Virus-Vorbereitung

Die Herstellung der auf ihre Effektivität zu untersuchenden Adenoviren erfolgt mit dem Adeno-Kit HEK-293 (= human embryonic kidney), welches Ad5 und Zellkulturen enthält. Mit dem Verfahren der Purifikation wird der Adeno-Kit gereinigt und konzentriert, so dass schließlich ein nutzbares Eluat zur Verfügung steht.

2.3. Untersuchte modifizierte Adenoviren:

2.3.1. Ad5/3-CXCR4-E1A-PIX-RFP (#I):

Dieser Adenovirus ist dahingehend modifiziert, dass er eine Fiber-Knob-Chimere enthält, das heißt, dass im Sinne eines transduktionalen Targetings der Fiber-Knob des Ad-Serotyps 5 durch denjenigen des Ad3 ausgetauscht wurde. Auf diese Weise die Rezeptor-Abhängigkeit (CAR-Rezeptor) umgehend, ist eine Infektion von Tumorzellen gewährleistet. Mit dem Einfügen des CXCR4 (COX 4, Cyclooxygenase 4) wurde ein effektiver Promoter zur Transkriptionskontrolle eingeführt, von dem eine selektive adenovirale Infektion erwartet werden darf. Bei dem pIX-RFP-Fragment handelt es sich schließlich um ein genetisch modifiziertes Fusions-Protein an der Virus-Oberfläche, das über den inkorporierten fluoreszierenden Farbstoff ein Monitoring der Infektion, Verteilung und Replikation des Adenovirus ermöglicht.

2.3.2. Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-PIX-RFP (#II):

Dieser Adenovirus unterscheidet sich von #I Ad5/3-CXCR4-E1A-PIX-RFP durch das eingefügte UTR-Fragment, das die Hintergrundaktivität und Replikation in Normalgewebe vermindern soll. Sogenannte eIF4E sind in Tumorzellen überexprimiert und binden UTR, so dass der normale Lebenszyklus der Adenoviren und damit die Replikation in den Tumorzellen vollzogen wird, während eine fehlende, bzw. verminderte Menge an eIF4E in gesunden Zellen die vollständige Bindung von UTR verhindert, so dass eine Replikation und damit einhergehende Onkolyse in Normalgewebe signifikant reduziert wird.

2.3.3. Ad5-wt:

Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Wildtyp des Adenovirus, Serotyp 5, der als Vergleichsparameter herangezogen wurde, da keine transduktionale Kontrolle erfolgt. Es handelt sich um einen nativen Adenovirus, der eine weitaus höhere Replikationsrate besonders in Normalgewebe aufweist.

2.3.4. Ad5/3-wt:

Im Vergleich zum Ad5-wt ist über diesen Adenovirus eine transduktionale Kontrolle über die Bildung einer Fiber-Knob-Chimäre gewährleistet. Es wird eine ebenso hohe Infektivität und Replikation in Normalgewebe wie in Tumorgewebe infolge der Umgehung der CAR-Abhängigkeit erwartet.

2.3.5. Ad5-GFP:

GFP steht für „green fluorescent proteins“ und ist ein im Virusinneren genetisch determinierter Farbstoff, der ähnlich wie das RFP die Infektivität, Verteilung und Replikation der Adenoviren im Tumorgewebe nachvollziehbar macht.

2.4. Zellkulturen

2.4.1. MB-435s

MB-435s ist eine spezielle im Jahr 1976 im Gen-Labor isolierte Tumorzelllinie (sog. Elternlinie aus einem duktalem Mamma-Karzinom einer 31-jährigen Kaukasierin, (Verdopplungszeit von 24 Stunden), mit morphologisch spindelförmigen, epithelähnlichen Zellen. Die Zellen wachsen adhärent, wirken nicht kanzerogen bei Immunsuppression im Tierversuch (Maus) und formen Kolonien im halbfesten Medium. MB 435s weist eine Expression der Faktoren α - und β 3-Integrins (Vimentin, Filament des Zytoskeletts und Osteopontin, extrazelluläres Strukturprotein) auf.

2.4.2. MB-361

Diese 1975 durch CAMR (Centre for Applied Microbiology & Research, ECACC, Salisbury, Wiltshire) kultivierten Epithelzellen eines Adenokarzinoms stammen von Hirngewebsmetastasen einer 40jährigen Kaukasierin nach überstandener Mastektomie und Radiotherapie. Die Tumorzellen sind Östrogen-Rezeptor positiv und unfähig die Kollagenmatrix von Fibroblasten zu durchdringen, was im In-vitro-Versuch in Form einer verminderten Invasivität Ausdruck findet. In haarlosen Mäusen ist MB-361 jedoch in der Lage Tumoren zu erzeugen. Die vermutete tumorauslösende Wirkung für den Drüsen-/Fettkörper der Mammæe liegt bei 5×10^6 Zellen. Die Tumorzellen exprimieren zahlreiche Faktoren, darunter β -Catenin (Untereinheit des Cadherin-Protein-Komplexes), E-Cadherin (Membranprotein mit Bedeutung für die Zelladhäsion), beide mRNA- und Protein-positiv, und Vimentin (Protein-negativ), zeigen eine Her2-Rezeptor-Expression sowie das Onkogen *wnt 7h*. Im Karyogramm ist das Fehlen der Chromosomen N11 und N17 auffällig.

2.4.3. MB-231

MDA-MB-231 sind Epithelzellen eines Adenocarcinoms der Mamma, 1974 von Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA aus dem Pleuraerguss einer kaukasischen Patientin isoliert. Die Kryokonservierung erfolgte durch ECACC (European Collection of Cell Cultures, Nummer: 92020424 passage no. 32). Der Karyotyp zeigt Modell Nummer 62 und 64 triploid.

2.4.4. ZR-75-1

Bei ZR-75-1-Zellkulturen handelt es sich um epitheliales, duktales Brustdrüsengewebe. Diese Tumorzelllinie wurde 34 Monate nach radikaler Mastektomie aus dem Aszites einer 63-jährigen Frau mit infiltrierendem duktalem Mamma-Karzinom der rechten Brust durch ATCC[®] gewonnen und aufbereitet. Zum Zeitpunkt der Diagnose erhielt die Patientin eine postmenopausale Östrogen-Therapie. Die Zellverdopplungszeit beträgt 80 Stunden. Jede Zelle ist polygonal mit fehlendem Zytoplasma und großem Kern.

Die Zellen exprimieren in signifikanter Anzahl Östrogen-Rezeptoren und verursachen Tumoren in haarlosen Mäusen. Die Zelllinie besitzt zu 26% einen hypertriploiden Chromosomensatz.

2.4.5. MCF-7

MCF-7 2-17 ist eine Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss einer Brustkrebspatientin kultiviert wurde. Die Zellen enthalten eine große Anzahl von 17 β -Östrogen-Rezeptoren (Bindungsstellen $6,3 \times 10^2$ pmol/mg Protein), die zum Transport des 17 β -Östradiol-Komplexes in den Nukleus befähigt sind.

2.4.6. HEK-293

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Tumorzelllinie aus menschlichen Embryonalzellen der Niere, HEK = human embryonic kidney, die hier nicht zur Funktionsanalyse bestimmter verwendeter Adenoviren, sondern zur Verifizierung der Titration der Viren genutzt wurde.

2.4.7. HMEC

HMEC steht für „Human Mammary Epithelial Cells“; hierbei handelt es sich um Epithelzellen der Mammae, die seit 1977 im Lawrence Berkeley National Laboratory, California entwickelt werden. Die ursprünglichen Gewebeproben werden im Rahmen von Reduktionsplastiken, Mastektomien, chirurgischer Intervention bei Fibroadenom, Gynäkomastie und seit 1980 auch aus Nippelsekret gewonnen. Die Digestion erfolgt über 24-72 Stunden bei 37 °C unter Einfluss von Kollagenase und Hyaluronidase.

2.4.8. Fibroblasten

Sie synthetisieren beide Komponenten der Interzellulärsubstanz, die Grundsubstanz und die Fasern. Fibroblasten sind üblicherweise im sich entwickelnden, bzw. wachsenden Bindegewebe besonders aktiv, aber auch im ausdifferenzierten lockeren Bindegewebe sind aktive Fibroblasten anzutreffen. Das Zytoplasma ist schwach eosinophil mit kurzen Zellfortsätzen. Sie sind reich an Ergastoplasma und Mitochondrien. Der Zellkern der Fibroblasten ist oval, basophil und verfügt über fein verteiltes Euchromatin sowie ein bis zwei Kernkörperchen. Fibroblasten bilden bei Gewebeerkrankungen mittels Kollagenbildung faserreiches Bindegewebe und dienen als Stütz- und Leitgewebe für Muskeln, Nerven und Organe.

Die Primärkultur wird aus Gewebe gewonnen, das in PBS-Pen-Strep auf Eis gekühlt transportiert wird. Die Zellprobe wird in 3,5 cm-Schälchen in EDTA und Trypsin in ihrem Zellverbund aufgelöst.

Hier werden Fibroblasten als ein Vertreter für normales, gesundes Gewebe als Vergleichsprobe (positive Kontrolle) herangezogen im Vergleich zur Reaktion der Adenoviren auf Tumorzellen.

2.5. Purifikation der Adenovirusstämme

Die HEK 293 Zellen wurden mit dem Adenovirus-Stamm in einem DMEM-Medium mit 2% FBS (fetal bovine serum) infiziert. Nachfolgend mit 10% Medium, bei pH 7,0-7,4 und 37° Celsius mit 5% CO₂ inkubiert, bis die meisten von ihnen im Rahmen der Virusreplikation einen zytopathologischen Effekt zeigten, indem sie sich innerhalb von 2-5 Tagen rundeten und voneinander lösten. Die anschließend mittels Zentrifugieren bei 3500 UpM über 15 Minuten gewonnenen Zellen wurden in Medium wieder gelöst, dabei wurde das verbleibende

Medium wegen der möglicherweise noch enthaltenen signifikant hohen Viruszahl in einem sterilen Röhrchen aufbewahrt. Eine Lyse der Zellen wurde durch drei Zellzyklen Gefrieren im Ethanol-/ Trockeneis-Gemisch oder bei -80 Grad Celsius (Freezer) und Auftauen im maximal 25°C warmen Wasserbad erreicht. Um unerwünschte Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Probe erneut bei 3500 UpM über 15 Min. zentrifugiert und mit 10 ml des aufbewahrten Mediums vorsichtig vermischt. Ebenfalls unerwünschte Nukleinsäuren wurden durch Hinzufügen von 1 µl Benzonase (trennt Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA auf) pro 1 ml Zellkultur-Volumen und nachfolgender Inkubation bei 37 Grad Celsius über 30 Minuten bis zu einer endgültigen Konzentration von 12,5 U/ml gebunden. Die Filtration erfolgt in einem feststehenden Versuchsaufbau.

Dem resultierenden Volumen wurden schliesslich 22 ml 10 x Loading-Puffer zu 200 ml Zellkultur zugesetzt. Um die Bindungsfähigkeit der Viruspartikel an den Membran-Adsorber zu maximieren, wurde die Membran equilibriert und Luftbläschen von der AdenoPack-Einheit sorgfältig entfernt. Anschließend wurden 10 ml PBS (phosphate buffer solution) mit leichtem Druck durch die Kanüle des AdenoPack geführt, dabei erneut die Entstehung von Luftbläschen vermieden.

Um die Viren in die Probe einzubringen, wurde der vorbereitete Überstand langsam Tropfen für Tropfen durch die AdenoPack-Einheit für die maximale Bindung von Viruspartikeln mit nicht mehr als 10 ml/Minute titriert. Mit erhöhter Durchflussrate konnte die Probe von verbliebenem Kulturmedium, kontaminierenden Proteinen und Nukleinsäuren befreit werden. Hierzu wurde das gleiche Volumen an Puffer wie das ursprüngliche Zellkultur-Volumen benutzt und mit einer höheren Durchflussrate als zuvor durch die AdenoPack-Einheit gespült. Auch hierbei dient die Vermeidung von Luftbläschen der Erhöhung der Bindungsmöglichkeiten für die Viren an der Zelloberfläche.

Für die effektive Gewinnung von Viruspartikeln wurden die gereinigten Viruspartikel mit Hilfe von 5 ml Elutionspuffer unter Beachtung einer idealen Durchflussrate von nicht mehr als 1 ml/Minute in ein steriles Röhrchen separiert und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise resultierte für #I ein Volumen von 65 ml, für #II UTR ein Volumen von 75 ml. Unter Verwendung von Vivaspin 20 zur zentrifugalen Konzentrierung für 10 Min. bei 800 UpM kann die Viruskonzentration erhöht werden. Dabei sollte das Volumen nach Zentrifugieren nicht weniger als 1 ml betragen, um der Aggregation von Viruspartikeln und dem Verlust an Infektivität vorzubeugen. Die Virus-Probe sollte nach Abschluss der Titration bei -80° Celsius eingelagert werden. Ein Austausch des Puffers in einen physiologischen, glycerinhaltigen Puffer mit PBS in einer 1:10-Dilution ist dann notwendig, wenn die vorbereiteten Adenoviren für Gewebe-Kulturen, Zellproben oder zur allgemeinen Aufbewahrung genutzt werden und wie im vorliegenden Experiment der Elutionspuffer einen zu hohen Salzgehalt aufweist.

2.6. Experimentaufbau

Die Nutzung sogenannter CRAbs (conditionally replicative adenovirus) stellt eine therapeutische Methode dar, eine effiziente Onkolyse in Tumorzellen zu erreichen. Idealerweise erfolgt eine virusvermittelte Onkolyse von infiziertem Tumorgewebe durch spezifische Replikation und Verteilung der CRAbs in Tumorzellen, während das gesunde umgebende Gewebe geschont wird. Eine Anzahl von Charakteristiken des Adenovirus Typ 5 macht ihn zu einem optimalen Gentherapie-Vektor. Trotz dieser Vorteile bleibt die Effizienz der Virotherapie begrenzt durch eine suboptimale Virusinfektion von Krebszellen und einer nicht spezifischen Verbreitung in gesundem Gewebe. (Abb. 4)

Die Fähigkeit von CRAbs und anderen replikativen Agenzien Tumoren auszulöschen hängt von zwei Schlüsselfunktionen ab, von der effizienten Replikation und der weiteren Verteilung innerhalb des Tumors. Ein Monitoring-System, welches quantitativ und dynamisch die Replikation und Verteilung dieser onkolytischen Viren darstellt, ist ein elegantes Verfahren für die Entwicklung dieser Agenzien und die sichere Anwendung im Patienten. Das System sollte die Replikation ebenso wiedergeben wie die Zellyse und die effiziente Verteilung der Viren. Das carboxy-terminale Ende des minor capsid Proteins pIX ist als ein idealer Ort für die Bindung inkorporierender Liganden wie RFP (red-fluorescent-proteine) an der Virusoberfläche beschrieben (10).

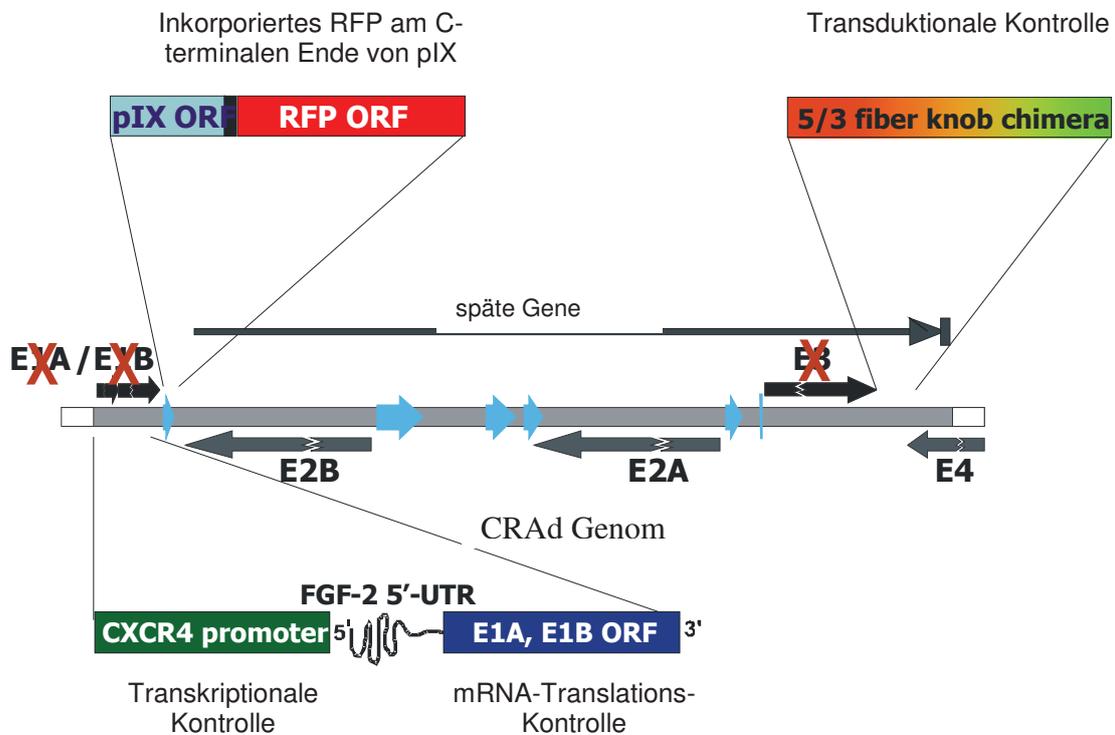
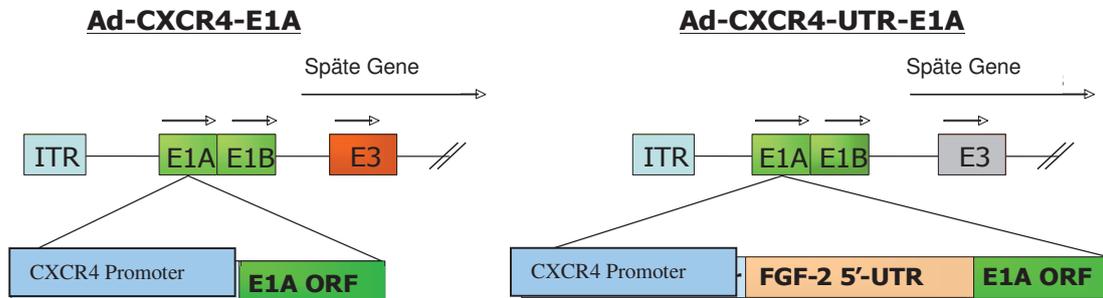


Abb. 4: CRAd mit Triple Level Targeting-Kapazität und Monitoring; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA

In dieser Studie, in der zwei unterschiedliche CRAds, #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP mit dem fluoreszierenden Fusions-Protein pIX entwickelt wurden, konnte die Expression des Farbstoffs in den infizierten Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert und durch Flow-Zytometrie quantifiziert werden. Die Ergebnisse lassen die Spur der CRAd-Infektion verfolgen sowie die Verteilung im Gewebe.

Untersucht wird der Effekt der beiden Adenoviren auf verschiedene Zellkulturen, Mamma-Karzinom-Zellen und normales Mamma-Gewebe. Überprüft wird hierbei auch, welchen Einfluss die eingefügte UTR-Region in jeder der beiden Zellkulturen ausübt.

Üblicherweise ist der Effekt der UTR und damit die Replikations-Rate in normalen Zellen niedriger durch den geringeren Gehalt an eIF4E. (Abb. 5)



Transkriptionales Targeting

Ad-E1A-Gen
 Unter Transkriptionskontrolle
 des Tumor spezifischen
 Promoters CXCR4

Transkriptionales + Translationales Targeting

Ein Dual Level Targeting ermöglicht die Kontrolle
 der E1a-Transkription (CXCR4-Promoter) und
 E1A-Protein-Translation mittels FGF-2 mRNA
 5'UTR

Abb. 5: Nutzung des translationalen Targetings von CRAds; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA

Bei der UTR handelt es sich um eine zusätzliche Sequenz am 5'-Ende der DNA, welche den Start der codierenden Region darstellt, sogenannter „Leader“. Im Gegensatz dazu dient die 3'-Region als sog. „Trailor“, eine zusätzliche Sequenz, die dem terminierenden Signal folgt. Beide Sequenzen werden innerhalb der DNA nicht genutzt, um für ein Protein zu kodieren, obwohl sie ein Teil der Transkription sind, so dass sie für die gezielte Translationskontrolle in Zellen eingesetzt werden können, ohne das Genom zu verändern.

Darüber hinaus werden Informationen über die Effizienz des Kapsidproteins pIX erwartet, welches durch genetische Modifikation RFP als Farbstoff zu binden vermag und so das Eindringen der Adenoviren in die Tumorzelle fluoreszenzmikroskopisch sichtbar macht. (Abb. 6)

Um bestmögliche Messwerte zu erhalten, wird die Konzentration der vorbereiteten Adenoviren mittels Titration bestimmt. Das Einfügen der Viren in die Zellen soll im Verhältnis 10:9 (10^{-3}), bzw. 10:10 (10^{-4}) erfolgen.

Das Wachstum der Viren wird durch Zugabe von zwei unterschiedlichen Antikörpern (mouse-anti-hexon und goat-anti-mouse) in PBS und 200 µl 1% BSA über 5 Minuten, die braune Proteine enthalten, fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Der erste Antikörper bindet das Hexon über 1-2 Stunden. Bei dem zweiten Antikörper handelt es sich um ein Enzym, HRP (Horseradish per Oxidase), welches ein gängiges Enzym in der Durchführung des Western Blot-Verfahrens ist und das verwendete Substrat, DAB (Diaminobenzidin) in Farbe umwandelt. Nach Auswaschen des Substrates mit 500 µl PBS werden die Zellen unter dem Phase-Kontrast-Mikroskop betrachtet. Hier macht kurzwelliges UV-Licht die RFP-kombinierten Zellen sichtbar.

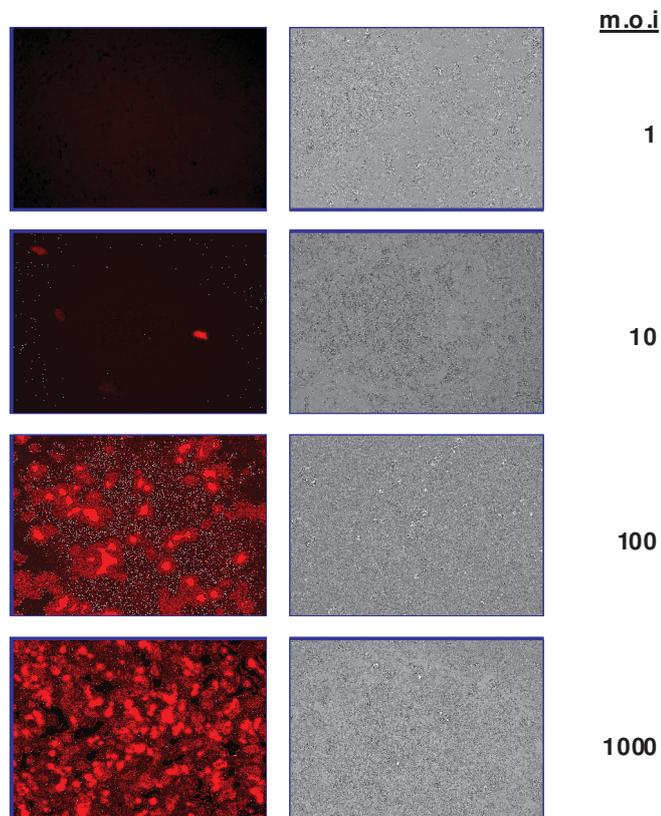
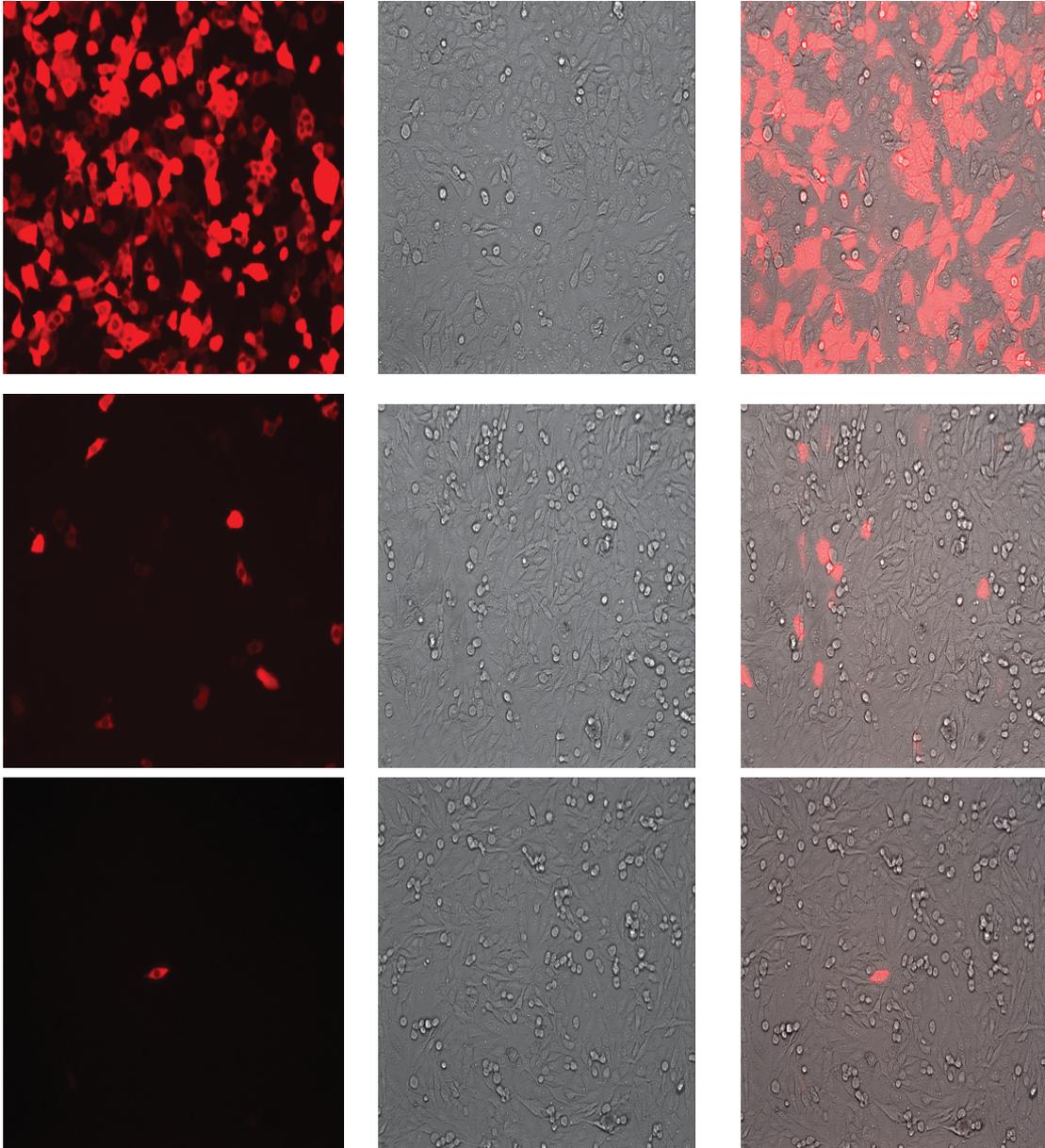


Abb. 6: Ad-CXCR4-UTR-E1A pIX-RFP

Durch die lose Bindung der Adenoviren an RFP wird in der Fluoreszenz-Mikroskopie die Infektivität der Adenoviren für die Tumorzellen deutlich.

Zum Nachweis von tatsächlich fluoreszierenden Zellen und damit zum Nachweis dafür, dass das Virus tatsächlich in die Zellen inkorporiert wurde, erfolgt eine Kontrolle mit dem Blaufilter. Eine Fixierung mit Methanol vermeidet Überwucherung.

Es folgt die Titration für die Ermittlung der genauen Anzahl von Zellen.



m.o.i. 1000: red / light / merge

m.o.i. 100: red / light / merge

m.o.i. 10: red / light / merge

Abb. 7: Aufnahme 48 hrs nach Infektion

Die Aufnahme zeigt eine in Abhängigkeit von der Konzentration deutlich zunehmende Anzahl fluoreszierender Zellen, dabei beweist die Fluoreszenz den Einbau der Virus-DNA in die

Tumorzelle. Anhand der sich verändernden Zell-Morphologie kann auf eine erhöhte onkolytische Aktivität geschlossen werden. Ganz offensichtlich ist die stärkere Expression von #I CXCR4-E1A-pIX-RFP im Vergleich zu #II CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP. (Abb. 7)

Letztlich erfolgt der Nachweis über die absolute Anzahl inkorporierter Adenoviren in die Zellen über Flow-Zytometrie (RFP).

Nach vorsichtiger Aspiration des Mediums werden die Zellen mit 100 µl Trypsin 0,25% mobilisiert und mit Hilfe von 1 ml Medium ihrer Konzentration entsprechend in 36 Plastikröhrchen pipettiert. Zusätzlich wird eine Probe unbehandelter Tumorzellen als Zelllieferant aufbereitet. Erwartet wird der Einbau der Adenoviren in die Tumorzellen, dabei wandert der Peak der Kurve mit zunehmender Konzentration nach rechts.

3. Ergebnisse

Untersuchung der Infektivität zweier CRADs in unterschiedlichen Zelllinien:

#I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP & #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP

Durchfluss-Zytometrie

Crystal violet

Tissue slide Technik

Die Nutzung sogenannter CRADs (conditionally replicative adenovirus) stellt eine therapeutische Methode dar, eine effiziente Onkolyse in Tumorzellen zu erreichen. Idealerweise erfolgt eine virusvermittelte Onkolyse von infiziertem Tumor-Gewebe durch spezifische Replikation und Verteilung der CRADs in Tumorzellen, während das gesunde umgebende Gewebe geschont wird. Eine Anzahl von Charakteristiken des Adenovirus Typ 5 macht ihn zu einem optimalen Gentherapie-Vektor. Diese bestehen insbesondere in der doppelsträngigen, linearen DNA, im Ablauf einer Expressionskaskade sowie in dem Vorhandensein sogenannter „später“ Gene, die im Zuge des produktiven Infektionszyklus zu einer Zelllyse führen. Trotz dieser Vorteile bleibt die Effizienz der Virotherapie durch eine suboptimale Virusinfektion von Tumorzellen und einer nicht spezifischen Verbreitung in gesundem Gewebe begrenzt.

Die Fähigkeit von CRADs und anderen replikativen Agenzien, Tumoren zu zerstören, hängt von zwei Schlüsselfunktionen ab, von der effizienten Replikation und der Verteilung innerhalb des Tumors. Ein Monitoring-System, welches quantitativ und dynamisch die

Replikation und Verteilung dieser onkolytischen Viren darstellt, ist hilfreich für die Entwicklung dieser Agenzien und die sichere Anwendung am Patienten. Das System sollte also die Replikation ebenso wiedergeben wie die Zelllyse und die effiziente Verteilung der Viren. Das carboxy-terminale Ende des minor capsid Proteins pIX ist als Ort für die Bindung inkorporierender Liganden wie RFP (red-fluorescent-proteine) an der Virusoberfläche bekannt.

In dieser Studie, in der zwei unterschiedliche CRAbs, #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP mit dem fluoreszierenden Fusions-Protein pIX bestückt wurden, konnte die Expression des Farbstoffs in den infizierten Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert und durch Durchfluss-Zytometrie quantifiziert werden. Die Ergebnisse lassen die Spur der CRAbs-Infektion sowie die Ausmaß der Verteilung im Gewebe verfolgen.

Mit der Flow-Zytometrie erfolgt der Nachweis des fluoreszierenden Fusions-Proteins (RFP) und damit die Visualisierung der absoluten Anzahl eingebauter Adenoviren in die Zellen. Hierzu werden die einzelnen Zellereihen jeweils mit 100 µl Trypsin 0,25% mobilisiert und ihrer Konzentration entsprechend pipettiert. Erwartet wird der Einbau der Adenoviren in die Tumorzellen, dabei wandert der Peak der Kurve mit zunehmender Konzentration nach rechts.

Probe	0		0,1 : 1		1:1		10:1		100:1		1000:1	
	FL3	FL4										
# I 1	0,56	1,93	0,4	1,98	0,46	2,14	0,9	3,09	12,95	14,97	76,86	78,18
# I 2	0,53	1,98	0,39	1,95	0,42	1,92	0,66	2,34	15,2	17,51	77,84	79,27
# I 3	0,34	1,64	0,39	2,04	0,45	1,73	0,74	2,59	15,96	17,9	75,43	76,91
SA	0,0974	0,1499	0,0058	0,0374	0,0171	0,1675	0,0998	0,3118	1,2780	1,2991	0,9896	0,9644
Mittelwert	0,48	1,85	0,39	1,99	0,44	1,93	0,77	2,67	14,7	16,79	76,71	78,12
# II 1	0,51	1,69	0,33	1,35	0,5	1,53	0,56	2,03	0,89	2,07	25,67	26,36
# II 2	0,55	1,92	0,4	1,37	0,4	1,31	0,6	1,4	0,82	2,07	24,69	24,99
# II 3	0,4	1,43	0,34	1,32	0,49	1,59	0,52	1,38	0,8	2,25	25,22	26,01
Mittelwert	0,49	1,68	0,36	1,35	0,46	1,48	0,56	1,6	0,84	2,41	25,19	25,79
SA	0,0634	0,2002	0,0310	0,0206	0,0450	0,1204	0,0327	0,3018	0,0386	0,1637	0,4005	0,5812

Tab. 2: MB-435s Flow-Zytometrie

Counts Expressionsstärke

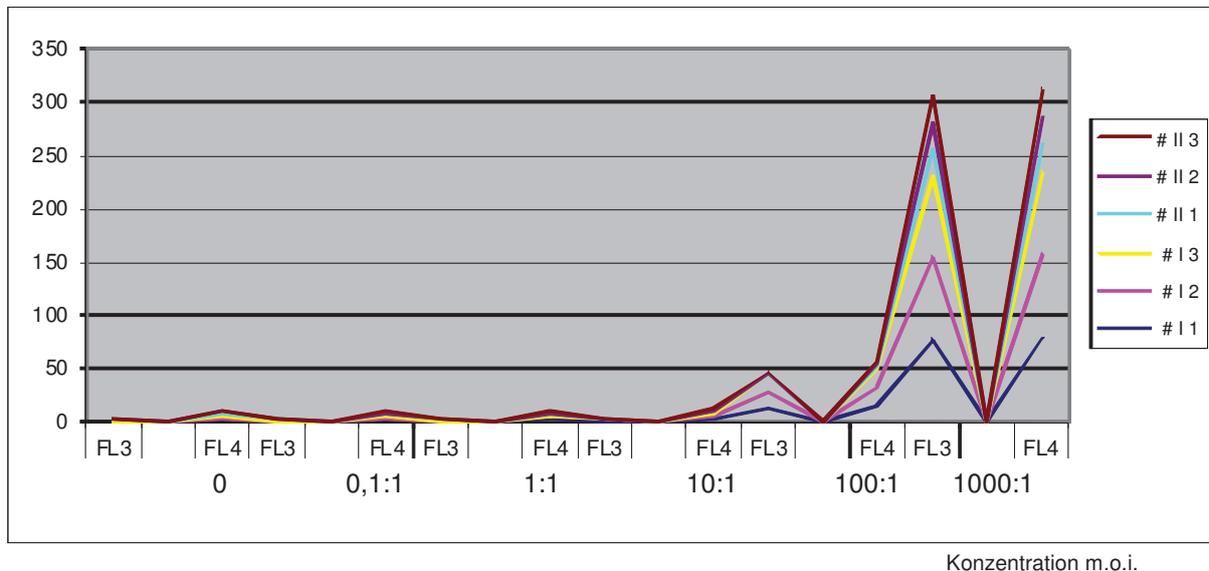


Abb. 8: MB-435s Flow-Zytometrie

Probe	0		0,1 : 1		01:01		10:01		100:01:00		1000:01:00	
	FL3	FL4										
# I 1	3,02	2,94	0,68	3,42	4,36	3,21	0,56	0,39	3,62	2,48	18,75	16
# I 2	1,12	4,21	0,38	0,29	0,43	0,3	2,62	2,46	3,41	3,33	3,02	2,52
# I 3	-	-	0,56	0,27	0,28	0,27	2,47	1,93	2,59	2,01	1,05	0,85
Mittelwert	2,07	3,58	0,54	1,33	3	1,26	1,88	1,59	3,21	2,61	7,61	6,46
SA	0,9500	0,6350	0,1233	1,2819	1,7863	1,3789	0,9377	0,8780	0,4444	0,5463	7,9205	6,7825
# II 1	3,17	6,43	5,58	4,73	2,69	1,9	2,87	2,6	2,2	1,55	5,97	7,05
# II 2	0,11	0,28	2,83	1,97	2,97	2,11	3,84	2,75	2,82	2,56	7,13	8,79
# II 3	-	-	2,36	2,09	2,95	3	1,93	1,48	2,48	2,57	5,41	6,59
Mittelwert	1,64	3,36	3,59	2,93	2,87	2,34	2,88	2,28	2,5	2,23	6,17	7,48
SA	1,5300	3,0750	1,4202	1,2737	0,1275	0,4768	0,7798	0,5666	0,2535	0,4785	0,7163	0,9475

Tab. 3: Fibroblasten Flow-Zytometrie

Counts Expressionsstärke

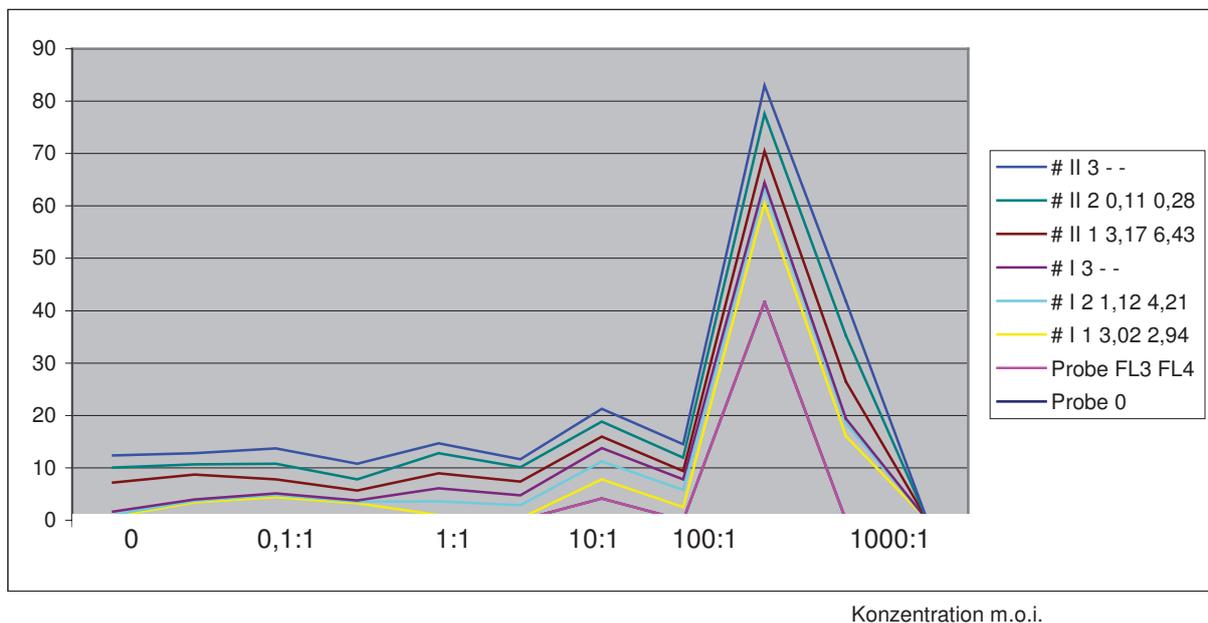


Abb. 9: Fibroblasten Flow-Zytometrie

Beide Adenovirus-Vektoren, #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP, zeigen in Fibroblasten eine weitaus geringere Infektivität als in Tumor-Zelllinien. #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP lässt im Vergleich zu #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP eine nur geringfügig höhere Expression erkennen. (Abb. 8 und 9; Tab. 2 und 3)

Probe	0		1 : 1		10 : 1		100 : 1		1000 : 1	
	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4
# I	2,11	2,13	2,77	2,97	10,43	10,41	41,80	40,46	53,73	54,30
# II	1,77	2,26	2,73	2,96	3,71	4,03	8,39	8,30	38,11	34,99

Tab. 4: MDA-MB-361 Flow-Zytometrie

Counts Expressionsstärke

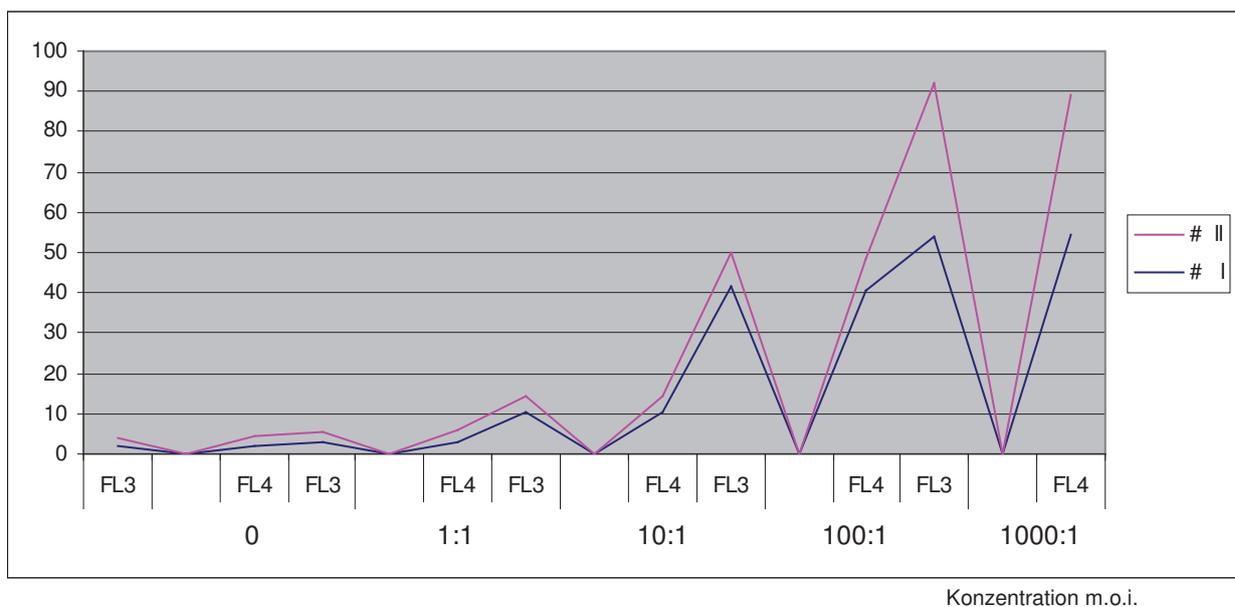


Abb. 10: MDA-MB-361 Flow-Zytometrie

Beide Adenovirus-Vektoren, #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP, zeigen in dieser Tumor-Zelllinie eine sehr viel höhere Infektivität als in Normalgewebe. #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP ist im Vergleich zu #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP signifikant stärker exprimiert. (Tab. 4 und Abb. 10)

Probe	0		1 : 1		10 : 1		100 : 1		1000 : 1	
	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4
# I	6,97	5,63	6,40	4,96	6,51	5,34	22,18	20,06	76,47	74,33
# II	5,83	5,46	6,70	5,54	5,98	6,31	6,89	5,70	20,47	17,90

Tab. 5 MDA-MB-231 Flow-Zytometrie

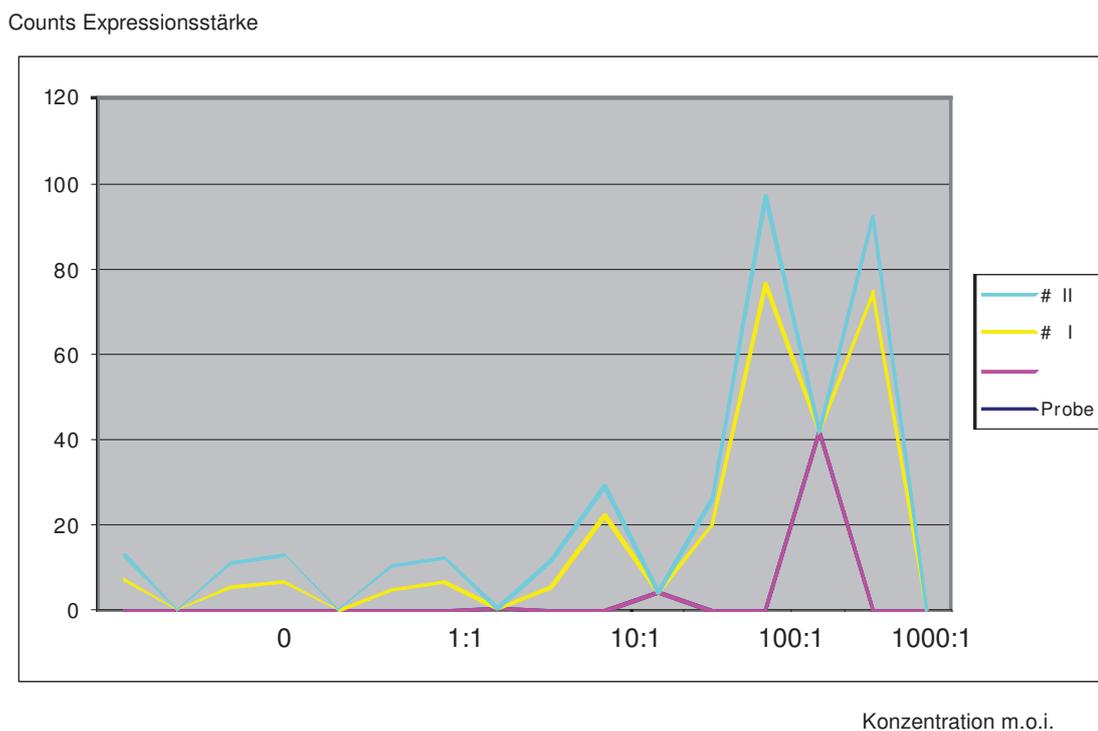


Abb.11: MDA-MB-231 Flow-Zytometrie

Beide Adenovirus-Vektoren, #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP, weisen auch in dieser Tumor-Zelllinie eine sehr viel stärkere Infektivität als in Fibroblasten oder HMEC auf. Hier ist ebenfalls #I d-CXCR4-E1A-pIX-RFP im Vergleich zu #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP signifikant stärker exprimiert. (Tab. 5 und Abb. 11)

Probe	0		1 : 1		10 : 1		100 : 1		1000 : 1	
	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4	FL3	FL4
# I	0,90	1,26	1,86	2,18	4,27	4,96	34,30	33,25	67,42	66,41
# II	1,25	1,42	1,12	1,63	0,96	1,69	5,14	4,74	40,25	35,78

Tab. 6: ZR-75-1 Flow-Zytometrie

Counts Expressionsstärke

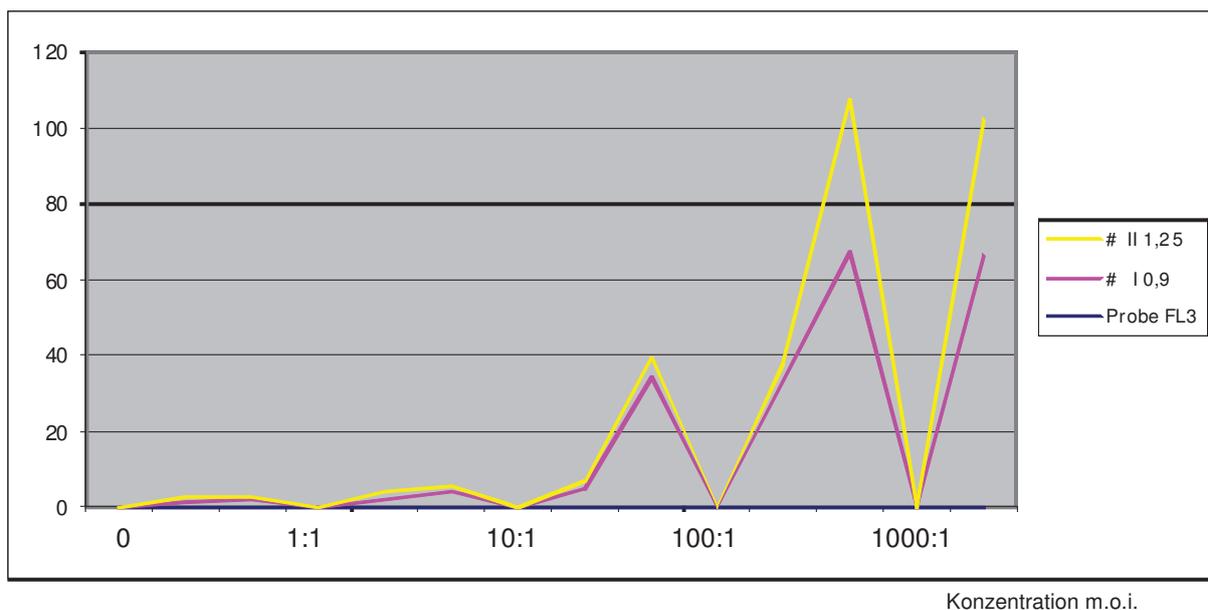


Abb. 12: ZR-75-1 Flow-Zytometrie

Beide Adenovirus-Vektoren, #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP, lassen auch in dieser Tumor-Zelllinie eine sehr viel stärkere Infektivität als in gesundem Brustgewebe erkennen. #I Ad-CXCR4-E1A-pIX-RFP zeigt im Vergleich zu #II Ad-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP hier ebenso eine signifikant deutlichere Expression. (Tab. 6 und Abb. 12)

Probe	0		0,1 : 1		1 : 1		10 : 1		100 : 1		1000 : 1	
	FL2	FL4	FL2	FL4	FL2	FL4	FL2	FL4	FL2	FL4	FL2	FL4
# I 1	-	-	-	-	1,57	0,63	3,39	3,81	4,87	1,5	7,11	9
# I 2	-	-	-	-	2,1	1,84	4,09	2,97	5,94	4,39	4,79	3,94
# I 3	-	-	-	-	1,53	1,92	-	-	7,08	0,88	-	-
Mittelwert	-	-	-	-	1,73	1,46	3,74	3,39	5,96	2,26	5,95	6,47
SA					0,2598	0,5902	0,4041	0,4200	0,9024	1,5296	1,1600	2,5300
# II 1	-	-	-	-	0,87	0	2,54	1,24	2,08	0,35	13,87	4,25
# II 2	-	-	-	-	2,51	0,31	0,98	0	2,39	0,24	9,84	3,94
# II 3	-	-	-	-	5,45	0	3,74	0,68	1,09	0	6,77	1,04
Mittelwert	-	-	-	-	2,94	0,31	2,42	0,96	1,85	0,3	10,16	3,08
SA					1,8947	0,1790	1,1300	0,5317	0,5544	0,1550	2,9074	1,4457

Tab. 7: HMEC

Counts Expressionsstärke

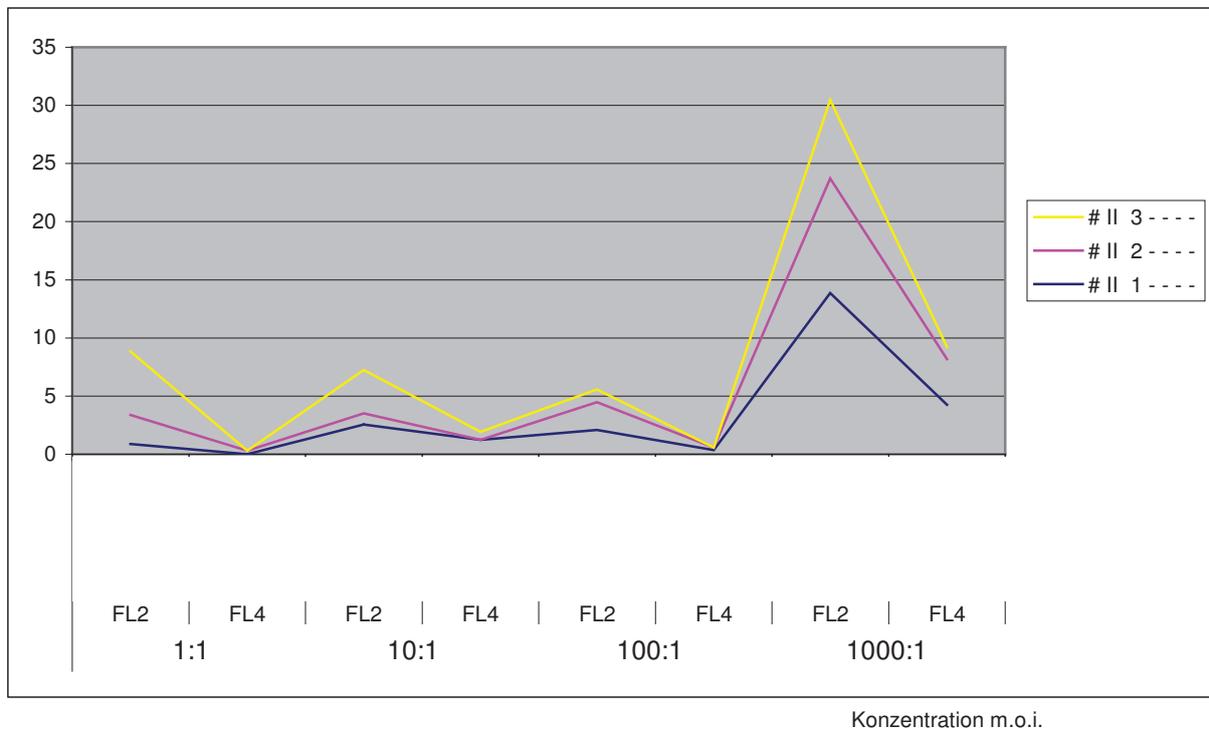


Abb. 13: HMEC

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von RFP in Fibroblasten und HMEC, also in gesunden, normalen Körperzellen, deutlich niedriger ist als in den Tumorzellreihen. Daraus ergibt sich hinsichtlich der Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Adenovirotherapie ein wichtiges Qualitätsmerkmal sowohl für das Virusdesign als auch für die Annäherung an die Anwendbarkeit im Patienten. Wir erhalten Informationen über die Größe und Verteilung der Zellen in Abhängigkeit von der Zahl der inkorporierten Adenoviren. Die RFP-Expression zeigte eine deutlich geringere Rate an infizierten Zellen mit Ad-CXCR4-UTR-E1ApIX-RFP als mit Ad-CXCR4-E1ApIX-RFP. Darüber hinaus zeigte sich die Infektivität in Fibroblasten deutlich niedriger als in Mammakarzinom-Zelllinien. Hier ist abzulesen, dass das inkorporierte UTR-Segment in der Lage ist die Replikation und damit Onkolyse adenoviraler Vektoren auf Translationsebene zu kontrollieren. (Tab. 7 und Abb. 13)

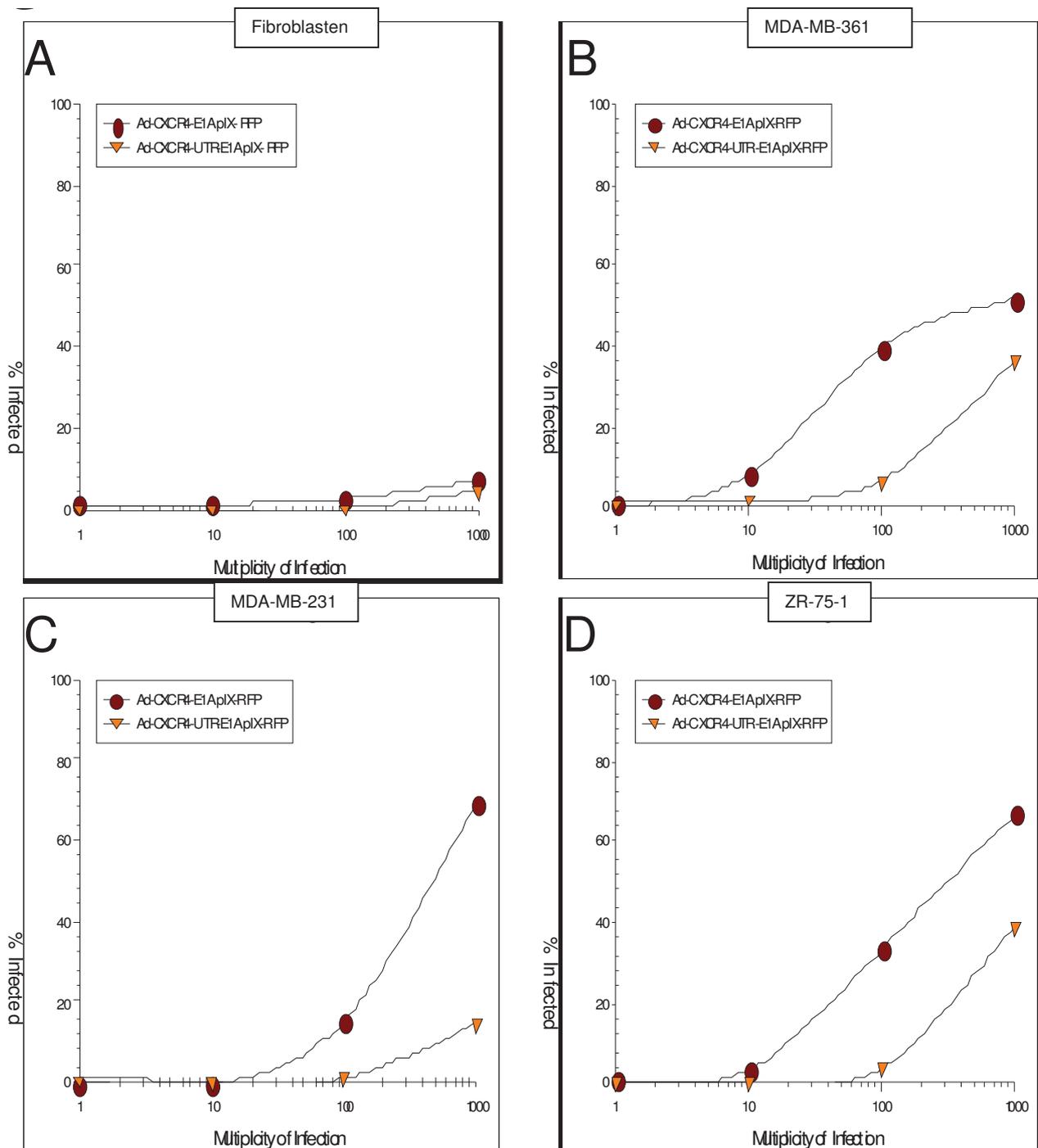


Abb.14: Quantifizierung der Adenovirus-Infektivität mittels Flow-Zytometrie; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA

Die Quantifizierung derjenigen Zellen, die mit Ad-CXCR4-E1ApIX-RFP oder mit Ad-CXCR4-UTR-E1ApIX-RFP infiziert wurden, erfolgte 48 h nach der Infektion mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie. Die RFP-Expression zeigte eine deutlich geringere Rate an infizierten Zellen mit Ad-CXCR4-UTR-E1ApIX-RFP als mit Ad-CXCR4-E1ApIX-RFP. Darüber hinaus zeigte sich die Infektivität in Fibroblasten deutlich niedriger als in Mammakarzinom-Zelllinien.

Crystal violet

Wachstums-, bzw. lebensfähige Zellen zeigen sich adhärent, haften also am Boden der verwendeten Petrischale. Nicht mehr lebensfähige Zellen flotieren frei innerhalb ihres Mediums, werden zwar angefärbt, beim Absaugen des Medium zur Darstellung der verbleibenden aktiven Zellen jedoch eliminiert. Am Boden haften und damit sichtbar bleiben also noch mitosefähige Zellen, so dass im vorliegenden Experiment mittels Crystal violet die Onkolysefähigkeit der geprüften Adenoviren, in der angegebenen Titration vorliegend, in den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-435s, MDA-MB-361, HMEC und Fibroblasten sichtbar gemacht werden konnte:

Entsprechend der Versuchsanordnung wurden etwa 1×10^4 Zellen per Feld in den 24-Feldertafeln vorbereitet, für ca. 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und mit den genannten modifizierten Adenoviren entsprechend der kalkulierten Titration infiziert. Die Feldertafeln wurden für ca. sieben Tage bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h, 96 h, 120 h hinsichtlich ihrer Überlebensrate unter dem Mikroskop untersucht.

Die Tabelle liefert eine zeitliche Übersicht in Hinblick auf die erfolgte Onkolyse in Abhängigkeit vom m.o.i.:

	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	MB-435s	MB-231	Fibroblast	MB-435s	MB-231	Fibroblast	MB-435s	MB-231	Fibroblast	MB-435s	MB-231	Fibroblast	MB-435s	MB-231	Fibroblast
# I				beg. bei 10.000	beg. bei 10.000		100	50% bei 10	50% bei 1.000	10	10	1.000	beg. bei 1	beg. bei 1	beg. bei 100
# II							1.000	50% bei 100	beg. bei 10.000	beg. bei 100	100	10.000	100	beg. bei 10	beg. bei 1000
Ad5/3wt							10	10			1	1.000	beg. bei 1	beg. bei 0,1	100
Ad5wt							10.000	1.000	beg. bei 10.000	1.000	100	1.000	1.000	beg. bei 10	beg. bei 100
Ad-GFP											beg. bei 10.000			beg. bei 1000	

Tab. 8: Crystal violet, zeitliche Übersicht der Onkolyse in Abhängigkeit vom m.o.i.

Konzentration m.o.i.

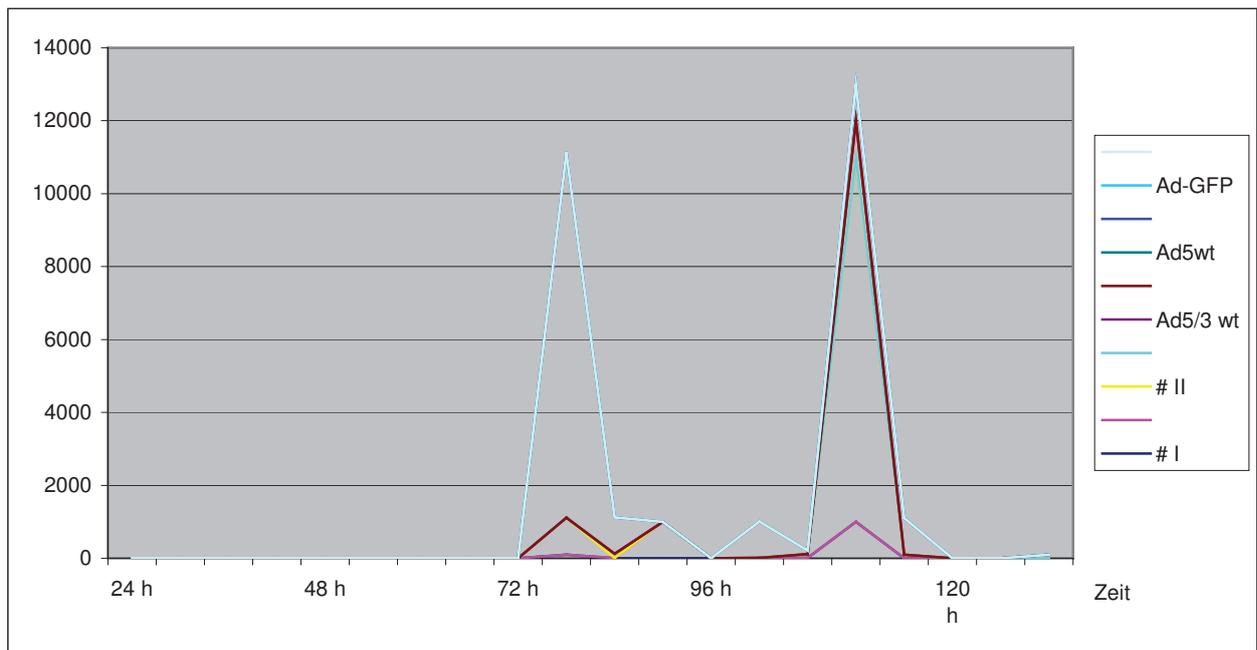


Abb. 15: Crystal violet, zeitliche Übersicht der Onkolyse in Abhängigkeit vom m.o.i.

Nach Inkubation erfolgte am 5. Tag das vorsichtige Absaugen des Mediums und Crystal violet wurde mit ca. 0,5 ml per Feld hinzugefügt. Die 24-Feldertafeln wurden ca. eine Minute leicht hin- und her bewegt, um eine optimale Dispersion des Farbstoffs zu erreichen. Beim anschließenden Absaugen von Crystal violet wurde eine Berührung des Bodens mit der Pipette sorgfältig vermieden, um eine Lochbildung im Färbemuster zu vermeiden.

#I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP

#I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP zeigt in den Tumorzellreihen MDA-MB-435s und MDA-MB-231 die deutlichste Onkolyse-Aktivität bis zu einem m.o.i. von 10 nach 144 Stunden, allerdings keine Onkolyse in Fibroblasten.

#II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP

#II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP ist mit einer Onkolyse-Effektivität bis zu einem m.o.i. von 100 nach 144 Stunden vergleichbar mit der Effektivität von #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP. Auch #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP wirkt nicht Zell-zerstörend auf Fibroblasten.

Ad5/3-wt

Ad5/3-wt liefert den Nachweis für die höchste, da unselektive Onkolyse in allen Zellreihen bis zu einem m.o.i von 0,1 in MDA-MB-435s.

Ad5-wt

Mit Hilfe des Wildtyps als sogenannte Positiv-Kontrolle konnte hier die nur minimale adenovirale Infektivität und damit nur geringfügige Onkolyse-Fähigkeit verdeutlicht werden.

Ad-GFP

Ad-GFP zeigt in allen Zellreihen keinen Effekt in Hinblick auf eine stattgefundene Onkolyse.

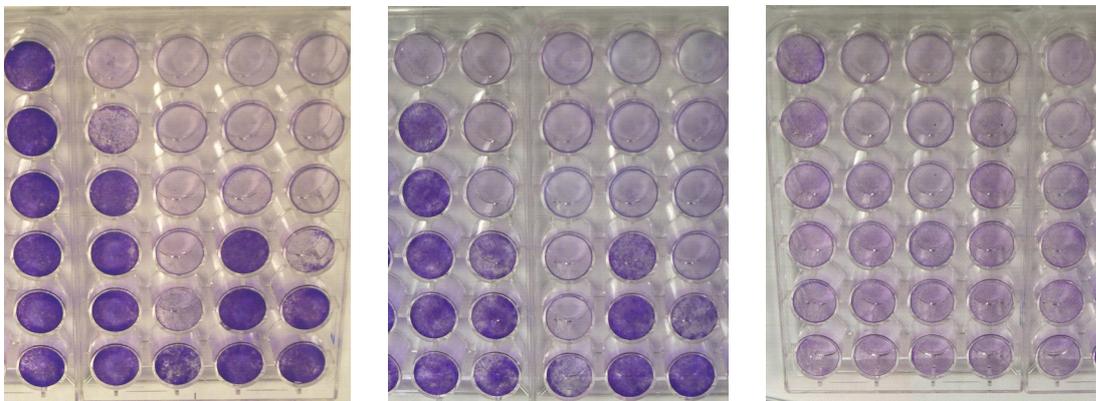


Abb. 16: Versuchsanordnung Crystal violet

Ad- Ad5- Ad5/3- #II #I
GFP wt wt
MDA-MB-435s

Ad- Ad5- Ad5/3- #II #I
GFP wt wt
MDA-MB-231

Ad- Ad5- Ad5/3- #II #I
GFP wt wt
Fibroblasten

Fluoreszenz-Mikroskopie

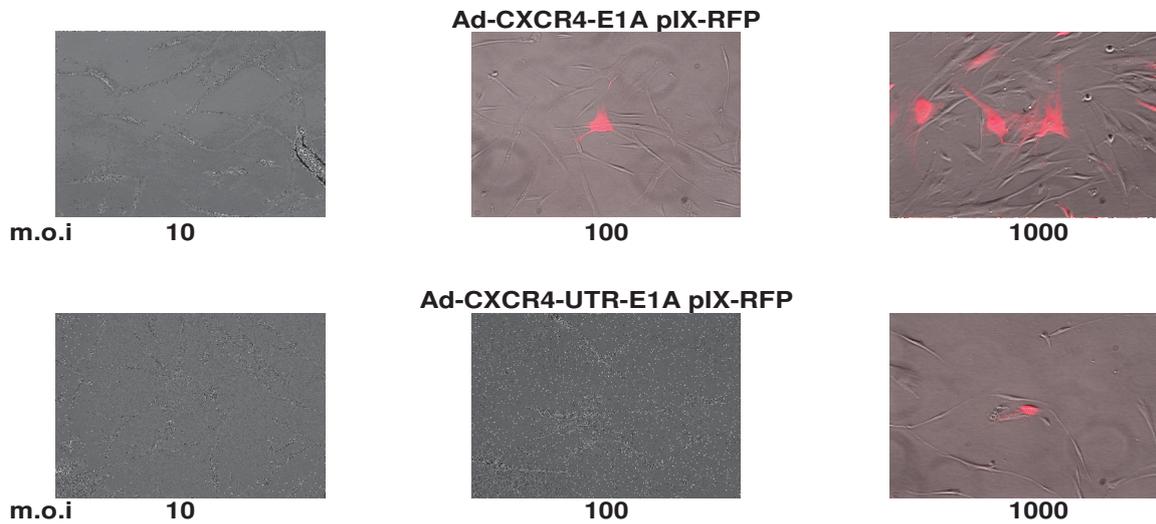


Abb. 17: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von Fibroblasten 48 h nach Infektion, 10-fache Vergrößerung, geringere Infektion von Normalgewebe im Vergleich zu Krebszellen

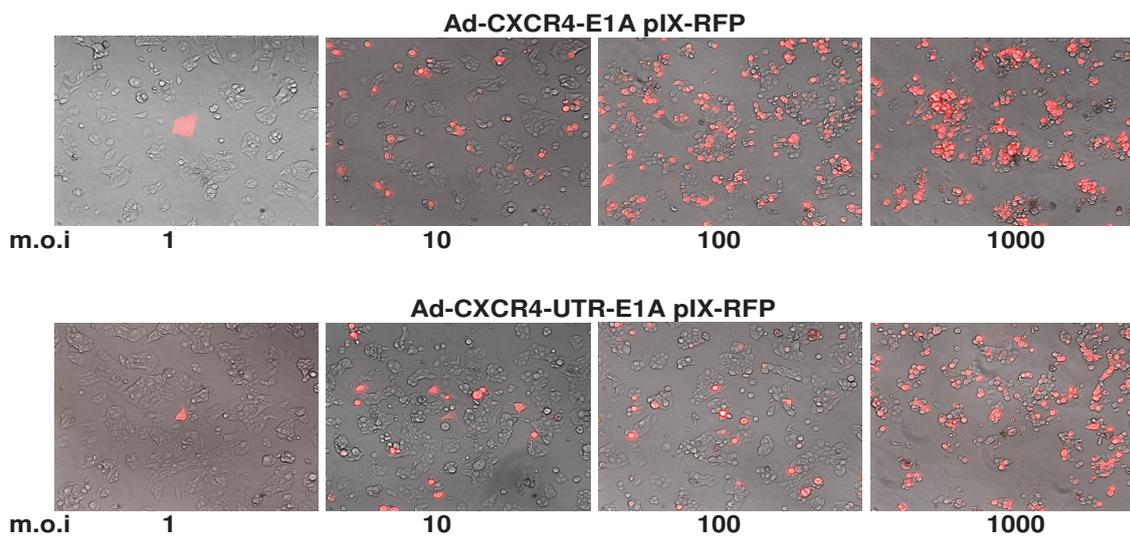


Abb. 18: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von MDA-MB-361 Mammakarzinom-Zelllinie 48 h nach Infektion, 10-fache Vergrößerung

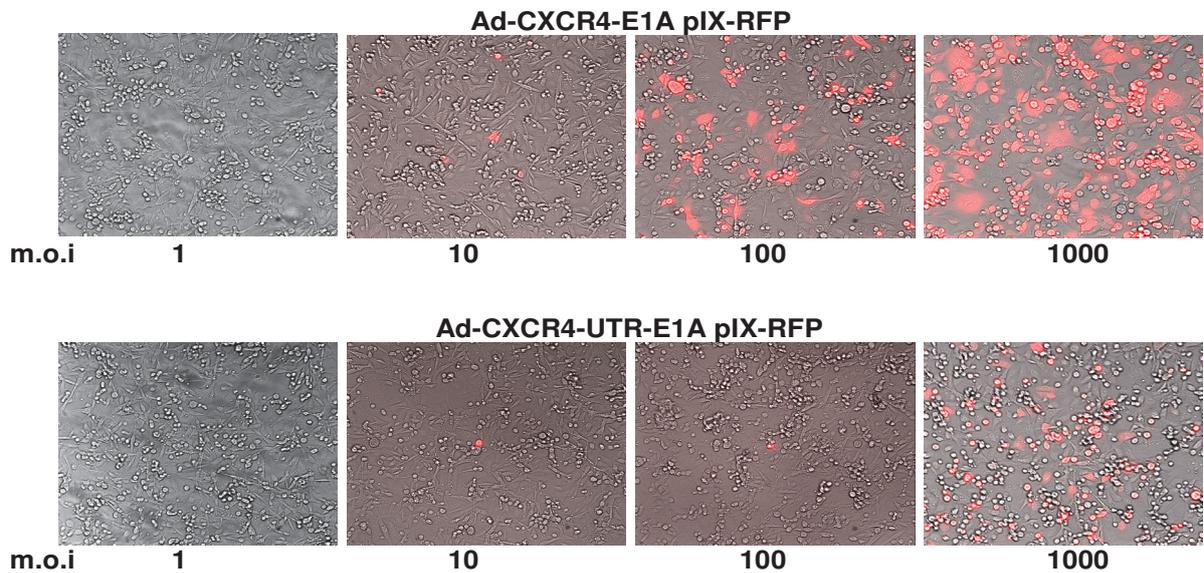


Abb. 19: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von MDA-MB-231-Zellen 48 h nach Infektion, 10-fache Vergrößerung, signifikant niedrigere Infektion von Ad-CXCR4-**UTR**-E1A pIX RFP

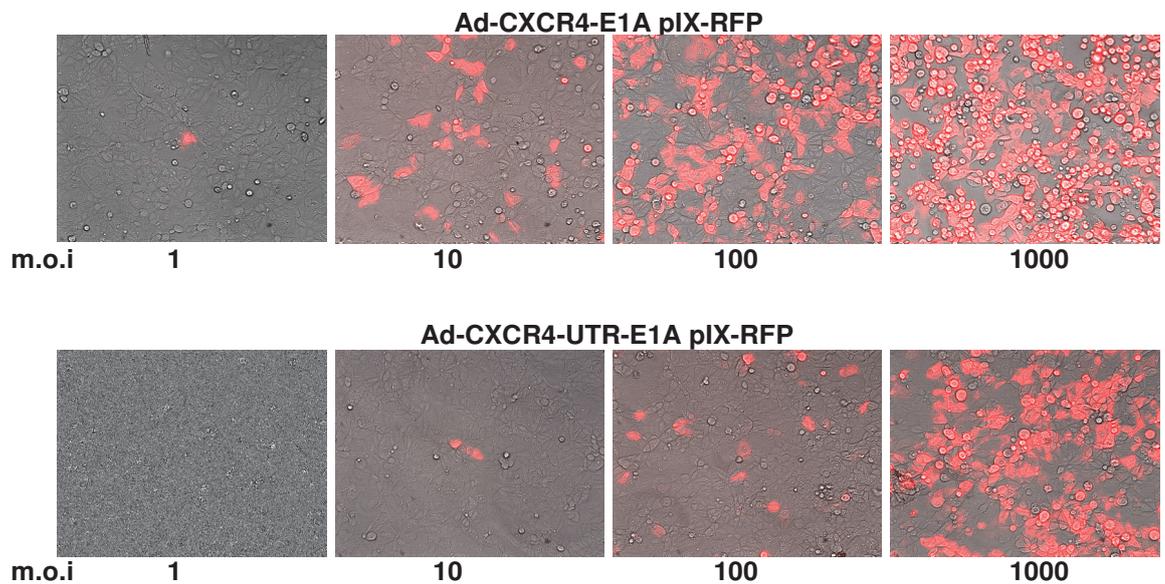


Abb. 20: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung von ZR-75-1-Mammakarzinom-Zelllinie 48 h nach Infektion, 10-fache Vergrößerung

Effekt von #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP auf MDA-MB-435s in Tissue Slide-Technik

Die Untersuchung der Infektivität von genetisch modifizierten Adenoviren mit Tissue Slide-Technik erhärtet die Ergebnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie und der Flow-Zytometrie. Unter Verwendung spezieller Antikörpern wurden die mit pIX-RFP-Fusions-Protein modifizierten Adenoviren in ihrer Interaktion an der Zellmembran von Mamma-Karzinom-Zellen, MDA-MB-435s, visualisiert. Die mittels Fluoreszenz- und besser Confocal-Mikroskopie gewonnenen Bilder zeigen durch die mehrdimensionale Mikroskopie eine bessere und deutlichere Tiefenabgrenzung der fokussierten Zelle und erhöhen die Evidenz der Ergebnisse.

Jede der acht Kammern der Tissue Slides wurde mit einem Volumen von 200 µl an Zellsuspension, MDA-MB-435s, gefüllt, dabei enthielt jede Kammer 10.000 Zellen.

24 Stunden nach Vorbereitung der Zellsuspension in den Kammern der Tissue Slides wurden die Zellen mit den vorgesehenen Adenoviren, #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP infiziert.

Nach Aspiration des Mediums erfolgte eine Permeabilisierung des Nukleus mit HOECHST® #33342 (Lot 121H0382, SIGMA CHEMICAL, St. Louis) in einer 1 : 100-Dilution über 5 Min. Im Anschluss wurden die Zellen mittels 200 µl Paraformaldehyd 3% (16%-Lösung, Cat. 15700, 10 ml, Electron Microscopy Sciences, Washington) über 10 Min. fixiert.

Nach Entfernen des Schlittens wurde in jede Kammer 1 Tropfen DAPI getropft und mit einer passenden Deckplatte verschlossen. Der Objektträger wurde schließlich mit Klarlack versiegelt. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Confocal-Mikroskopie.

Gezeigt werden konnte, dass die Adenoviren an der Zelloberfläche der Tumorzelle anhaften und einige auch in den Nukleus eintreten konnten. Die Bildqualität ist gut. Eine Optimierung wird mit der Verwendung von speziellen Antikörpern erreicht.

Die Untersuchung der Infektivität von genetisch modifizierten Adenoviren mit Tissue Slide-Technik unter Verwendung von speziellen Antikörpern ist als erweiterndes Verfahren in Hinblick auf die Fluoreszenz-Mikroskopie und die Flow-Zytometrie der mit pIX-RFP-Fusions-Protein visualisierten Zellen zu verstehen. (Abb. 21)

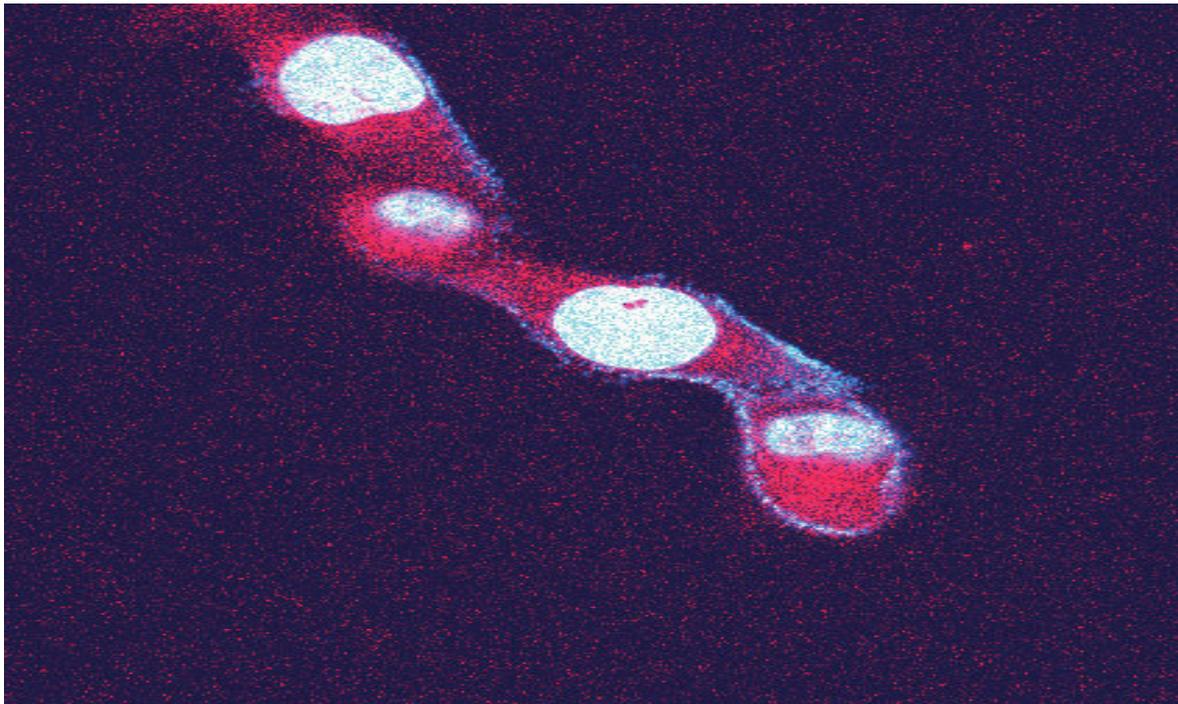


Abb. 21: Die Untersuchung der Infektivität von genetisch modifizierten Adenoviren mit Tissue Slide-Technik unter Verwendung von speziellen Antikörpern; J. Michael Mathis, Ph. D., Dept of Cellular Biology and Anatomy, LSU Health Sciences Center, Shreveport, USA.

Die hier verwendeten Antikörper, Rabbit IgG FITC-Isotype Control (ab37406) und Rabbit polyklonal to RFP (FITC) (ab34764), wurden über die Abcam Incorporation, One Kendall Square, Bldg. 200, 3rd Floor, Cambridge, MA 02139 bezogen und stellen eine wirkungsvolle und vielfältige Strategie zum Nachweis exprimierter genetischer Produkte dar.

Rabbit polyklonal to RFP (FITC) (ab34764) ist ein rekombinantes Fusions-Protein (mushroom polyclonal Discosoma), welches RFP-besetzte Proteine erkennt, eine Reaktion mit Serum-Proteinen erfolgt nicht. Das Präparat (1mg/ml) ist in der Konzentration 3,4 Mol FITC per Mol Kaninchen-IgG erhältlich und wird in einem speziellen Puffer konserviert (0,01% Natriumazid, 10 mg/ml BSA, 0,15 Mol Natriumchlorid und 0,02 Mol Kaliumphosphat). Bei Rabbit IgG FITC-Isotype Control (ab37406) handelt es sich um einen zum Vergleich als Negativ-Kontrolle eingesetzten polyklonalen IgG-Antikörper. Eine spezifische Bindung an RFP bleibt aus. Die Konzentration der hier verwendeten Probe beträgt 5,00 mg/ml.

Für beide Antikörper liegen die empfohlenen Potenzierungen für optimale Ergebnisse zwischen 1: 500 und 1:2500.

4. Diskussion

Nach kardiovaskulären Erkrankungen stellen Karzinomerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa dar und sind aktuell für ca. einviertel aller jährlichen Todesfälle verantwortlich. Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Industrienationen, das heißt jede achte bis zehnte Frau ist betroffen. Das statistische Überleben betroffener Patienten konnte trotz zahlreicher Innovationen in den Therapiekonzepten und Modalitäten, insbesondere für progrediente Stadien, nur minimal gesteigert werden. Moderne, kürzere Operationsverfahren sowie verbesserte Anästhesieformen ermöglichen ausgedehntere Operationen auch an Patientinnen mit reduziertem Allgemeinzustand und hoher Comorbidität. Die bekannten konventionellen Therapiemethoden wie Hormon-, Chemo- und Strahlentherapie konnten in den vergangenen Jahren bereits signifikante Erfolge in der Behandlung des Mammakarzinoms erzielen. Optimierte Therapiekonzepte haben hier zusätzlich die Überlebensrate verbessert. Während die Zahl an Neuerkrankungen beim Mammakarzinom weiter ansteigt, nimmt die Mortalität seit Mitte der 90er Jahre leicht ab, so dass man einerseits erfolgreich krankheitsfreie Interfalle und das Gesamtüberleben bei Patientinnen in frühen Stadien verlängern konnte, andererseits jedoch Frauen mit metastasierter Erkrankung bisher meist nur einem palliativen Ansatz zugeführt werden können. Der Profit für Patienten in fortgeschrittenen Stadien blieb bisher trotz aller Erfolge begrenzt, so dass neue und verbesserte Therapieverfahren notwendig und wünschenswert sind. Die Gentherapie hat sich als potentielle Möglichkeit erwiesen, für solche Patienten ein noch höheren Benefit zu erzielen, da erste klinische Nachweise für deren Effektivität und Sicherheit erbracht wurden.

Klinische Erfolge bleiben abzuwarten. Hier erhofft man sich deutliche Verbesserungen in der Behandlung fortgeschrittener Karzinomerkrankungen. Denkbar ist durchaus, dass sich in der Kombination von Gentherapie und etablierten Therapien eine Optimierung der therapeutischen Möglichkeiten aufgrund der additiven bzw. synergistischen Effekte ergibt. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf mögliche Nebenwirkungen gesetzt werden.

Wie bereits erwähnt, wurde in China die erste onkolytische Gentherapie mit einem selbst replizierenden Adenovirus in Kombination mit Chemotherapie Ende des Jahres 2005 klinisch zugelassen (11).

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2008 (12) zeigt, dass durch konditioniert replikative Adenoviren, die einer mRNA-Translationskontrolle unterliegen, ein so genanntes cancer-specific-Targeting erreicht werden kann. Das heißt, dass die Onkolyse primär in

Tumorzellen stattfindet, ohne dass Normalgewebe zerstört wird. Die replikative Spezifität von so genannten CRAbs konnte bisher entweder durch eine Deletion im viralen Genom oder durch die Inkorporierung von tumorselektiven Promotoren erreicht werden. Im Gegensatz dazu wurde bisher die Kontrolle der mRNA-Translation noch nicht genutzt, um tumorspezifische Replikationen von Viren zu erzielen. In dieser Studie wurde ein neuer Ansatz gezeigt, der beides kombiniert, den transkriptionalen und den translationalen Ansatz. Hierzu wurde ein spezielles CRAb konstruiert, das den so genannten CXCR4-Gen-Promotor (TSP) und auch die spezifische mRNA-Translationskontrolle einer 5-UTR-Region einer FGF-2 (fiberblast-growth-factor-2) mRNA nutzt. Beide Ansätze zeigten in vitro- und in vivo-Studien, dass dieser CRAb Tumorgewebe gezielt zerstören konnte unter Aussparung von Normalgewebe. Hierbei konnte eIF4e (eukaryotic initiation factor) in der Translation deutlich den Einfluss dieser Tumorselektivität demonstrieren (13).

In der hier dargestellten Studie wurden verschiedene Zelllinien (ATCC / American Type Culture Collection) eingesetzt (MDA-MB-231, MDA-MB-361 und MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen). Darüber hinaus wurden als Vertreter von Normalgewebe so genannte Human mammary epithelial cells (HMEC) genutzt. Die E1A-Expression wurde verglichen in den bereits genannten Brustkrebszelllinien und mit den normalen epithelialen Brustzellen (HMEC) und Fibroblasten.

Eine Western blot-Analyse wurde zunächst durchgeführt, um die normale endogene Expression von eIF4E und CXCR4 in normalen und Krebszelllinien darzustellen. Hierbei zeigte sich, dass normale HMEC-Zellen und Fibroblasten niedrigere Level von eIF4E-Expression aufwiesen. Die Brustkrebszelllinien hingegen zeigten zwischen einem 37- und 41-fach höheren Level von eIF4E im Vergleich zu normalen Zellen und einen 23- bis 25-fach höheren Level im Vergleich zu normalen Fibroblasten.

Im Gegensatz dazu zeigte CXCR4 sehr hohe Expressionslevel in normalen HMEC und Fibroblasten, genauso wie in Brustkrebszelllinien. Diese Ergebnisse unterstellen, dass die alleinige Anwendung einer Transkriptionskontrolle unzureichend ist, um Krebszellen gezielt zu erreichen und dass der Zusatz einer mRNA-Translationskontrolle notwendig ist, eine Tumorspezifität hier zu erzielen. Eine real-time-RT-PCR wurde durchgeführt, um die Transkriptionslevel von E1A in Brustzellen zu quantifizieren. Allerdings gibt es keine bedeutenden Unterschiede in den Ergebnissen einer E1A-mRNA für alle Zelllinien, ob die Zellen nun infiziert wurden mit Ad-CXCR4-E1A oder mit Ad-CXCR4-UTR-E1A. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Transkription von E1A

in diesen Systemen unabhängig ist von der Menge des eIF4E-Proteins und unbeeinträchtigt durch die FGF-2-5-UTR-Sequenz.

In dieser Studie untersuchten wir die karzinomspezifische Kontrolle einer mRNA-Translationsinitiation, um möglicherweise eine verstärkte replikative Spezifität von CRAds in der Virotherapie zu erreichen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass solche CRAds, die eine heterologe mRNA-translationale Kontrolle beinhalteten, eine deutliche Anti-Tumorpotenz besitzen. Wichtig hierbei ist, dass neben der replikativen Spezifität Nicht-Tumorgewebe geschont werden konnte. Dieser Ansatz zeigt eine mögliche Kombination sowohl einer transkriptionalen als auch einer translationalen Regulation für replikative Spezifität. In Krebszellen ist die Translationskontrolle bereits ein sehr gut untersuchter Mechanismus. Insofern ist eIF4E nachweislich hilfreich in der translationalen Regulation. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung eines mRNA-Translations-Kontrollelementes in Kombination mit der Anwendung einer Gen-Transkriptionskontrolle die onkolytische CRAd-Aktivität nicht signifikant ändert, sowohl *in vitro* in Tumorzellen als auch *in vivo* in einem Mausmodell. Dieses CRAd zeigte eine selektive Zytotoxizität *in vitro*, welche maßgeblich von der eIF4E-Aktivität abhing (13).

Die Studie nutzte das 5-UTR-Element des FGF-2-mRNA als mRNA-Translations-Kontrollelement. In diesem Versuch war die Proteinexpression des modifizierten Ad5-E1A-Transkripts, was bedeutend ist für die CRAd-Replikationsfunktion, beschränkt auf Krebszellen, die hohe Level von eIF4E exprimierten. Bis dahin konnte der Einfluss von adenoviraler Replikation und Onkolyse mittels eines posttranskriptionalen Kontrollelementes wie E1A, das mRNA-Kontrollelement nutzend, noch nicht dargestellt werden.

Lediglich im Sinne eines single-Targetings konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle adenoviraler Replikation ebenfalls eine Toxizität in Nicht-Zielzellen hervorrufen kann (14). Die Kombination einer CRAd-Replikationskontrolle mittels Transkription und Translation sollte eine ausgedehntere Selektivität *in vivo* als ein alleiniges Kontrollelement erlauben. Diese Studie basiert im Wesentlichen auf dem Adenoviruserotyp 5. Genetische Capsid-Modifikationen haben kürzlich gezeigt, dass eine noch zellspezifischere Infektion möglich ist (15). Zukünftige Studien werden auf einen so genannten multiple-component-Targeting-CRAd abzielen, um noch effektiver tumorselektive Vektoren herstellen zu können.

Mit dem genetischen Einbau von RFP (red fluorescent proteins) besteht eine Möglichkeit, den Verlauf der Infektion mit einem bestimmten Adenovirus sichtbar zu machen und damit die Funktionalität eines transduktionalen Targetings nachzuweisen. Die Zelllinien MDA-MB-435s, MDA-MB-361, MDA-MB-231, ZR-75-1, Fibroblasten und HMEC wurden mit #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP in aufsteigender m.o.i. (0-1-100 ifu/Zelle) infiziert. 24 Stunden und 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Magnitude: 10x) untersucht. Dabei zeigte die RFP-Expression eine leicht geringere, jedoch nicht signifikante Infektivität derjenigen Zellen, die mit dem Adenovirus #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP infiziert wurden. Das wurde quantitativ in der Flow-Zytometrie bestätigt.

Für die Anwendung der Adenovirustherapie im Patienten ist es von immenser Bedeutung, den Eintritt der Adenoviren in die Tumorzelle und auch in gesunde Zellen quantitativ und qualitativ nachvollziehen zu können. Letztlich hängt von dem Ausmaß der Infektivität in beiden Geweben der Erfolg der Therapie ab, insofern als eine hohe Infektivität in Karzinomzellen gewünscht ist, während die Infektivität im Sinne von Toxizität in gesundem Gewebe sehr gering oder nicht vorhanden sein sollte. Hierzu wurde RFP in beide Adenoviren #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP inkorporiert. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Flow-Zytometrie konnte sicher gezeigt werden, dass beide Adenoviren in Abhängigkeit von der m.o.i. (Konzentration) zu 90 % in die Tumorzelle eintreten, in sehr viel geringerem Ausmaß jedoch auch Normalgewebe infizieren. Fluoreszenz-Mikroskopie ist daher ein probates Mittel zum RFP-Monitoring und macht die Infektivität kontrollierbar.

Mit Hilfe der Flow-Zytometrie erfolgte die objektivierbare Quantifizierung der mit #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP infizierten Zellen 48 Stunden nach initialer Infektion. Auch hier zeigte sich, dass eine weitaus geringere Infektion der mit #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP infizierten Zellen stattgefunden hat. Die Flow-Zytometrie ist daher ein für zukünftige Studien geeignetes Untersuchungsverfahren, welches Infektivität quantitativ fixieren kann. Von Interesse ist in Hinsicht auf den Nachweis stattgefundener Replikationen, die Flow-Zytometrie zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen, wie zum Beispiel nach 24, 48 und 72 Stunden in Abhängigkeit des Lebenszyklus der Adenoviren. Bedeutend ist ebenso der Nachweis der niedrigeren Expression und damit Infektion in Fibroblasten als Vertreter gesunden Gewebes im Vergleich zu Tumorzellen.

Bestätigt werden konnte ein erfolgreiches transduktionales Targeting in der Fluoreszenz-Mikroskopie und Flow-Zytometrie, #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP zeigen ein annähernd gleiches Potential zur Infektivität; dabei konnte eine mäßig höhere Infektivität für #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP im Vergleich zu #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen wurde eine signifikant höhere Replikationsrate bei #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP im Vergleich zu #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP als Konsequenz eines funktionierenden transkriptionalen und translationalen Targeting gesehen.

Zum objektivierbaren Nachweis einer stattgefundenen Onkolyse wurden die Zelllinien MDA-MB-435s, MDA-MB-231, MDA-MB-361, HMEC und Fibroblasten dem Crystal Violet-Verfahren unterzogen. Hier zeigen beide Adenoviren #I Ad5/3-CXCR4-E1A-pIX-RFP und #II Ad5/3-CXCR4-UTR-E1A-pIX-RFP in Karzinomzellen eine stärkere onkolytische Wirksamkeit als in Normalgewebe, hier Fibroblasten und HMEC.

Im Vergleich ist die Effektivität des Ad5/3-wt als nativer Promoter der transduktionalen Kontrolle der Replikation infolge der Umgehung der CAR-Abhängigkeit in normalen Zellen signifikant niedriger als in Tumorzellen. Ad5-wt als nativer, nicht modifizierter Adenovirus ohne transduktionale Kontrolle zeigt eine erwartungsgemäß höhere Replikationsrate. Ebenso wurde die Effektivität des UTR-Fragmentes dargestellt, welches offensichtlich nicht wie vermutet sicher in der Lage ist, die Hintergrundaktivität in Normalgewebe zu verringern.

4.1. Kritische Betrachtung

Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass die mRNA-Translation in diesem Zusammenhang eine bedeutende Komponente darstellen kann und dass das mRNA-Translationskontrollelement eine wichtige Rolle spielen wird im Vektordesign so genannter virotherapeutischer CRAbs in klinischen Studien.

Limitierend für adenovirale Vektoren ist die spezifische und effektive Transduktion von Tumorzellen (16). Erst mit Erreichen eines maximalen Sicherheitsprofils sind solche replikationskompetenten Viren bedeutend und anwendbar für klinische Studien. Problematisch bleibt die Tatsache, dass der primäre Adenovirus-Rezeptor CAR von

Tumorzellen nur geringfügig von Normalgewebe, insbesondere von der Leber, stark exprimiert wird (16, 154). Hier konnte mittels Targeting-Strategien, welche die Infektiosität gezielt erhöhten, signifikante Erfolge auch bereits in klinischen Studien verzeichnet werden. So scheinen Adenoviren vielversprechende Optionen in der Onkologie zu sein hinsichtlich der Therapie von Karzinomkrankungen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der additive Effekt bzw. bestehende Synergien bei fehlenden Nebenwirkungen.

Diese Doktorarbeit soll zeigen, dass eine Kombination der drei vorgestellten Strategien in der Adenovirotherapie, transduktionales, transkriptionales und translationales Targeting eine optimale Grundlage für die Entwicklung einer systemisch anwendbaren Therapie zur Behandlung des Mammakarzinoms darstellen könnte. Ziel ist, neben den etablierten Therapieverfahren eine Behandlungsmöglichkeit zu finden, welche die Überlebensrate bedeutend verbessert und eine hohe Ansprechbarkeit im Tumorgewebe besitzt.

4.2. Methoden der Karzinomgentherapie

Im Rahmen der Karzinomgentherapie können grundsätzlich sechs unterschiedliche Ansätze unterschieden werden:

1. Kompensation von Mutationen
2. molekulare Chemotherapie
3. genetische Immunpotenzierung
4. genetische Resistenz-/Sensitivitäts-Modulation
5. onkolytische/conditional replizierende Viren
6. antiangiogenetische Gentherapie

Hierbei ist das Ziel der Mutationskompensation der Ausgleich gravierender molekularer Veränderungen in der Karzinomzelle. Wie zum Beispiel Mutation durch Überexpression von Onkogenen wie erbB-2 (17, 18) oder Mutationen der Supressorgene p53 und BRCA1. Die Suizidgen- oder prodrug-conversion-Gentherapie als Vertreter der molekularen Chemotherapie ermöglicht die Eradikation über die selektive Expression von prodrug-aktivierenden Enzymen innerhalb der Ziel- bzw. Tumorzelle. Die Übertragung der Herpes simplex Thymidinkinase (HSV-TK) oder die Escherichia coli Cytosindeaminase (E. coli CD) wurde in klinischen Studien bereits über Vektoren

vermittelt, indem Ganciclovir (HSV-TK) oder 5-Fluorouracil (E.coli CD) in aktive Zelltoxine umgewandelt wurden. Als so genannter „bystander-effect“ wird die apoptotisch vermittelte Zytolyse bezeichnet, die auf einer zusätzlichen Diffusion der aktiven Zelltoxine in nicht-transduzierte Nachbarzellen oder auf einer zusätzlichen Signalübertragung beruht. So ist hierbei die Transduktion aller Zielzellen nicht erforderlich (19). Andererseits existieren Ansätze zur genetischen Immunpotenzierung, welche Immuno- oder Tumorzellen zur optimierten immunologischen Erkennung der neoplastischen Zellen modifizieren (20). Dass in diesem Zusammenhang autologe Nierenzelltumorstimmzellen das progredienzfremde 70-Monate-Überleben von 59 % auf 72 % steigern, konnte in einer randomisierten Phase-III-Studie an Patienten mit Nierenzellkarzinom gezeigt werden (21). Mit dem Anspruch eines erhöhten therapeutischen Indexes wurden zahlreiche Methoden zur Modifizierung von Sensitivität oder Resistenz gegenüber Chemotherapie oder Radiatio beleuchtet (22, 23).

Conditional replizierende Adenoviren, so genannte onkolytisch wirksame CRADs, beeinflussen die gezielte Replikation und damit Zelllyse über tumorspezifische Strukturen in der Zelle (16). Unter angiogenetischer Genterapie versteht man die Behinderung des Tumorwachstums durch eine Blockade der Angiogenese in Tumorgewebe (16).

4.3. Gentransfermethoden

Der Gentransfer erfolgt zum Beispiel über einen so genannten Retrovirus, der über eine Integration des Genoms in die Zielzelle zu einer Genexpression führt. Aber eben in dieser Genom-Integration besteht durch die mögliche Implizierung von Mutation oder Onkogenese der Hauptnachteil dieses Verfahrens. Darüber hinaus stellen eine geringe Transduktionsdifferenz, die erschwerte Produktion größerer Mengen und die Infektion nur sich teilender Zellen weitere signifikante Nachteile dar. Retroviren scheinen daher eher zur Therapie von Erkrankungen mit langfristiger Genexpression geeignet. Vielversprechend sind die Charakteristika von Lentiviren (z. Bsp. HIV), hier bedarf es jedoch noch ausgedehnter klinischer Studien zum Nachweis deren Sicherheit und Effektivität.

Während Rekombinanten episomal lokalisiert sind, integrieren adeno-assoziierte Viren (nicht-pathogene, einsträngige DNA-Viren) als Wildtyp in Chromosom 19 und führen so zu einer langfristigen Genexpression (24). In diesem Zusammenhang existieren bereits hoffnungsvolle präklinische Studienergebnisse (25). Aber auch Deletionen oder andere Veränderungen im Chromosom 19 scheinen adenoviral induziert aufgetreten zu sein

(26). Liposomale Vektorsysteme als Vertreter nicht-viraler Vektoren sind kationische Komplexe innerhalb der Lipiddoppelmembran. Diese können zur Bindung an selektive Zielrezeptoren modifiziert werden, indem Liposomen endozytotisch ihre DNA in die Zelle abgeben. Allerdings kommen Liposomen durch ihre geringe Transduktionseffizienz zurzeit noch nicht in der Karzinomtherapie zum Tragen, was in vivo und in klinischen Studien gezeigt wurde (27 - 33).

4.4. Adenoviren in der Gentherapie

Ein Ansatz basiswissenschaftlicher Untersuchungen der letzten Jahre stellt die Genmutation als Ursache von Krebs in den zentralen Blickpunkt. Insbesondere epigenetische Ansätze messen Alterationen von Tumorsuppression und -onkogen eine hohe Bedeutung für die Entstehung von Karzinomkrankungen zu, wobei diese Veränderungen sowohl hereditär als auch spontan auftreten können. Eine denkbare Schlussfolgerung besteht in der Annahme, molekulare Therapien zur Detektion von Defekten in Tumorzellen zu entwickeln. Unter onkolytischer Therapie versteht man die Infektion von Tumorzellen mit Viren, welche in der Lage sind, die Tumorzellen durch Virusreplikation und nachfolgende Onkolyse zu zerstören. Ein möglicher Ansatz besteht hier in der Verwendung modifizierter Adenoviren, welche zur selektiven Infektion von Tumorzellen und zur Schonung benachbarten Gewebes befähigt sind. Das Virus selbst ist zur Replikation und Verteilung in den Tumorzellen befähigt, ausgehend von der Infektion einer einzelnen Tumorzelle. Darüber hinaus wird als unverzichtbare Voraussetzung für die Anwendbarkeit im Patienten eine nebenwirkungsfreie Applikation erwartet. Entsprechend dem Tumor-on/liver-off-System werden Tumorzellen selektiv adenoviral infiziert bei reduzierter oder nahezu ausgeschlossener Lebertoxizität. Hierzu wurden verschiedene Vektorsysteme entwickelt, die sich durch unterschiedliche Spezifikationen zur Gentherapie von Karzinomen eignen, in dem eine effektive und ausgeprägte Transduktion der Zielzelle erreicht wird (16). Hierzu werden derzeit unter anderem hauptsächlich Adenoviren verwendet. Adenoviren bestehen aus einer Doppelstrang-DNA mit den Hauptkomponenten Hexon, Penton und Fiber. Durch die Fiber-Knob-Region am carboxyterminalen Ende des Fibers und der korrespondierenden Rezeptoren, des so genannten Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wird für die meisten Serotypen die adenovirale Infektion vermittelt (16, 154, 155). Durch Interaktion zwischen zellulären Integrinen und dem Arginin-Glyzin-Aspartam-Arm der Pentonbase kommt es zur Endosomausbildung und Internalisation des Virus. Durch Veränderungen innerhalb des Endosoms wird das Virus hier freigesetzt und mittels Zytoplasmatransport

zum Zellkern transportiert, wo durch die Adenoviren eine Proteinsynthese, beziehungsweise im Falle von nicht-replikationskompetenten Adenoviren, die Transgenexpression initiiert wird. Am Ende des adenoviralen Replikationszyklus steht die Lyse der Zelle und Freisetzung neu gebildeter Virionen. Die ausgeprägte Kapazität von Adenoviren im Gentransfer und in der Genexpression in vivo führt schließlich zur Kumulation dieser Viren in Nichtzielorganen. Die adenovirale Infektion von Gewebe ist CAR-abhängig. CAR wird ubiquitär von nahezu allen epithelialen Geweben exprimiert, allerdings konnte eine mindere Expression von CAR für Tumorgewebe nachgewiesen werden (34). Mit der Entwicklung so genannter CRAbs (conditional replicative adenovirus), soll einerseits die gezielte virusvermittelte Onkolyse infizierter Krebszellen, andererseits die Vermeidung nicht-tumorspezifischer Replikationen in gesunden Zellen erreicht werden. Wenn in der Vergangenheit die Effektivität dieser CRAbs im Hinblick auf deren Toxizität auf gesunde Organe noch begrenzt war, stehen heute mit der Möglichkeit eines so genannten Triple-Level-Targetings neue, vielversprechende Wege offen. Im Sinne eines transduktionalen Targetings bewirkt die Integration des Virotyp 3 knobs in Ad 5 Fiber (Ad5/3) eine Veränderung des Capsids, so dass der normalerweise bestehende Tropismus zwischen Adenovirus und CAR modifiziert wird (35). So gelingt es einerseits, die Effektivität über Faserknobchimäre zu verstärken, andererseits gleichsam die Lebertoxizität herabzusetzen und so die unselektive adenovirale Infektion zu kontrollieren. Mit dem transkriptionalen Targeting wird die Expression eines Gens auf bestimmte Zelltypen durch Einfügen von Promotorsequenzen in ein Gen begrenzt. Diese Sequenzen werden als tumorspezifische Promotoren (TSP) bezeichnet und sorgen für die Expression von Genen, insbesondere in solchen Geweben, die den TSP aktivieren können. Im Hinblick auf das Mammakarzinom hat man im CXCR4-Promoter (Zyklooxygenase 4) ein tumorspezifisches Protein für die selektive Virusreplikation gefunden (36).

Ein jüngerer Forschungsansatz zur Verbesserung der selektiven Infektivität von Adenoviren besteht in der Kontrolle der Genexpression über die mRNA-Translation mittels eIF4e (eukaryotic translation initiation factor 4E). Der eIF4e findet sich bei exprimierten Tumorzellen und bindet ein 5-UTR als Botschafter für die Übersetzung langer komplexer UTR, insbesondere FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Der Promotor ist in diesem Falle in die Bindung der DNA-Polymerase eingebunden und zur Initiierung der mRNA-Transkription vorgesehen.

4.5. Klinische Studien mit adenoviralen Vektoren

Zurzeit werden in klinischen Studien der Karzinom-Gen-Therapie am häufigsten Adenoviren als Vektorsysteme eingesetzt. In den letzten Jahren wurden zahlreiche klinische Studien genehmigt und eine hohe Anzahl von Patienten eingeschleust (30). So genannte Phase-I-Studien im Zusammenhang mit der genetischen Immunotherapie dienen hierbei der Datensammlung zur Anwendungssicherheit, Phase-II-Studien zur Überprüfung der Effektivität. Adenoviren sind, weil immunogen, effektiv und zielsicher, dabei die idealen Vektorsystem (31 - 34).

Über die genetische Immunotherapie hinaus können klinische Studien mit adenoviralen Vektoren in drei weitere Bereiche unterteilt werden:

1. Suizid-Gen-Therapie
2. Gen-Ersatz
3. Rezeptorbildung

Im Rahmen der Suizid-Gen-Therapie wird ein prodrug-konvertierendes Enzym in die Krebszelle inkorporiert. Bisher erfolgte die Durchführung innerhalb von Phase-I-Studien zur Therapie von Gliomen (35 - 37), von Ovarialkarzinomen (38 - 40), von Prostatakarzinomen (41, 42) und Mesotheliomen (43).

Darüber hinaus existieren Studien, welche die Suizid-Gen-Therapie und aktuell etablierte Therapiekonzepte kombinierten. In einer Studie mit Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt waren, unterzogen sich zehn Patientinnen initial einem Debulking, wurden dann intraperitoneal mit Ad-HSVtk und anschließend Ganciclovir therapiert und erhielten zuletzt eine Chemotherapie mit Topotecan. In einem Follow-up von 30 bis 31 Monaten (44, 158) überlebten drei der zehn Patientinnen. Eine weitere Vernetzung der Suizid-Gen-Therapie erfolgte mit dem Nachweis einer hohen Therapie-Sicherheit (kein Toxizitäts-Nachweis) in einer weiteren Phase-I/II-Studie mit Radiatio und Hormontherapie, um den therapeutischen Index der Radiatio (45) zu erweitern. Auch nach 21 Monaten wurden bei low-risk-Patientinnen keine Filiae nachgewiesen (46). Die günstigsten Ergebnisse wurden bei Kombination von Chemotherapie und intratumoraler Applikation von Adenoviren erzielt (47).

In einer weiteren klinischen Phase-I-Studie wurde das Tumor-Suppressorgen mda-7 geprüft. Wiederum zehn Patientinnen mit soliden Tumoren wurde dieses Suppressorgen intratumoral injiziert, die Tumoren wurden danach exzidiert, so dass die Transgen-Expression nachgewiesen werden konnte (48). Die Rezeptorbindung wurde an

Patientinnen mit Ovarialkarzinom und erbB-2 studiert (49, 50). Hierbei wurden bis zu $7,5 \times 10^{13}$ Viruspartikel pro Tag an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert (51). Dosis limitierende Nebenwirkungen traten nicht auf. Es ist daher von der Sicherheit einer Gen-Therapie mit nicht-replikationskompetenten Adenoviren trotz der hohen Variabilität im Gentransfer bei hoher Effektivität auszugehen.

4.6. Transkriptionales Targeting

Innerhalb der transkriptionalen Einheit dient der Promotor zur Initiierung der mRNA-Transkription durch die Einbindung in die RNA-Polymerase. Die Aktivierung erfolgt über Transkriptionsfaktoren unter Gewebe spezifischer Kontrolle, was zur Erkennung des Promotors die Expression von spezifischen Faktoren erfordert. Für den Einsatz in der Karzinom-Gen-Therapie wurden zahlreiche TSP's untersucht mit unzureichender Aktivität und/oder Spezifität. So wurde die Evaluierung von idealen Promotoren zunehmend zum Gegenstand der Forschung.

4.6.1. Tumorspezifische Promotoren

Das so genannte karzinoembryonale Antigen (CEA), das von Karzinomen des Magens, des Pankreas und der Lunge exprimiert wird, ist einer der ersten tumorspezifischen Promotoren, die näher untersucht wurden (52). Untersucht wurde der CEA-Effekt auf ein HSV-tk-Element. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass CEA-negative Zelllinien keine Reaktion auf Ganciclovir zeigten, CEA-positive Zellen jedoch mit tausendfach höherer Sensitivität (53).

In in vivo-Versuchen mit Mäusen stellte sich bei deren CEA exprimierenden Tumoren eine deutliche Tumorregression dar (53). Darüber hinaus ließ sich ein deutlicher Bystander-Effekt (34, 52) nachweisen. So erhöhte sich die Überlebenszeit der mit den Adenoviren infizierten Mäuse in Anwesenheit von lacZ oder CD unter Kontrolle eines CEA-Promotors (54). Die Toxizität für normales Lebergewebe war nach i.v.-Applikation von Ad-CEA gering (55). Als eine mögliche Therapieoption für hepatische Tumoren wurde der Promotor des alpha-Fetoproteins (AFP) untersucht. Auch hier zeigte sich in vivo eine deutliche Tumorregression (56).

Hinsichtlich der Therapie gynäkologischer Karzinome kommen verschiedene Promotoren in Frage. Zur Transkriptionskontrolle einer lacZ-Expression in Malignomen von Ovar und Mamma wurde der L-Plastin-Promotor (LP-P) in Zelllinien eingesetzt und mit dem ubiquitären CMV-Promotor verglichen (57). Beide Promotoren zeigten sich in den Tumorzelllinien als auch in den Zellen aus dem Aszites aktiv, allerdings Fibroblasten der Haut und normale Peritonealzellen reagierten nur geringfügig auf LP-P. Darüber hinaus untersuchte eine Studie die LP-P-spezifische Expression von lacZ und CD in Ovarial- und Blasenkarzinomzelllinien im Vergleich zu CMV (58).

Es zeigte sich in über 75 % aller humanen epithelialen Ovarialkarzinomen eine Expression des DF3-Proteins, normale Peritonealzellen zeigen hier hingegen keine Expression (59). Im Zusammenhang mit der Expression von BAX in vitro für Ovarialkarzinomzellen zeigte sich eine Aktivität des DF3-Promotors (60). In in vivo-Untersuchungen bei Mäusen mit Ovarialkarzinom konnte die BAX-Expression in dem Tumorgewebe nachgewiesen werden, die Tumoreradikation erfolgte zu nahezu 100 %.

Die Cyklooxygenase II (COX II) Promotor sowie der Midkine- (mk) Promotor für Malignome des Ovars zeigten Aktivität in zahlreichen Ovarialkarzinomzelllinien und darüber hinaus auch in primären Tumorzellen. Seine Aktivität in normalem Gewebe war hingegen vermindert (61). Eine Aktivität des COX II-Promotors korrelierte ebenfalls im Zusammenhang mit Magenkarzinomzelllinien, die Lebertoxizität zeigte sich hier nach intravaskulärer Injektion mit COX II als weniger stark ausgeprägt als mit dem CMV-Promotor. So wurde mittels COX II-Promotor eine Zelllyse in COX II-positiven Zellen erreicht, unter der Voraussetzung der HSVtk-Steuerung. COX II-negative Zellen wurden hingegen selektiert. Darüber hinaus zeigte sich in vivo eine deutlich reduzierte Leberexpression im Vergleich zum CMV-Promotor (35). Des Weiteren wird von Ovarialkarzinomzellen auch SLPI exprimiert (sekretorischer Leukoproteaseinhibitor).

Da die SLPI-Expression im Lebergewebe relativ gering ausgeprägt ist (62), wurde dieser Promotor in Karzinomzelllinien des Ovars sowie in primären, aus Aszites gewonnenen Tumorzellen zur Steuerung der Transgenexpression verwendet (63). Eine Aktivität dieses Promotors konnte in beiden Zelllinien in vitro nachgewiesen werden. Um die hohe Selektivität des SLPI-Promotors bezüglich Tumor- beziehungsweise Leberzellen darzustellen, wurde ein orthotopes Mausmodell mit disseminierten peritonealen Ovarialkarzinomzellen geschaffen. Hier zeigte sich, dass, kontrolliert durch den SLPI-Promotor, adenovirales HSVtk in Kombination mit einer Ganciclovir-Therapie (63) das Überleben deutlich erhöhte. Weitere hoffnungsvolle Resultate ergaben sich aus

Versuchen mit Promotoren wie Surfactant Protein B, Proopiomelanocortin und flt-1, Tyrosinase oder erbB2 (64 - 67).

4.6.2. Tumorgefäßspezifische Promotoren

Ebenfalls im Sinne einer Gentherapie denkbar ist das Targeting von Gefäßendothelien. Vorteile von Gefäßendothelien stellen sich durch günstige intravaskuläre Injektion in der Unabhängigkeit vom Tumortyp dar, zudem entwickeln Endothelzellen keine Therapieresistenzen, da sie nicht maligne sind (68). Ein Promotor, der zur adenoviralen Steuerung genutzt wird, ist das so genannte E-Selektin. Dessen Expression zeigt sich im vaskulären Anteil von Tumorgewebe erhöht, in Kapillaren von Nichttumorgewebe jedoch niedrig.

Dementsprechend kam es nach Infektion zu einer vermehrten Expression des Reportergens durch Endothelzellen im Gegensatz zu Nichtendothelzellen. Eine weitere Steigerung der E-Selektin-Effektivität konnte durch Hinzufügen von TNF-alpha als so genannten Promotor-Inducer erreicht werden (69).

Auch PPE-1 (Mouse-Preproendothelin 1) wurde als TSP zum adenoviralen Targeting in Endothelzellen verwendet. Wurde dieser Promotor systemisch appliziert, kam es bei Mäusen mit Lungentumoren zu einer selektiven Genexpression in der Gefäßneubildung des Primärtumors (70).

4.6.3. Therapie-induzierte Promotoren

Eine weitere Möglichkeit, die Genexpression zu steuern, ist die Induktion über eine Radiatio oder Chemotherapie. Hier kann beispielsweise der early growth response gene-1-Promotor (EGR-1) genannt werden, der nach Radiatio als TSP die spezifische Expression von lacZ und HSVtk in Gliomen und Leberkarzinomen beeinflusste. Hierbei wurde die Transkription des EGR-1-Promotors bereits mit einer niedrigen Strahlendosis erreicht (71, 72). Für einige Zervixkarzinommodelle konnte die Verbindung von Radiatio und adenoviraler Gentherapie erste erfolgreiche Resultate in präklinischen Studien liefern (73). Auf diese Weise kann die mögliche Toxizität einer Gentherapie reduziert und eine spezifische Steuerung der Genexpression in malignen Zellen erreicht werden. Allerdings wird die gezielte adenovirale Infektion hinsichtlich ihrer Effektivität nicht gesteigert. Sehr viel funktionalere Sektorsysteme werden durch die Verbindung eines transkriptionalen Targetings mit Möglichkeiten zur Erhöhung der Effektivität erreicht.

4.7. Transduktionales Targeting

Mit Hilfe des transduktionalen Targetings soll der Gentransfer in die Zielzellen selektiv erhöht werden, die Infektion von Nichtzielgewebe jedoch reduziert oder vermieden werden. Wir unterscheiden ein genetisches beziehungsweise ein physikalisches transduktionales Targeting. Diese sind in der Literatur auch als Einkomponenten- oder Zweikomponenten-Targeting bekannt. Das Einkomponenten-Targeting bezeichnet die genetische Modifizierung eines Adenovirus über einen inkorporierten Liganden, welcher spezifische Rezeptoren erkennt und/oder den natürlichen Rezeptor blockiert.

4.7.1. Genetisches transduktionales Targeting

Innerhalb des Adenovirus sind mehrere Positionen für das Inkorporieren von Liganden vorgesehen, so zum Beispiel der HI-Loop des Fibers, hier kann ein integrinbindendes RGD-4C-Molekül integriert werden (74, 75). Ein probater RGD-4c-modifizierter adenoviraler Vektor ist das so genannte RGDTKSSTR, dieser kann einerseits zur molekularen Chemotherapie HSVtk und andererseits auch das humane Somatostatin-Rezeptor-Subtyp-II-Gen (SSTR2-Gen) zum nicht-invasiven Imaging anbieten (76).

Der RGD-4C-Vektor ermöglicht die vorzugsweise Infektion von Ovarialkarzinomzellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Infektionsverstärkung auch innerhalb von malignem Aszites nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde eine klinische Untersuchung simuliert durch die intraperitoneale Applikation von RGDTKSSTR im Mausmodell mit disseminierten humanen Ovarialkarzinomzellen und malignem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Hierbei wurde eine deutlich erhöhte Überlebensrate im Vergleich mit einer RGD-4C-freien und weiteren Kontrollen (77) nachgewiesen. An Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (78) erfolgte eine klinische Testung, die allerdings bisher noch keine Veröffentlichung erbracht hat.

In einer weiteren Studie erfolgte die Testung mit Luziferase als Reporter gen mit und ohne RGD-4C-Modifizierung (32). Hierbei zeigten klinische Modelle an Ovarialkarzinomzellen (jeweils mit und ohne Neutralisation durch Antikörper und darüber hinaus in einem Ovarialkarzinommodell) einen vermehrten Gentransfer durch die RGD-4C-modifizierten Virusmodelle. Adenoviren sind bekannt für ihre hepatische Akkumulation und ihre Lebertoxizität. Ein Herabsetzen der hepatischen Toxizität ist jedoch ein bedeutendes Ziel in der Adenovirustherapie (79, 80). Um dies zu erreichen, konnten Viren produziert werden, die weder an CAR noch an zelluläre Integrine binden.

Diese modifizierten Adenoviren zeigten sich bezüglich der Transduktion in Lebergewebe (81) deutlich herabgesetzt.

Zu einer Abrogation der Lebertransduktion in vitro und in vivo führte die zusätzliche Ablation der Heparansulfat-Glukosaminoglykan-Bindungsstelle des Fiberschafts. Allerdings war die Transduktion des Zielgewebes bei diesen Viren weniger signifikant reduziert (82).

4.7.2. Fiberchimären

Einen anderen Tropismus haben solche Adenoviren, die nicht an CAR binden. In Fiber und Knob verändert sind so genannte Fiberchimären, insofern, als ein ursprüngliches Element durch einen anderen adenoviralen Subtyp (83 - 86) ersetzt wird. Einen bis heute nicht identifizierbaren Rezeptor trägt der Adenovirus Typ III. In der Literatur wird CD46 als Ad3-Rezeptor diskutiert (87), aktuell gibt es allerdings Veröffentlichungen, die CD46 als möglichen Rezeptor für alle Adenoviren der Subgruppe B mit Ausnahme des Adenovirus 3 (88, 89) zeigen. So haben Chimären des Adenovirus Typ 5 mit der Fiberdomäne des Adenovirus Typ 3 einen bis zu 291fach erhöhten Gentransfer in primären Tumorzelllinien (und Ovarialkarzinomzellen) (33). Der Adenovirus 5-Wildtyp konnte in klinischen Studien bereits als sicher eingestuft werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass sich Biodistribution und auch Toxizität im Mausversuch für Ad5/3-Chimären und RGD-modifizierte Viren nicht wesentlich von der eines Adenovirus 5-Wildtyps abgrenzen. Die Klonierung von Adenoviren mit Polylysinmotiven im Fiber C-Terminus ermöglichen eine CAR-unabhängige Bindung, zu Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG). Es handelt sich hierbei um eine Untergruppe des Adenovirusrezeptors, die insbesondere auf Tumorzellen exprimiert werden. Die so modifizierten Adenoviren zeigten eine signifikant erhöhte Infektiosität für Tumorzellen (90 – 92, 159, 160).

4.7.3. Physikalisches transduktionales Targeting

Hierbei erfolgt eine Bindung der Adenoviren an biospezifische Moleküle, die CAR und weitere zelltypische Rezeptoren detektieren. Dieser Ansatz liefert eine große Anzahl von Antikörpern und Liganden, wie zum Beispiel die Konjugation des Fibroblast growth factor Typ II (FGF II) mit dem Fragment eines Anti-Knob-Antikörpers. Hiermit konnte eine annähernd neunfach erhöhte Transgenexpression in Ovarialkarzinomzellen erreicht werden. Zu einer Überlebensverlängerung von 36 auf 44 Tage führte die

intraperitoneale Zugabe von HSVtk-Viren bei tumortragenden Mausmodellen (93), wobei eine deutlich reduzierte Hepatotoxizität eintrat (94). Weitere vergleichbare Untersuchungen mit Fab-Ligand-Konjugaten ergaben hoffnungsvolle präklinische Resultate. Bei einem weiteren transduktionalen Targetingansatz werden sCAR-Ligand-Konjugate verwendet, wobei eine Fusion zwischen der sekretorischen Ektodomäne des CAR-Rezeptors mit dem entsprechenden Liganden genutzt wird.

So wurde beispielsweise der so genannte Epidermal growth factor (EGF) mit sCAR konjugiert, um Adenoviren gegen Zellen einzusetzen, die eine Überexpression des EGF-Rezeptors zeigten (95, 31). Darüber hinaus nutzte man in Versuchen sCAR für die Bindung an single-chain-Antikörper für c-erbB-2 Onkoproteine, womit sich ein deutlicher Progress des Gentransfers nachweisen ließ (96). Trotz der hoffnungsvollen Resultate des Zweikomponententargetings hinsichtlich der Modifizierung von Adenoviren zu neuartigen Rezeptoren existieren Nachteile hinsichtlich der Pharmakodynamik und Genetik. Darüber hinaus wurde ihre Stabilität in vivo bei Menschen bisher nicht verifiziert. Einkomponenten-Systeme eignen sich daher eher für klinische Gentherapie-Studien. Im Hinblick auf die Luziferase-Expression konnte für nicht replizierende und für onkolytische Adenoviren eine dosisabhängige Steigerung dargestellt werden (97). Hierzu wurden mit onkolytischen Adenoviren infizierte Zellen subkutan injiziert, 1 % dieser Zellen in der initiierten Suspension führten zu einer Verhinderung des Tumorstadiums, 5 % hingegen führten bereits zur Eliminierung von Tumoren. Auch bei der Bindung von sCAR an single-chain-Antikörper für c-erbB-2 Onkoproteine konnte ein deutlicher Progress des Gentransfers objektiviert werden (96).

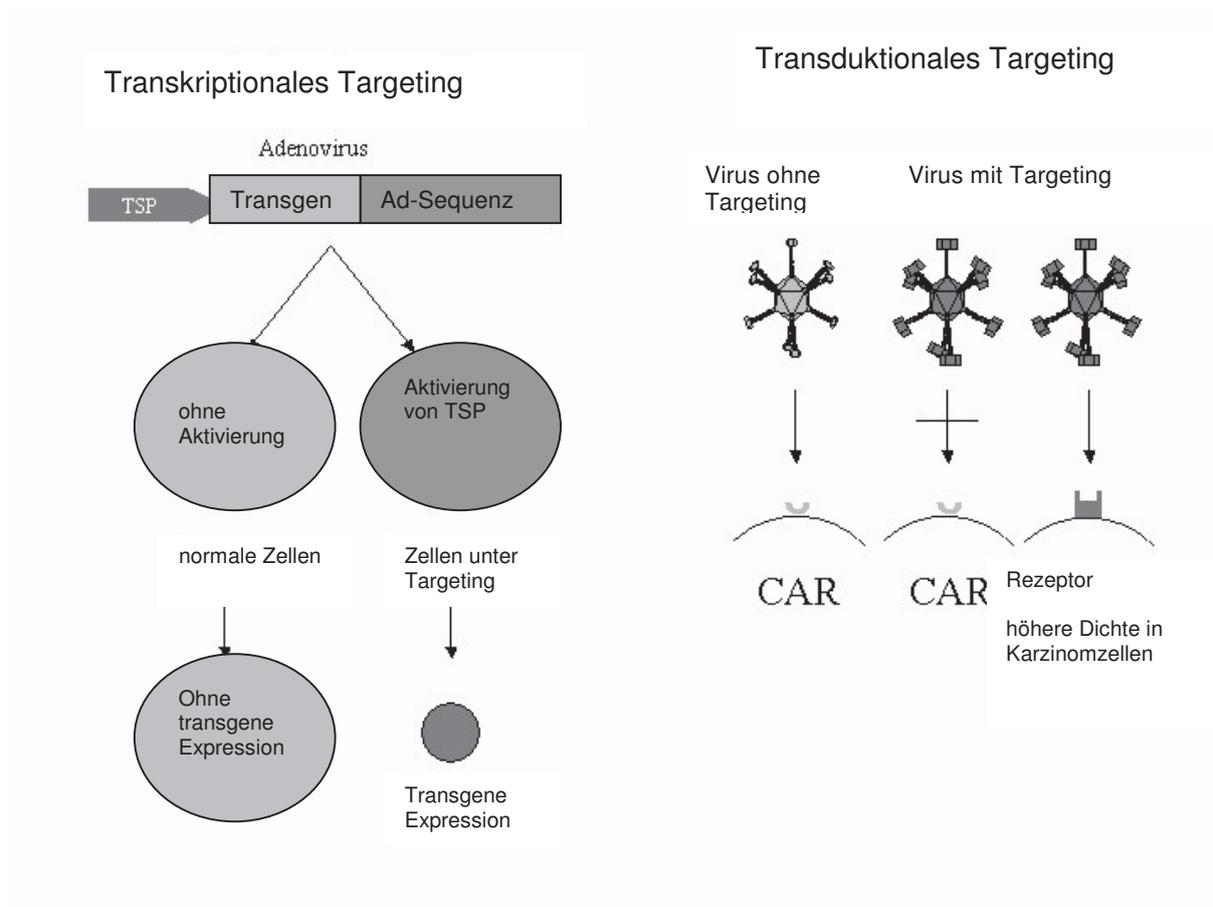


Abb. 22: Bauerschmitz, G., Experimentelle Untersuchungen adenoviral-onkolytischer Genterapie-Ansätze für gynäkologische Malignomerkrankungen

1. Transkriptionales Targeting: Einbau eines gewebespezifischen Promotors in das Transgen oder in ein zur Replikation essentielles Gen. Nur Zellen, die eine gewebespezifische Promoterexpression besitzen, können die Transkription des Transgens (nicht replizierende Viren) oder die Replikation (replikationskompetente Viren) initiieren.

2. Transduktionales Targeting: Der für den Tropismus ausschlaggebende Fiber und Knob eines Adenovirus wird durch ein Bindungselement ersetzt, womit der Tropismus des Virus zu einem tumorspezifischen Rezeptor modifiziert wird. (Abb. 22)

4.8. Konditional replizierende Adenoviren als onkolytische Agenzien

In ersten Studien haben nicht-replizierende Adenoviren *in vitro* und *in vivo* hohe Transduktionsraten und eine hohe Effektivität gezeigt. Allerdings wiesen klinische Studien einen unzureichenden antitumoralen Effekt nach (98). Auch wenn ein Tumortargeting und die Erhöhung der Infektivität in präklinischen Studien sehr gute Ergebnisse geliefert haben, blieb für den klinischen Nutzen die häufigere Gabe bei nicht replizierenden Viren essentiell. Eine lokale Amplifikation des gewünschten Effektes kann nur erzielt werden, wenn Viren in der Lage sind, sich innerhalb des Tumorgewebes selbst zu replizieren und auszubreiten. Hierzu wurden konditional replizierende Adenoviren, so genannte CRAds, entwickelt. Hierbei handelt es sich um genetisch modifizierte Adenoviren, die eine Replikation der Adenoviren in der Zielzelle steuern, basierend auf tumorspezifische Veränderungen (99 – 104, 156, 157). Schließlich kommt es infolge des viralen Replikationszyklus zur Zelllyse und damit Freisetzung neugebildeter Virionen zur Infektion des umgebenden Gewebes. Der antitumorale Effekt wird also durch die Virusreplikation erreicht. In der Theorie persistiert diese onkolytische Wirkweise, so lange Tumor- beziehungsweise Zielzellen vorhanden sind.

Zur Kontrolle der viralen Replikation sind zwei unterschiedliche Ansätze bekannt. Zum einen in Form von Replikations-Regulatoren, zum Beispiel das frühe virale Gen E1 durch einen TSP (Typ 1-CRAd). Zum anderen solche, die spezifische Deletionen im viralen Genom (Typ 2-CRAds) nutzen (42, 105). Die Kombination beider Faktoren bewirkt eine erhöhte Spezifität (106). Über Promotoren (DNA-Sequenz) wird die Transkription des nachfolgenden Gens gesteuert. Seine Funktion wird verstärkt durch so genannte Regulatorregionen wie Enhancern, Silencern und Insulatoren. Die Kontrolle des so genannten Transkriptionslevels bei CRAds erfolgt durch Replikationsgene, wobei die Replikation in Zellen mit Promotorelementen eingegrenzt wird. Zur Steuerung der viralen Replikation wurde bereits eine hohe Anzahl von Promotoren einer Testung unterzogen (36, 107 - 113).

Am häufigsten erfolgt die Kontrolle der Expression von E1a als Regulator der adenoviralen Replikation durch TSP. Als TSP für Prostatakarzinome sind das PSA und Kallikrein II bekannt sowie das AFP für Hepatome (78, 109, 111). Ein vergleichbarer Replikationseffekt wie bei Wildtyp-Adenoviren zeigt sich beim DF3/MUC1-Promotor für die Steuerung von E1A in Mammakarzinomzellen. Nach Injektion von TSP-kontrollierten CRAds zeigte sich *in vivo* eine deutlich reduzierte Tumorlast (112). So genannte Midkine (ml) wurde als TSP zur pädiatrischen Tumorthherapie verwendet. Solche CRAds verursachten *in vitro* sehr schnell einen Zelltod von Tumorzellen (114) und zeigten eine

spezifische Replikation in mk-positiven Zellen. Transgenelemente für Zytokine und Prodrug aktivierende Enzyme, die in das virale Genom integriert wurden (112, 115, 116), steigerten den Effekt der Onkolyse zusätzlich.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass zur Entwicklung so genannter CRAbs zahlreiche weitere Ansätze bekannt sind. Die Virusreplikation erfolgt hier durch Deletionen im viralem Genom, das in Nichttumorzellen zu einer Hemmung der Replikation führt, in Tumorzellen jedoch die Replikation vorantreibt und zur Zelllyse führt. ONYX-015 ist das erste CRAb in diesem Zusammenhang, das Mutationen zeigt für das E1B 55-kd Protein (117, 118). Ziel ist die Inaktivierung und Bindung von p53 in infizierten Zellen sowie die S-Phase-Induktion als Basis für die virale Replikation (41 - 44). Es erfolgt eine Replikation vorzugsweise in p53-mutierten Zellen (37).

Eine Replikationssteuerung der Viren ist, wenn auch mit unterschiedlich effektiver Selektivität (119, 120), über verschiedene Wege erreichbar (121). Erste Studien zeigen allerdings, dass ONYX-015 eine hohe Effektivität in Tumorzellen im Vergleich zu Nichttumorzellen besitzt (42, 121 - 125). Eine zweite wichtige Gruppe der Gruppe 2-CRAbs besitzt eine 24-Basen-Paar-Deletion in der konstanten Region 2 (CR2) des E1A-Gens (42, 47, 105). In diesem Bereich des E1A-Proteins sind Funktionen zur Bindung des Retinoblastoma-Tumorsuppressors/Zellzyklus-Regulatorproteins (RB) verankert, die essentiell sind für eine hohe Effektivität innerhalb der Virusreplikation (126). Da diese Art von Viren den G1-S-Phase-Check nur eingeschränkt durchlaufen, ist eine effektive Replikation nur in den Fällen möglich, die auf diesen Schritt verzichten können. Hier sind es hauptsächlich Tumorzellen, die den Rb-p16 pathway (96, 102) nicht passieren. Die aktuellen Studien zeigen, dass dieser Effekt sich in nahezu allen humanen Tumorzellen zeigt (126). Ferner ist die Replikation von CR2-deletierten Viren in nicht replizierendem Normalgewebe (99, 105) reduziert. In defekten Zellen, in denen es zu einer Rb-Reaktivierung kam, lag ebenfalls eine deutlich verringerte Replikationsrate vor (105). Eine Replikation bei Adenoviren mit CR1- und CR2-Mutationen von E1A (delta 2-delta 24-Viren) findet nur in Zellen statt mit Expression der Onkoproteine E6 und E7 des humanen Papillomvirus (100). Ebenso sind CRAbs bekannt mit einer weiteren Deletion in CR3 (Bindungsstelle für den p300-Zellzyklus-Regulator) (127). Hier erfolgte eine weitere Modifikation der Viren mittels TSP im Sinne eines E4-Promotor-Ersatzes (128).

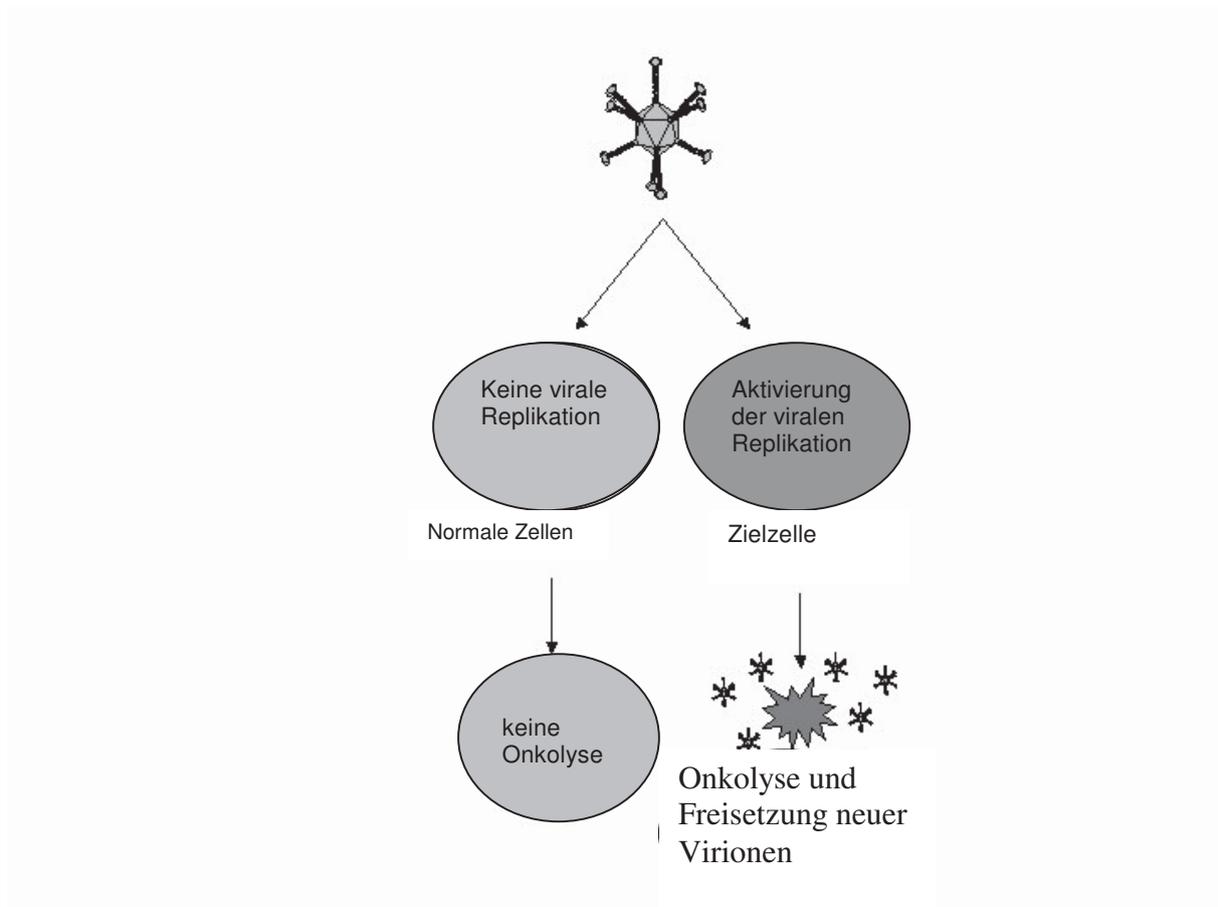


Abb. 23: Bauerschmitz, G., Experimentelle Untersuchungen adenoviral-onkolytischer Gentherapie-Ansätze für gynäkologische Malignomerkrankungen

So genannte CRAds benötigen zur Replikation spezifische Faktoren der Zielzelle. Die Replikation führt hier zur Onkolyse und Verteilung neuer Virionen, welche die Infektivität umliegender Zellen steigern. (Abb. 23)

4.9. Gerichtete konditionalreplizierende Adenoviren

In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass so genannte nicht gerichtete CRAds eine Infektivität in nicht CAR-abhängigen Zielzellen erreichen. Allerdings ist die CAR-Abhängigkeit in den Tumoren in klinischen Studien als sehr unterschiedlich nachgewiesen worden. Dennoch konnten diese so genannten CRAds der ersten Generation einen zielführenden Ansatz bieten (79, 153, 161), so dass zu erwarten ist, dass mit einer erhöhten Effektivität der Infektion und einer spezifischen Replikation durch diese Viren richtungsweisend Erfolge zu verzeichnen sind und ein klinischer Nutzen erzielt werden kann. Gestützt wird diese Annahme durch die bestehende hohe

Korrelation zwischen Infektivität und onkolytischer Potenz (97, 129, 130). Daher wurden in weiteren wissenschaftlichen Studien so genannte CRAbs mit einer deutlich erhöhten Infektionskapazität entwickelt, die bereits bedeutende präklinische Resultate erbracht haben. Ad5-delta24RGD ist ein durch CR2-Mutation entwickeltes CRAb mit einem RGD-4C-Element im Fiber-Anteil (47, 131, 152, 163).

Im Vergleich zum Wildtyp-Adenovirus in Ovariakarziomzellen zeigt dieses CRAb eine vergleichbare onkolytische Fähigkeit. Darüber hinaus ist es zu einer effizienten Replikation in Sphroiden primärer Ovariakarzinomzellen gekommen, was sich in einer deutlich erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit in einem aggressiven orthotopen Ovariakarzinommodell zeigt (132, 153). Aufgrund dieser Resultate wurde eine Phase 1-Studie durchgeführt, die die Therapie von Gliom- oder bei Ovariakarzinom-Patienten mit dem Ad5-delta24RGD beobachtet hat (133).

Darüber hinaus wurden zur Infektivitätssteigerung so genannte CRAbs in Tumorzellen Fiberchimären kloniert. Diese Fiberchimären besitzen Elemente aus Tale und Schaft vom Adenovirustyp 5 und Knob des Adenovirus Typ 3 (32, 33, 83, 134). Dieser Ad5/3-delta24 bot schließlich eine signifikant erhöhte Onkolyse mit einer gezielten Replikationsfähigkeit im Tumorgewebe. Neben dieser Ad5/3-Chimären folgten auch Untersuchungen aus Ad5 und Ad11 (135, 136) und Ad5 und Ad35 (137 - 139).

Mit dem Ziel, die Spezifität der Infektion weiter zu steigern und die Onkolysefähigkeit der Viren zu bewahren, wurden inzwischen doppelt oder dreifach modifizierte CRAbs entwickelt. In diesem Zusammenhang wurde zum Beispiel der tumorspezifische Promotor *cox2L* mit einer CR2-Mutation einer E1A-Transkomplementation und der Ad5/3-Fiberchimäre zu einem CRAb Ad5/3 *cox2L*delta24 kombiniert. Auch hier erfolgte eine selektive Replikation in Tumorzellen bei hoher onkolytischer Potenz (36).

4.10. Klinische Studien mit CRAbs

Schon in den 50er Jahren gab es erste klinische Studien mit so genannten CRAbs. Hier wurden die verschiedenen Serotypen von Wildtyp-Adenoviren bei Patientinnen mit Cervixkarzinom intratumoral, intraarteriell oder rein intravenös injiziert. Untersucht wurde der klinische Effekt ebenso wie der Grad der Immunsuppression. Die so genannte Overall Responstrate, die anhand der Zahl von festgelegten Nekrosearealen festgelegt wurde, betrug 65 % (140). Deutliche Nebenwirkungen traten nicht auf. Allerdings kam es häufig zu Tumorrezidiven.

Um das Jahr 2000 wurde die erste klinische Studie mit einem CRAb initiiert, in der virale Vektoren untersucht wurden, welche präferentiell in Zielzellen replizierten. Das hierbei

eingesetzte CRAd war das so genannte ONYX-015-Virus, dessen Replikation in Biopsien von Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte. Auch hier kam es zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen (141, 142).

Um den synergistischen Effekt von Bestrahlung oder Chemotherapie mit Onkolyse zu nutzen, kam es auch hier zu einer Kombination von Therapien mit geringfügigen Nebenwirkungen und nur eingeschränkter Toxizität (42, 44). Einige klinische Studien boten hier hoffnungsvolle Resultate mit hoher Sicherheit (45, 46, 142), insbesondere eine Phase-II-Studie, die intratumoral ONYX-015 injizierte und Cisplatin/5 Fluorouracil Toxizität (42, 44) kombinierte.

Allerdings mussten auch hier in der Nachbeobachtungszeit häufiger bei nicht injizierten Tumoren eine erhöhte Rezidivrate verzeichnet werden.

Eine Phase-III-Studie mit ONYX-015 wurde in den USA gestartet, in China mit dem identischen Virus H101 (143). Eine deutliche Erhöhung der Response-Rate von 39,6 % auf 78,8 % konnte durch Kombination des Virus mit Chemotherapie erreicht werden. Eine erhöhte Toxizität wurde nicht gemessen. Eine Therapie von H101 in Kombination mit 5-FU erhielt im November 2005 in China ihre klinische Zulassung (11).

In einer weiteren klinischen Studie wurde ein CRAd CV-706 eingesetzt, die ebenfalls gute Ansätze erbrachte. Hier steht die Replikation unter der Kontrolle des tumorspezifischen PSA-Promotors.

4.11. Modellsysteme - Primäre Tumorzellen und Spheroide

Die begrenzte Anzahl von anwendbaren Testsubstraten schränkt die präklinische Entwicklung von neuen Therapien mit zu replikationsbefähigten Adenoviren ein. Eine Folge der Anpassungsfähigkeit an bestimmte Wachstumsbedingungen zeigt sich in einem veränderten Geno- und Phänotyp von Zelllinien in vitro. Hiervon muss man angesichts unterschiedlicher Daten innerhalb von Zelllinien und Zellen klinischer Proben ausgehen. Modelle innerhalb der Translationsforschung, die klinisch gesehen realistischer wären, würden hier deutliche Fortschritte erbringen. Daher ist man dazu übergegangen, reine Krebszellen zu isolieren, insbesondere primäre Ovarialkarzinomzellen aus malignem Aszites bei Adenocarcinom des Ovars.

Heute steht eine Tumorzellpopulation mit 96 %-iger Reinheit zur Verfügung (144). Allerdings besitzen diese primären Tumorzellen ex vivo in Kultur nur eine sehr begrenzte Lebensfähigkeit von circa sieben Tagen (144), was für die Forschung für Studien mit CRAds zu kurz ist. Darüber hinaus sind aufgrund der Dreidimensionalität von soliden Tumoren Zellkulturen als Monolayer ungeeignet, um die Virusdissemination

in Tumoren zu verfolgen. Man hat aus diesem Grunde ein dreidimensionales Modellsystem auf Spheroïden ausgehend von primären Ovarialkarzinomzellen hergestellt (83, 146, 147, 153). Diese Spheroïde erhalten ihre Vitalität über vier Wochen, so dass ein Replikationsnachweis ex vivo in primären Tumorgeweben möglich ist.

4.12. Zukunftsperspektiven

Die Gentherapie ist auf der Grundlage der molekularen Veränderungen in Karzinomfällen eine sinnvolle Therapieoption. In präklinischen Studien konnten bereits erfolgversprechende Ansätze gefunden werden, zumal eine hohe Anwendesicherheit in der Verwendung der Adenoviren besteht. Schwerwiegende Nebenwirkungen oder Toxizität konnten in klinische Studien bisher nie nachgewiesen werden (133, 148).

Vielmehr konnte die deutliche antitumorale Wirksamkeit der adenoviralen Gentherapie nachgewiesen werden (45, 142, 149 - 152). Dieses Ergebnis ist umso bedeutender als bekannterweise die Immungenität von Adenoviren gegen infizierte Tumorzellen genutzt werden kann, andererseits aber eine zu hohe Virusdosis letal wirken kann.

Erfolge in klinischen Studien basieren also eindeutig auf dem Fortschritt in der Entwicklung der Vektoren. Eine weitergehende Verbesserung der Krebs-Gentherapie-Reagenzien wird ohne Zweifel zu weiteren klinischen Erfolgen führen können. Ein limitierender Faktor bleibt hierbei die nach Möglichkeit vollständige Transduktion des Tumorgewebes; diese kann primär über eine Verbesserung im Vektorbereich erzielt werden. Insbesondere werden hier neue Ansätze hinsichtlich der Replikationskompetenten Systeme sowie der Erhöhung und Steuerung der Vektor-Infektiosität zu erwarten sein. Die Adenoviren besitzen die Fähigkeit einer Amplifikation in Tumorgewebe. Durch eine exakte Steuerung der Replikationskompetenz (transkriptionales Targeting) und gezielte Infektivität von Tumorzellen (transduktionales Targeting) können in vitro und in vivo deutliche Fortschritte erreicht werden (32, 36, 153).

Offen bleibt die Therapie möglicher Nebenwirkungen bzw. die Beeinflussung bereits applizierter Vektorsysteme. Aktuell existiert eine rein symptomatische Therapie möglicher Nebenwirkungen mit Chlorpromazin und Apigenin (162). Diese reduzieren die virale Replikation in vitro und in vivo.

5. Zusammenfassung

Basierend auf fortschreitenden molekularwissenschaftlichen Ergebnissen kristallisiert sich die Gentherapie als eine in ihrer Konsequenz mögliche Therapieoption zur Behandlung von Karzinomerkrankungen heraus. Erste präklinische und klinische Forschungen sind bereits im Ansatz etabliert. Das Risiko der Toxizität in der Anwendung von Adenoviren ließ sich in klinischen Studien nicht reproduzieren. Vielmehr konnte hier die antitumorale Wirksamkeit der Adenovirustherapie gezeigt werden. Diejenigen Erfolge, die mittels Adenovirustherapie bisher zu verzeichnen waren, sind in erster Linie begründet in der Erforschung und Entwicklung von Vektoren. Der vorrangig limitierende Faktor, nämlich die vollständige Transduktion des Tumorgewebes unter Schonung von Nichtzielgewebe, wird zunehmend mit der Verbesserung der zur Verfügung stehenden Vektoren realisiert. Dieses wird insbesondere durch die Entwicklung replikationskompetenter Systeme sowie durch eine Verbesserung der Steuerung der Vektorinfektiosität erreicht.

Trotz aller Erfolge in der Behandlung von Karzinomerkrankungen besteht auch zukünftig der Bedarf für neuartige und innovative Therapieoptionen. Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieverfahren sind insofern begrenzt, da sie Patientinnen zum Beispiel mit fortgeschrittenem Mammakarzinom häufig nur in rein palliativer Hinsicht einen Benefit versprechen können. Auch hinsichtlich früher Karzinomstadien konnten die etablierten Säulen der Therapie wie Chemotherapie, gezielte Bestrahlung und optimierte Operationstechnik signifikante Erfolge verzeichnen, wobei allerdings das klinische Outcome für Patienten mit fortgeschrittenen Stadien deutlich weniger positiv ist, beziehungsweise beeinflusst wird. In Zukunft wird mittels weiterer klinischer Studien die Adenovirustherapie in ihrer Effektivität und Sicherheit bestätigt werden. Auch Kombinationstherapien im Zusammenhang mit den bekannten etablierten Verfahren sind denkbar, da von der Adenovirustherapie keine gravierenden Nebenwirkungseffekte zu erwarten sind.

Das Ziel dieser Arbeit ist das molekulargenetische Konzept zur Entwicklung effektiver Behandlungsstrategien mittels modifizierter Adenoviren darzustellen. In diesem Zusammenhang wurde die Anwendbarkeit einer Virotherapie in Zukunft als zusätzliches Therapieverfahren im Sinne eines hoffnungsvollen neuartigen Ansatzes neben den bekannten herkömmlichen Behandlungsmethoden des Mammakarzinoms geprüft.

Zum jetzigen Zeitpunkt stellen adenovirale Strategien eine aussichtsreiche Therapieform parallel zu den etablierten Behandlungsmethoden des Mammakarzinoms dar. Es ist zu hoffen, dass zukünftige Untersuchungen die Onkolysefähigkeit der vorhandenen CRAbs erhärten können.

6. Quellenverzeichnis

1. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U, „Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.“, Beiträge zur Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, 7.Auflage, 56-59, 2005/2006
2. Kraywinkel K, Batzler WU, Bertram H, Hense HW, „Epidemiologisches Krebsregister“ Schwerpunktbericht Brustkrebs“, 13-20, 1992-2004
3. Malek D, Rabe P, „Ergebnisse des Mammographie-Screening-Programms in Deutschland, Evaluationsbericht“, BMG, BMU, Kooperationsgemeinschaft Mammographie, 24-26 und 35-50, 2008-2009
4. Boyle P, Ferlay J, “Cancer incidence and mortality in Europe 2004”, IARC, International Agency for Research of Cancer, Lyon, France, Annals of Oncology, 481-488, 16/2005
5. Becker N, Wahrendorf J, „DKFZ, Deutsches Krebsforschungszentrum“, Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland“, Springer Berlin Heidelberg New York, 1998
6. Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A et al., „Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus“, Cancer Res., 1266-70, 62/2002b
7. Douglas JT, Curie DI, “Adenoviral vectors for gene therapy”, Mol Biotechnol 36(1), 71-80, 2007
8. Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Kaliberova L, Liu B, Rivera AA, Nettelbeck DM, Mahasreshti PJ, Leath CA, Yamaoto M, Alvarez AD, Curiel D, “Transcriptional targeting of adenoviral vector through the CXCR4 tumor-specific promoter”, Gene Therapy, 645-648, 11/2004
9. Stoff-Khalili MA, Rivera A, Nedeljkovic-Kurepa A, DeBenedetti A, Li XL, Odaka Y, Podduturi J, Sibley DA, Siegal GP, Stoff A, Young S, Zhu ZB, Curiel DT, Mathis JM, "Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control", Breast Cancer Res Treat 108(1), 43-55, 2008 Mar.
10. Vellinga J, Rabelink Matijn JW, Cramer SJ, van den Wollenberg Diana JM, Van der Meulen H, Leppard KN, Fallaux FJ, Hoeben RC, “Spacers increase the Accessibility Peptide Ligands linked to the Carboxyl Terminus of Adenovirus Minor Capsid Protein IX”, J Virol, 78(7), 3470-3479, 04/2004
11. Yu W, Fang H, “Clinical trials with oncolytic adenovirus in China”, Curr Cancer Drug Targets, 141-148, 7/2007
12. Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Nedeljkovic-Kurepa A, DeBenedetti A, Li XL, Odaka Y, Podduturi J, Sibley DA, Siegal GP, Stoff A, Young S, Zhu ZB, Curiel DT, Mathis JM; “Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control”, Breast Cancer Res Treat., 108/1, 43-55, 03/2008
13. Mishra R, Miyamoto M, Yoshioka T, Ishikawa K, Matsumura Y, Shoji Y, Ichinokawa K, Itoh T, Shichinohe T, Hirano S, Kondo S, “Adenovirus-mediated eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1 in combination with rapamycin inhibits tumor growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in vivo”, Int J Oncol., 34(5), 1231-40, 05/2009

14. Kruyt FA, Curiel DT, "Toward a new generation of conditionally replicating adenoviruses: pairing tumor selectivity with maximal oncolysis (review)", *Hum Gene Ther.*, 1;13(4), 485-95, 03/2002
15. Coughlan L, Alba R, Parker AL, Bradshaw AC, McNeish IA, Nicklin SA, Baker AH, "Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors", *Viruses*, 2(10), 290-355, 2010 Oct.
16. Bauerschmitz GJ, Barker SD, Hemminki A., "Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review)", *Int J Oncol.* 21(6), 1161-74, 12/2002
17. Nieto Y, Cagnoni PJ, Nawaz S, Shpall EJ, Yerushalmi R, Cook B, Russell P, Mc Dermitt J, Murphy J, Bearman SI, Jones RB, "Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation", *J Clin Oncol*, 2070-2080, 18/2000
18. Casado E, Nettelbeck DM, Gomez-Navarro J, Hemminki A, Gonzalez Baron M., Siegal GP, Barnes MN, Alvarez RD, Curiel DT, "Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy", *Gynecol Oncol*, 229-237, 82/2001
19. Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM, "Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro", *Gene Ther* 3:85-92, 1996
20. Nishida Y, Maeda Y, Hara A, Arima T, Kimura E, Yamashita S, Uyama E, Mita S, Uchino M, "Adenovirus-mediated murine interferon-gamma 82 receptor transfer enhances the efficacy of IFN-gamma in vivo", *Biochem Biophys Res Commun*, 290:1042-1047, 2002
21. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C, "Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial", *Lancet*, 363:594-599, 2004
22. Duverger V, Sartorius U, Klein-Bauernschmitt P, Krammer PH, Schlehofer JR, "Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2", *Int J Cancer*, 97: 706-712, 2002
23. Schiedlmeier B, Schilz AJ, Kuhlcke K, Laufs S, Baum C, Zeller WJ, Eckert HG, Fruehauf S, "Multidrug resistance 1 gene transfer can confer chemoprotection to human peripheral blood progenitor cells engrafted in immunodeficient mice", *Hum Gene Ther*, 13:233-242, 2002
24. Ponnazhagan S, Curiel DT, Shaw DR, Alvarez RD, Siegal GP, "Adeno-associated virus for cancer gene therapy", *Cancer Res*, 61:6313-6321, 2001
25. Vermeij J, Zeinoun Z, Neyns B, Teugels E, Bourgain C, De Greve J, "Transduction of ovarian cancer cells: a recombinant adeno-associated viral vector compared to an adenoviral vector", *Br J Cancer*, 85:1592-1599, 2001
26. Miller DG, Rutledge EA, Russell DW, "Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration", *Nat Genet*, 30:147-148, 2002
27. Rochlitz CF, "Gene therapy of cancer", *Swiss Med Wkly*, 131: 4-9,83, 2001

28. Lee SG, Yoon SJ, Kim CD, Kim K, Lim DS, Yeom YI, Sung MW, Heo DS, Kim NK, "Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes in vivo", *Cancer Gene Ther*, 7:1329-1335, 2000
29. Yoo GH, Hung MC, Lopez-Berestein G, LaFollette S, Ensley JF, Carey M, Batson E, Reynolds TC, Murray JL, "Phase I trial of intratumoral liposome E1A gene therapy in patients with recurrent breast and head and neck cancer", *Clin Cancer Res*, 7:1237-1245, 2001
30. Wang SC, Zhang L, Hortobagyi GN, Hung MC, "Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients", *Semin Oncol*, 28:21-29, 2001
31. Hortobagyi GN, Ueno NT, Xia W, Zhang S, Wolf JK, Putnam JB, Weiden PL, Willey JS, Carey M, Branham DL, Payne JY, Tucker SD, Bartholomeusz C, Kilbourn RG, De Jager RL, Sneige N, Katz RL, Anklesaria P, Ibrahim NK, Murray JL, Theriault RL, Valero V, Gershenson DM, Bevers MW., Huang L, Lopez-Berestein G, Hung MC, "Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial", *J Clin Oncol*, 19:3422-3433, 2001
32. Chon HS, Hu W, Kavanagh JJ, "Targeted therapies in gynaecologic cancers", *Curr Cancer Drug Targets*, 6:333-363, 2006
33. Cross D, Burmester JK, "Gene therapy for cancer treatment: past, present and future", *Clin Med Res*, 4:218-227, 2006
34. Nakayama M, Both GW, Banizs B, Tsuruta Y, Yamamoto S, Kawakami Y, Douglas JT, Tani K, Curiel DT, Glasgow JN, "An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice", *Virology*, 350(1):103-15, 2006 Jun 20
35. Bauerschmitz GJ, Guse K, Kanerva A, Menzel A, Herrmann I, Desmond RA, Yamamoto M, Nettelbeck DM, Hakkarainen T, Dall P, Curiel DT, Hemminki A, "Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the cox2 promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells", *Mol Ther*, 14:164-174, 2006
36. Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Stoff A, Michael Mathis J, Rocconi RP, Matthews QL, Numnum MT, Herrmann I, Dall P, Eckhoff DE, Douglas JT, Siegal GP, Zhu ZB, Curiel DT, "Combining high selectivity of replication via CXCR4 promoter with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis in breast cancer", *Int J Cancer*, 120(4):935-41, 2007 Feb 15
37. Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Nedeljkovic-Kurepa A, DeBenedetti A, Li XL, Odaka Y, Podduturi J, Sibley DA, Siegal GP, Stoff A, Young S, Zhu ZB, Curiel DT, Mathis JM, "Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control", *Breast Cancer Res Treat*. 108(1):43-55, 2008 Mar
38. Database, C. T. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/action/GetStudy>. 2006
39. Dmitriev I, Kashentseva E, Rogers BE, Krasnykh V, Curiel DT, "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, 2000

40. Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ, Lam JT, Desmond RA, Bhoola SM, Barnes MN, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A, "Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses", *Mol Ther*, 5:695-704, 2000
41. Kanerva A, Mikheeva GV, Krasnykh V, Coolidge CJ, Lam JT, Mahasreshti PJ, Barker SD, Straughn M, Barnes MN, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT, "Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells", *Clin Cancer Res*, 8:275-280, 2002
42. Tanaka T, Kanai F, Lan KH, Ohashi M, Shiratori Y, Yoshida Y, Hamada H, Omata M, "Adenovirus-mediated gene therapy of gastric carcinoma using cancer-specific gene expression in vivo", *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 231:775-779, 1997
43. Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT, "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, 2001
44. Lehnert M, "Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem", *Eur J Cancer*, 32A:912-920, 1996
45. Holzmayer TA, Hilsenbeck S, von Hoff DD, Robinson I, "Clinical Correlates of MDR1 (P-Glycoprotein) Gene Expression in Ovarian and Small-cell Lung Carcinomas", *J Natl Cancer Inst*, 84(19):1486-1491, 1992
46. Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB, "P-Glycoprotein Expression is a Marker for Chemotherapy Resistance and Prognosis in Advanced Ovarian Cancer", *Anticancer Res*, 20:1061-1067, 2000
47. Walther W, Wendt J, Stein U, "Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy", *Gene Therapy*, 4:544-552, 1997
48. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F, "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells", *Science*, 274:373-376, 1996
49. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH, "ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents [see comments]", *Nat Med*, 3:639-645, 1996
50. Heise CC, Williams AM, Xue S, Propst M, Kirn DH, "Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy", *Cancer Research*, 59: 2623-2628, 1999
51. Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, Gilbert JD, Paielli DL, Kim JH, Heise CC, Kirn DH, "In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy", *Cancer Research*, 60:1193-1196, 2000
52. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH, "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", *Nature Med*, 6:879-885, 2000

53. Lamont JP, Nemunaitis J, Kuhn JA, Landers SA, McCarty TM, "A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience)", *Annals of Surgical Oncology*, 7: 588-592, 2000
54. Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds P, Curiel DT, Alemany RA, "Conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency", *Clin Cancer Res*, 7: 120-126, 2001
55. Cunningham C, NJ, Richards D, Tong A, Zhang Y, Su D, Chada S, Mhashilkar A, Zhou-Yang H, Parker K, Wilson D, Merritt J, Coffee K, "A phase I dose-escalation pharmacokinetic and pharmacodynamic study of INGN 241 (Ad-mda7) in patients with advanced solid tumors", *Proc of ASCO*, 21: 23a, 2002
56. Alvarez RD, Curiel DT, "A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated delivery of an anti-erbB-2 single-chain (sFv) antibody gene for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients", *Human Gene Therapy*, 8: 229-242, 1997
57. Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, Curiel DT, "A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 singlechain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial", *Clin Cancer Res*, 6: 3081-3087, 2000
58. Buller RE, Shahin MS, Karlan B, Horowitz J, Mahavni V, Patrauskas S, et al., "Multi-dose intraperitoneal Rad/p53 (SCH58500) gene replacement combined with chemotherapy in heavily pretreated recurrent ovarian cancer is associated with prolonged survival", *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: 262a, 2001
59. Tanaka T, Kanai F, Okabe S, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Shiratori Y, Lan K, Ishitobi M, Omata M, "Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells in vitro", *Cancer Res*, 56: 1341-1345, 1996
60. Osaki T, Tanio Y, Tachibana I, Hosoe S, Kumagai T, Kawase I, Oikawa S, Kishimoto T, "Gene therapy for carcinoembryonic antigenproducing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene", *Cancer Res*, 54: 5258-5261, 1994
61. Lan KH, Kanai F, Shiratori Y, Ohashi M, Tanaka T, Okudaira T, Yoshida Y, Hamada H, Omata M, "In vivo selective gene expression and therapy mediated by adenoviral vectors for human carcinoembryonic antigen-producing gastric carcinoma", *Cancer Res*, 57: 4279-4284, 1997
62. Brand K, Loser P, Arnold W, Bartels T, Strauss M, "Tumor cellspecific transgene expression prevents liver toxicity of the adeno-HSVtk/GCV approach", *Gene Therapy*, 5: 1363-1371, 1998. 91
63. Kanai F, Lan KH, Shiratori Y, Tanaka T, Ohashi M, Okudaira T, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Nakabayashi H, Tamaoki T, Omata M, "In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene", *Cancer Res*, 57: 461-465, 1997
64. Chung I, Schwartz PE, Crystal RG, Pizzorno G, Leavitt J, Deisseroth AB, "Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells", *Cancer Gene Therapy*, 6: 99-106, 1999

65. Peng XY, Won JH, Rutherford T, Fujii T, Zelterman D, Pizzorno G, Sapi E, Leavitt J, Kacinski B, Crystal R, Schwartz P, Deisseroth A, "The use of the L-plastin promoter for adenoviral-mediated, tumor-specific gene expression in ovarian and bladder cancer cell lines", *Cancer Res*, 61: 4405-4413, 2001
66. Friedman EL, Hayes DF, Kufe DW, "Reactivity of monoclonal antibody DF3 with a high molecular weight antigen expressed in human ovarian carcinomas", *Cancer Res*, 46: 5189-5194, 1986
67. Tai YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA, "In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene", *Cancer Res*, 59: 2121-2126, 1999
68. Casado E, Gomez-Navarro J, Yamamoto M, Adachi Y, Coolidge CJ, Arafat WO, Barker SD, Wang MH, Mahasreshti PJ, Hemminki A, Gonzalez-Baron M, Barnes MN, Pustilnik TB, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT, "Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications", *Clin Cancer Res*, 7: 2496-2504, 2001
69. Abe T, Tominaga Y, Kikuchi T, Watanabe A, Satoh K, Watanabe Y, Nukiwa T, "Bacterial pneumonia causes augmented expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in the murine lung", *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 1235-1240, 1997
70. Barker SD, Kanerva A, Rivera A, Coolidge C, Yamamoto M, Hakkarainen T, Alvarez RD, Curiel DT, Hemminki A, "The regulatory sequences of the secretory leukoprotease inhibitor gene as a promising tissue-specific promoter for ovarian cancer gene therapy", *Mol Ther*, 5: S412, 2002
71. Siders WM, Halloran PJ, Fenton RG, "Transcriptional targeting of recombinant adenoviruses to human and murine melanoma cells", *Cancer Res*, 56: 5638-5646, 1996
72. Ring CJ, Harris JD, Hurst HC, Lemoine NR, "Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral, 92 retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promoter", *Gene Ther*, 3: 1094-1103, 1996
73. Strayer MS, Guttentag SH, Ballard PL, "Targeting type II and Clara cells for adenovirus-mediated gene transfer using the surfactant protein B promoter", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 1-11, 1998
74. Lee EJ, Martinson F, Kotlar T, Thimmapaya B, Jameson JL, "Adenovirus-mediated targeted expression of toxic genes to adrenocorticotropin-producing pituitary tumors using the proopiomelanocortin promoter", *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3400-3409, 2001
75. Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R, "Gene therapy: designer promoters for tumour targeting", *Trends Genet*, 16: 174-181, 2000
76. Walton T, Wang JL, Ribas A, Barsky SH, Economou J, Nguyen M, "Endothelium-specific expression of an E-selectin promoter recombinant adenoviral vector", *Anticancer Res*, 18: 1357-1360, 1998
77. Varda-Bloom N, Shaish A, Gonen A, Levanon K, Greenbereger S, Ferber S, Levkovitz H, Castel D, Goldberg I, Afek A, Kopolovitch Y, Harats D, "Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis", *Gene Ther*, 8: 819-827, 2001

78. Katabi MM, Chan HL, Karp SE, Batist G, "Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells", *Human Gene Therapy*, 10: 155-164, 1999
79. Manome Y, Kunieda T, Wen PY, Koga T, Kufe DW, Ohno T, "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, 1998
80. Rein DT, Breidenbach M, Bauerschmitz GJ, Herrmann I, Bender HG, Dall P, „Steuerung einer Krebsgentherapie über strahleninduzierbare Promotoren. Ein neuer Ansatz zur kombinierten Radiochemo- und Gentherapie des Zervixkarzinoms [Radiation-induced Promoters for Combined Radiochemo and Gene Therapie of Zervical Carcinoma]“, *In: Abstraktband der 204. Tagung der NWGGG 2005, Düsseldorf/Germany 2005*
81. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT, „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, 1998
82. Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N, Curiel DT, "Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob", *Journal of Virology*, 72: 1844-1852, 1998
83. Hemminki A, Belousova N, Zinn KR, Liu B, Wang M, Chaudhuri TR, Rogers BE, Buchsbaum DJ, Siegal GP, Barnes MN, Gomez- Navarro J, Curiel DT, Alvarez RD, "An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression", *Mol Ther*, 4: 223-231, 2001
84. Hemminki A, Zinn KR, Liu B, Chaudhuri TR, Desmond RA, Rogers BE, Barnes MN, Alvarez RD, Curiel DT, "In Vivo Molecular Chemotherapy and Noninvasive Imaging With an Infectivity-Enhanced Adenovirus", *J Natl Cancer Inst*, 94: 741-749, 2002
85. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Recombinant DNA Advisory Committee: minutes of meeting, December 13 & 15, 2000. *Hum Gene Ther*, 12: 1559-1584, 2001
86. Hemminki A, Alvarez RD, "Adenoviruses in oncology: a viable option?", *BioDrugs*, 16: 77-87, 2002
87. Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, Kay MA, "The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors", *J Virol*, 71: 8798-8807, 1997
88. Einfeld DA, Schroeder R, Roelvink PW, Lizonova A, King CR, Kovesdi I, Wickham TJ, "Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions", *J Virol*, 75: 11284-11291, 2001
89. Bayo-Puxan N, Cascallo M, Gros A, Huch M, Fillat C, Alemany R, "Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting", *J Gen Virol*, 87: 2487-2495, 2006
90. Kanerva A, Zinn KR, Chaudhuri TR, Lam JT, Suzuki K, Uil TG, Hakkarainen T, Bauerschmitz GJ, Wang M, Liu B, Cao Z, Alvarez RD, Curiel DT, Hemminki A, "Enhanced

therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus”, *Mol Ther*, 8: 449-458, 2003

91. Raki M, Kanerva A, Ristimaki A, Desmond RA, Chen DT, Ranki T, Sarkioja M, Kangasniemi L, Hemminki A, “Combination of gemcitabine and Ad5/3-Delta24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus, for the treatment of ovarian cancer”, *Gene Ther*, 12: 1198-1205, 2005

92. Von Seggern DJ, Huang S, Fleck SK, Stevenson SC, Nemerow GR, “Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells”, *J Virol*, 74: 354-362, 2000

93. Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT, “Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism”, *Journal of Virology*, 70: 6839-6846, 1996

94. Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, Kalin S, Boucke K, Beerli RR, Vogt L, Ruedl C, Bachmann MF, Greber UF, Hemmi S, “The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3”, *J Virol*, 78: 4454-4462, 2004

95. Marttila M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson JP, Wadell G, Arnberg N, “CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7”, *J Virol*, 79: 14429-14436, 2005

96. Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, Shayakhmetov D, Li Z, Strauss R, Stone D, Lieber A, “A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells”, *J Virol*, 2006

97. Kangasniemi L, Kiviluoto T, Kanerva A, Raki M, Ranki T, Sarkioja M, Wu H, Marini F, Hockerstedt K, Isoniemi H, Alfthan H, Stenman UH, Curiel DT, Hemminki A, “Infectivity-enhanced adenoviruses deliver efficacy in clinical samples and orthotopic models of disseminated gastric cancer”, *Clin Cancer Res*, 12: 3137-3144, 2006

98. Ranki T, Kanerva A, Ristimaki A, Hakkarainen T, Sarkioja M, Kangasniemi L, Raki M, Laakkonen P, Goodison S, Hemminki AA, “Heparan sulfate-targeted conditionally replicative adenovirus, Ad5.pk7- Delta24, for the treatment of advanced breast cancer”, *Gene Ther*, 2006

99. Sarkioja M, Kanerva A, Salo J, Kangasniemi L, Eriksson M, Raki M, Ranki T, Hakkarainen T, Hemminki A, “Noninvasive imaging for evaluation of the systemic delivery of capsid-modified adenoviruses in an orthotopic model of advanced lung cancer”, *Cancer*, 107: 1578-1588, 2006

100. Rancourt C, Rogers BE, Sosnowski BA, Wang M, Piche A, Pierce GF, Alvarez RD, Siegal GP, Douglas JT, Curiel DT, “Basic 94 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, 1998

101. Gu DL, Gonzalez AM, Printz MA, Doukas J, Ying W, D'Andrea M, Hoganson DK, Curiel DT, Douglas JT, Sosnowski BA, Baird A, Aukerman SL, Pierce GF, “Fibroblast growth factor 2 retargeted adenovirus has redirected cellular tropism: evidence for reduced toxicity and enhanced antitumor activity in mice”, *Cancer Res*, 59: 2608-2614, 1999

102. Wesseling JG, Bosma PJ, Krasnykh V, Kashentseva EA, Blackwell JL, Reynolds PN, Li H, Parameshwar M, Vickers SM, Jaffee EM, Huijbregtse K, Curiel DT, Dimitriev I, "Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors", *Gene Ther*, 8: 969-976., 2001
103. Kashentseva EA, Seki T, Curiel DT, Dimitriev IP, "Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain", *Cancer Res*, 62: 609-616, 2002
104. Hemminki A, Dimitriev I, Liu B, Desmond RA, Alemany R, Curiel DT, "Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule", *Cancer Res*, 61: 6377-6381, 2001
105. Glasgow JN, Bauerschmitz GJ, Curiel DT, Hemminki A, "Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications", *Curr Gene Ther*, 4: 1-14, 2004
106. Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L, Kirn D, "An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy", *Nature Med*, 6: 1134-1139, 2000
107. Balague C, Noya F, Alemany R, Chow LT, Curiel DT, "Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes", *J Virol*, 75: 7602-7611, 2001
108. Lam JT, Kanerva A, Bauerschmitz GJ, Takayama K, Suzuki K, Yamamoto M, Bhoola SM, Liu B, Wang M, Barnes MN, Alvarez R, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A, "Inter-patient variation in efficacy of five oncolytic adenovirus candidates for ovarian cancer therapy", *J Gene Med*, 6: 1333-1342, 2004
109. Curiel DT, "The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy", *Clin Cancer Res*, 6: 3395-3399, 2000
110. Curiel DT, "Rational design of viral vectors based on rigorous analysis of capsid structures [comment]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*", 1: 3-4, 2000
111. Gomez-Navarro J, Curiel DT, "Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy", *Lancet Oncol*, 1: 148-158, 2000
112. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP, "A mutant 75 oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo", *Oncogene*, 19: 2-12, 2000
113. Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, Curiel DT, "Novel Oncolytic Adenoviruses Targeted to Melanoma: Specific Viral Replication and Cytolysis by Expression of E1A Mutants from the Tyrosinase Enhancer/Promoter", *Cancer Res*, 62: 4663-4670, 2002
114. Takayama K, Reynolds PN, Adachi Y, Kaliberova L, Uchino J, Nakanishi Y, Curiel DT, "Vascular endothelial growth factor promoter-based conditionally replicative adenoviruses for pan-carcinoma application", *Cancer Gene Ther*, 2006

115. Zhu ZB, Chen Y, Makhija SK, Lu B, Wang M, Rivera AA, Yamamoto M, Wang S, Siegal GP, Curiel DT, McDonald JM, "Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma", *Int J Oncol*, 29: 1319-1329, 2006
116. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR, "Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells", *Cancer Res*, 57: 2559-2563, 1997
117. Yu DC, Sakamoto GT, Henderson DR, "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 Research*, 59: 1498-1504, 1999
118. Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, Phipps S, Chiang YL, "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma", *Hum Gene Ther*, 10: 1721-1733, 1999
119. Kurihara T, Brough DE, Kovessi I, Kufe DW, "Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen", *J Clin Invest*, 106: 763-771, 2000
120. Hernandez-Alcoceba R, Pihajja M, Wicha MS, Clarke MF, "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, 2000
121. Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, Muramatsu T, Curiel DT, "A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging", *Cancer Res*, 61: 7882-7888, 2001
122. Freytag SO, Rogulski KR, Paielli DL, Gilbert JD, Kim JH, "A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy", *Human Gene Therapy*, 9: 1323-1333, 1998
123. Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, Ford H, Jay W, Ramsey WJ, Blaese RM, "Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer", *Gene Ther*, 6: 57-62, 1999
124. McCormick F, "Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015", *Cancer Biol Ther*, 2: S157-160, 2003
125. Cohen EE, Rudin CM, "ONYX-015. Onyx Pharmaceuticals", *Curr Opin Investig Drugs*, 2: 1770-1775, 2001
126. Wadler S, Yu B, Tan JY, Kaleya R, Rozenblit A, Makower D, Edelman M, Lane M, Hyjek E, Horwitz M, "Persistent replication of the modified chimeric adenovirus ONYX-015 in both tumor and stromal cells from a patient with gall bladder carcinoma implants", *Clin Cancer Res*, 9: 33-43, 2003
127. Edwards SJ, Dix BR, Myers CJ, Dobson-Le D, Huschtscha L, Hibma M, Royds J, Braithwaite AW, "Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes", *J Virol*, 76: 12483-12490, 2002

128. Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciana P, Haqq C, Yeh J, Chen C, Gray JW, McCormick FA, "Conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2", *Cancer Cell*, 8: 111-118, 2005
129. Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H, "Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells", *Journal of Virology*, 72: 9470-9478, 1998
130. Hay JG, Shapiro N, Sauthoff H, Heitner S, Phupakdi W, Rom WN, "Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene", *Hum Gene Ther*, 10: 579-590, 1999
131. Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW, "Does the Antitumor Adenovirus ONYX-015/dl1520 Selectively Target Cells Defective in the p53 Pathway?", *J Virol*, 75: 5443-5447., 2001
132. Barker DD, Berk AJ, "Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection", [published erratum appears in *Virology* 1987 May;158(1):263]. *Virology*, 156: 107-121, 1987
133. Sherr CJ, "Cancer cell cycles", *Science*, 274: 1672-1677., 1996
134. Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Ward P, Tollefson AE, Wold WS, "Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein", *J Virol*, 74: 6147-6155, 2000
135. Doronin K, Kuppuswamy M, Toth K, Tollefson AE, Krajcsi P, Krougliak V, Wold WS, "Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy", *J Virol*, 75: 3314-3324, 2001
136. Douglas JT, Kim M, Sumerel LA, Carey DE, Curiel DT, "Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors", *Cancer Res*, 61: 813-817, 2001
137. Shinoura N, Yoshida Y, Tsunoda R, Ohashi M, Zhang W, Asai A, Kirino T, Hamada H, "Highly augmented cytopathic effect of a fibermutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas", *Cancer Res*, 59: 3411-3416, 1999
138. Lamfers ML, Grill J, Dirven CM, van Beusechem VW, Geoerger B, van den Berg J, Alemany R, Fueyo J, Curiel DT, Vassal G, Pinedo HM, Vandertop WP, Gerritsen WR, "Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy", *Cancer Res*, 62: 5736-5742, 2002
139. Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krasnykh V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemany R, Curiel DT, Hemminki A, "Treatment of ovarian cancer 72 with a tropism modified oncolytic adenovirus", *Cancer Res*, 62: 1266-1270, 2002
140. Kanerva A, Hemminki A, "Adenoviruses for treatment of cancer", *Ann Med*, 37: 33-43, 2005
141. Breidenbach M, Rein DT, Wang M, Nettelbeck DM, Hemminki A, Ulasov I, Rivera A, Everts M, Alvarez RD, Douglas JT, Curiel DT, "Genetic replacement of the adenovirus shaft

fiber reduces liver tropism in ovarian cancer gene therapy”, *Hum Gene Ther*, 15: 509-518, 2004

142. Stecher H, Shayakhmetov DM, Stamatoyannopoulos G, Lieber AA, “Capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells”, *Mol Ther*, 4: 36-44, 2001

143. Yu L, Takenobu H, Shimoizato O, Kawamura K, Nimura Y, Seki N, Uzawa K, Tanzawa H, Shimada H, Ochiai T, Tagawa M, “Increased infectivity of adenovirus type 5 bearing type 11 or type 35 fibers to human esophageal and oral carcinoma cells”, *Oncol Rep*, 14: 831-835, 2005

144. Ni S, Gaggar A, Di Paolo N, Li ZY, Liu Y, Strauss R, Sova P, Morihara J, Feng O, Kiviat N, Toure P, Sow PS, Lieber A Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther*, 13: 1072-1081, 2006.

145. DiPaolo N, Ni S, Gaggar, A, Strauss R, Tuve S, Li ZY, Stone D, Shayakhmetov D, Kiviat N, Toure P, Sow S, Horvat B, Lieber A, “Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for vaccination”, *Mol Ther*, 13: 756-765, 2006

146. Stone D, Lieber A, “New serotypes of adenoviral vectors”, *Curr Opin Mol Ther*, 8: 423-431, 2006

147. Smith BF, Curiel DT, Ternovoi VV, Borovjagin AV, Baker HJ, Cox N, Siegal GP, „Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs“, Scott-Ritchey Research Center, College of Veterinary Medicine, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA, *Cancer Biother Radiopharm Dec.*, 21(6):601-6, 2006

148. Smith RR, Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Thomas LB, “Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix”, *Cancer*, 9: 1211-1218, 1956

149. Ganly I, Eckhardt SG, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gulley ML, Heise C, von Hoff DD, Kaye SB, “A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer”, [published erratum appears in *Clin Cancer Res* 2000 May;6(5):2120]. *Clin Cancer Res*, 6: 798-806, 2000

150. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D, “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, 2000

151. Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, Jiang WQ, Guan ZZ, Liu JW, Zhang Y, Hu XH, Wu GH, Wang HQ, Chen ZC, Chen JC, Zhou QH, Lu JW, Fan QX, Huang JJ, Zheng X, “[Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus.]”, *Ai Zheng*, 23: 1666-1670, 2004

152. Casado E, Alemany R, Suzuki K, Gomez Navarro J, Arafat W, Barker S, De Castro J, Feliu J, Zamora P, Lopez J, Gonzalez Baron M, Curiel DT, “A Conditionally Replicative Adenovirus with Enhanced Infectivity (Ad D24-RGD) for Ovarian Cancer Gene Therapy: Preclinical Evaluation of Selectivity, Oncolytic Potency and Chemotherapy Combination Strategies”, *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 20: 253a, 2001

153. Lam JT, Kanerva A, Bauerschmitz GJ, Barker SD, Straughn MJ, Wang M, Blackwell JL, Alvarez RD, Curiel DT, Hemminki A, "Spheroids as a Three Dimensional Model For Analysis of Replicative Viral Agents on Primary Tumor Cells", *Mol Ther*, 3: S87, 2001
154. van Beusechem VW, Mastenbroek DC, van den Doel PB, Lamfers ML, Grill J, Wurdinger T, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR, "Conditionally replicative adenovirus expressing a targeting adapter molecule exhibits enhanced oncolytic potency on CAR-deficient tumors", *Gene Ther*, 10: 1982-1991, 2003
155. Rein DT, Breidenbach M, Kirby TO, Han T, Siegal GP, Bauerschmitz GJ, Wang M, Nettelbeck DM, Tsuruta Y, Yamamoto M, Dall P, Hemminki A, Curiel DT, "A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer", *Clin Cancer Res*, 11: 1327-1335, 2005
156. Vattedi E, Claudio PP, "Adenoviral gene therapy in head and neck cancer", *Drug News Perspect*, 19: 329-337, 2006
157. Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, Hurskainen H, Tynnela K, Turunen M, Vanninen R, Lehtolainen P, Paljarvi L, Johansson R, Vapalahti M, Yla-Herttuala S, "Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses", *Hum Gene Ther*, 11: 2197-2205, 2000
158. Immonen A, Vapalahti M, Tynnela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Yla-Herttuala S, "AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study", *Mol Ther*, 10: 967-972, 2004
159. Schuler M, Herrmann R, De Greve JL, Stewart AK, Gatzemeier U, Stewart DJ, Laufman L, Gralla R, Kuball J, Buhl R, Heussel CP, Kommoss F, Perruchoud AP, Shepherd FA, Fritz MA, Horowitz JA, Huber C, Rochlitz C, "Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: Results of a multicenter phase II study", *J Clin Oncol*, 19: 1750-1758, 2001
160. Peng Z, "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers", *Hum Gene Ther*, 16: 1016-1027, 2005
161. Bauerschmitz GJ, Kanerva A, Wang M, Herrmann I, Shaw DR, Strong TV, Desmond R, Rein DT, Dall P, Curiel DT, Hemminki A, "Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer", *Int J Cancer*, 111: 303-309, 2004
162. Kanerva A, Raki M, Ranki T, Särkioja M, Koponen J, Desmond RA, Helin A, Stenman UH, Isoniemi H, Höckerstedt K, Ristimäki A, Hemminki A, "Chlorpromazine and apigenin reduce adenovirus replication and decrease replication associated toxicity.", *J Gene Med*; 9(1):3-9, Jan 2007
163. Pesonen S, Diaconu I, Cerullo V, Escutenaire S, Raki M, Kangasniemi L, Nokisalmi P, Dotti G, Guse K, Laasonen L, Partanen K, Karli E, Haavisto E, Oksanen M, Karioja-Kallio A, Hannuksela P, Holm SL, Kauppinen S, Joensuu T, Kanerva A, Hemminki A, "Integrin targeted oncolytic adenoviruses Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GMCSF for treatment of patients with advanced chemotherapy refractory solid tumors.", *Int J Cancer*, Apr 15;130(8):1937-47. doi: 10.1002/ijc.26216, 2012

<u>7. Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abb. 1 Transkriptionales Targeting von CRAds mittels eines Tumor-selektiven Promoters	14
Abb. 2 Verstärkung der tumorselektiven Infektivität durch ein transduktionales Targeting	15
Abb. 3 Aufbau eines Adenovirus	17
Abb. 4 CRAd mit TLT-Kapazität und Monitoring	30
Abb. 5 Nutzung des translationalen Targetings von CRAds	31
Abb. 6 Ad-CXCR4-UTR-E1A pIX-RFP	33
Abb. 7 Fluoreszenz-Mikroskopie MDA-MB-435s 24 h nach Infektion	34
Abb. 8 MB-435s Flow-Zytometrie	36
Abb. 9 Fibroblasten Flow-Zytometrie	37
Abb. 10 MDA-MB-361 Flow-Zytometrie	38
Abb. 11 MDA-MB-231 Flow-Zytometrie	39
Abb. 12 ZR-75-1 Flow-Zytometrie	40
Abb. 13 HMEC Flow-Zytometrie	41
Abb. 14 Quantifizierung der Adenovirus-Infektivität mittels Flow-Zytometrie	44
Abb. 15 Crystal violet; zeitliche Übersicht der Onkolyse in Abhängigkeit vom m.o.i	45
Abb. 16 Versuchsanordnung Crystal violet	46
Abb. 17 Fibroblasten 48 h nach Infektion	48
Abb. 18 MDA-MB-361 48 h nach Infektion	48
Abb. 19 MDA-MB-231 48 h nach Infektion	49
Abb. 20 ZR-75-1 48 h nach Infektion	49
Abb. 21 Tissue slide-Technik	50
Abb. 22 Experimetelle Untersuchung adenoviral-onkolytischer Gentherapie-Ansätze für gynäkologische Malignom-Erkrankungen	67
Abb. 23 Experimetelle Untersuchung adenoviral-onkolytischer Gentherapie-Ansätze	70

<u>8. Tabellenverzeichnis</u>	Seite	
Tab. 1	Epidemiologie des Mammakarzinoms bei Frauen in Deutschland	11
Tab. 2	MB-435s Flow-Zytometrie	36
Tab. 3	Fibroblasten Flow-Zytometrie	37
Tab. 4	MDA-MB-361 Flow-Zytometrie	38
Tab. 5	MDA-MB-231 Flow-Zytometrie	39
Tab. 6	ZR-75-1 Flow-Zytometrie	40
Tab. 7	HMEC Flow-Zytometrie	41
Tab. 8	Crystal violet in Relation zum m.o.i	44

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ad	Adenovirus
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BPE	bovine pituitary extract
BRCA	Breast Cancer
BSA	bovine serum albumine
BSP	
CAMR	Centre for Applied Microbiology & Research
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CRAd	conditionally replicative Adenovirus
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetonsäure $C_{10}H_{16}N_2O_8$
eIF4	eucaryontic trans initiation factor
FAS	TNF receptor superfamily, member 6 (Typ 1-Membranprotein)

FBS	fetal bovine serum
FGF2	fibroblast growth factor 2
FIGO	Federation Internationale de Gynecologic et d'Obstetrique
GC	Guanin Cytosin
HBSS	HEPES buffered saline solution
hEGF	human epidermal growth factor
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsaure $C_8H_{18}N_2O_4S$
HMEC	human mammary epithelial cells
HRP	horseradish per oxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IARC	international agency for Research of Cancer
ITR	inverted terminal repeats
MEGM	mammary epithelial growth medium
m.o.i.	multiplicity of infectivity
PBS	phosphate buffer solution
RFP	red fluoreszent proteine
rhFGF-B	recombinant human basic fibroblast growth factor
rpm	rounds per million
Tab	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNS	trypsin neutralizing solution
TP	terminal proteine
TSP	Tumor-spezifisches-Protein
UICC	Union for International Cancer Control
UTR	untranslatierte Region
VEGF	vascular endothelial growth factor
wnt 7h-	Wingless Int-1 (flügelloses Gen, fördert Brustkrebs), Signal

10. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Creutz, Heike
Wohnort: Rathelbeckstr. 293 A
40627 Düsseldorf
Telefon: 0211 / 2612130
Geburtsdatum: 18.02.1967
Geburtsort: Dortmund
Familienstand: verheiratet
Kinder: Chantal, geb. 20.09.1993
Isabel, geb. 12.06.1995
Olivia, geb. 26.02.1998
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch- katholisch

Schulbildung

09.06.1986 Abitur am Gymnasium in Meschede (Hochsauerlandkreis)

Berufsausbildung

01.07.1986- 30.11.1986 Praktikum in einem Altenpflegeheim in Meschede
01.04.1987- 31.03.1990 Berufsausbildung zur Krankenschwester an der Krankenpflege-
schule des Krankenhauses „Maria- Hilf“ in Brilon
(Hochsauerlandkreis)
01.03.1990 Staatsexamen in der Krankenpflege

Studium

01.04.1990- 31.03.2005 Studium der Humanmedizin an der Heinrich- Heine- Universität
Düsseldorf
1990- 1994 Vorklinischer Studienabschnitt
12.09.1994 Ärztliche Vorprüfung
1994-1999 u. 2004-2005 Klinischer Studienabschnitt
15.08.2005- 14.07.2006 Praktisches Jahr an der Heinrich- Heine- Universität
Wahlfach: Gynäkologie / Geburtshilfe
Innere Medizin: Kardiologie und Internistische
Notaufnahme
Chirurgie: Herz- Thorax- Chirurgie und Chirurgische
Ambulanz
30.11.2006 Ärztliche Prüfung
16.04.2007 Erhalt der Approbation
04.07.2012 Facharztprüfung Gynäkologie und Geburtshilfe

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen:

20.02.1995- 21.03.1995	Innere Medizin, St. Antonius- Kliniken in Wuppertal
05.03.1997- 06.04.1997	Pädiatrie, Praxis- Famulatur in Wuppertal
01.03.2004- 30.03.2004	Allgemeinmedizin, Praxis- Famulatur in Düsseldorf
09.08.2004- 07.09.2004	Gynäkologie / Geburtshilfe im EVK Düsseldorf

Nebentätigkeiten:

1990- 1991	Nacht- und Wochenenddienste sowie Vollzeitdienste in den Semesterferien im EVK Düsseldorf in der Gynäkologie, Aufnahmestation und Intensivstation
1991- 1995	Nacht- und Wochenenddienste sowie Vollzeitdienste in den Semesterferien im Klinikum Barmen Wuppertal in der Inneren Medizin und auf einer interdisziplinären Intensivstation
1999- 2006	Unterrichtstätigkeit in der Krankenpflege in den Fächern: Gynäkologie / Geburtshilfe, Anatomie / Physiologie, Pathologie und Urologie, im Ausbildungszentrum für Gesundheits- und Krankenpflegeberufe der Heinrich- Heine- Universität, in der Krankenpflegeschule des St. Martinus- Krankenhauses Düsseldorf sowie in der St. Elisabeth- Akademie Düsseldorf

Promotion:

seit August 2006	Anfertigung der Doktorarbeit an der Heinrich- Heine- Universität Prof. Dr. H. G. Bender / PD Dr. med. Gerd Bauerschmitz Thema: Triple Level Targeting zur zielgerichteten Virotherapie bei Mamma- Karzinom
12/2006-03/2007	Dissertationsbearbeitung bei Prof. J. Michael Mathis, Department of Cell Biology and Anatomy, Gene Therapy Program, LSU Health Sciences Center, Shreveport, Louisiana, USA

Arbeitsstelle:

01.06.2007 - 30.11.2011	Assistenzärztin in der Frauenklinik der Kaiserswerther Diakonie, Florence-Nightingale-Krankenhaus Düsseldorf, Herr Prof. Dr. B. Lampe
03 und 09/2009 09/2011	MIC I und II Prof. Hucke, Bethesda-Klinikum, Wuppertal DEGUM I
01.12.2011 - 30.06.2013	Assistenzärztin in der Frauenklinik im Sana-Klinikum Remscheid, Herr Dr. D. M. Forner
seit 01.07.2013	Oberärztin in der Frauenklinik im Sana-Klinikum Remscheid, Herr Dr. D. M. Forner

Poster-Präsentation/Publicationen:

02/2007	LSUHSC Shreveport: Triple Level Targeting zur zielgerichteten Virotherapie bei Mamma- Karzinom
05/2007	AGO Bensberg: RFP als Imaging-Faktor
10/2010	DGGG, München: 1. Exenteration – ein Entscheidungshilfemodell 2. Plazenta praevia marginalis increta – Hysterektomie – die einzige operative Option?
12/2012	Der Gynäkologe: Therapieoptionen bei Placenta praevia marginalis increta
10/2013	ESGE und DAGG Berlin: Retroperitoneal cystic Lymphangiomas

Sonstiges:

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Spanisch, Latein

11. Danksagung

An dem Gelingen einer Arbeit wie dieser sind immer mehrere Personen beteiligt, wenn auch die experimentelle Forschung und wissenschaftliche Recherche mir als Autorin oblag.

Dennoch, ohne die Unterstützung vieler, mir sehr nahestehender Menschen, hätte ich diese Doktorarbeit nicht fertigen können.

Besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. med. H.G. Bender für die Überlassung des Themas. In gleicher Weise danke ich seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. med. W. Janni sowie dessen Nachfolgerin Frau Prof. Dr. med. T. N. Fehm, welche mir die Möglichkeit zur Promotion an der Universitäts-Frauenklinik gegeben haben.

Ich danke ebenso Frau Dr. med. Mariam Alexandra Stoff-Khalili, die mir meinen Forschungsaufenthalt an der LSUHSC, USA, vermittelt hat für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit.

Mein vorrangiger Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. G. Bauerschmitz für seine unermüdliche und bestärkende sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion.

Im Besonderen danke ich Herrn Professor J. Michael Mathis, ebenso wie seinem Team, Ana Nedeljkovic-Kurepa, Linda Li, Disha Mody, Shilpa Bhatia, Yoshinobu Odaka und Jagat Podduturi, für die intensive Unterstützung mit all ihren persönlichen und wissenschaftlichen Fähigkeiten. Ich hatte die Gelegenheit von allen vorhandenen Ressourcen hinsichtlich der Adenotherapie für meine Studien zu profitieren und darauf aufzubauen.

Besonders hervorzuheben ist allerdings der Einsatz meiner Familie, allen voran meiner Kinder Olivia, Isabel und Chantal und meines Ehemannes, Herr Peter Creutz, die über Jahre hinweg meine Arbeit und insbesondere die Zeit meines Auslandsaufenthaltes, geduldig und liebevoll mitgetragen haben.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern, Anita und Ulrich Richter, und meiner Schwiegermutter, Ina Creutz für ihre selbstlose Betreuungsleistung in Hinblick auf meine Kinder danken. Ohne ihren gewissenhaften und dauerhaften Einsatz wären Familie und Beruf in dieser Zeit für mich nicht vereinbar gewesen.

Letztlich danke ich von Herzen meiner Schwester, Elke Berg mit meinem Schwager Siegi und meiner kleinen Nichte Mia und Siegi Mats, für ihr Einfühlungsvermögen und ihre Tatkraft.

Düsseldorf, 12.04.2014

Heike Creutz

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eidesstatt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

12.04.2014

Heike Creutz