

Aus der
Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. T. Fehm

**Untersuchung VEGF-assoziiierter antiangiogener
Behandlungsansätze am Ovarialkarzinom-Mausmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Anne-Kathrin Belz geb. Welter

2015

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Daniel Rein

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Hendrik Stoecklein

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Rein, D. T., *et al.* (2012b), "Systemic Administration of Bevacizumab Prolongs Survival in an in Vivo Model of Platinum Pre-Treated Ovarian Cancer," *Oncol Lett*, 3, 530-534.

Rein, D. T., *et al.* (2012a), "Combination of a Mdr1-Targeted Replicative Adenovirus and Chemotherapy for the Therapy of Pretreated Ovarian Cancer," *J Cancer Res Clin Oncol*, 138, 603-610.

Zusammenfassung

Ein Großteil der an einem Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen leidet an dem sekundären Symptom des malignen Aszites. Therapeutisch steht der VEGF-Antikörper Bevacizumab zur Reduktion dieses Aszites zur Verfügung. Bisher wurde der Antikörper intravenös verabreicht. In dem hier untersuchten Ovarialkarzinom-Mausmodell wurde die Effizienz einer intravenösen und einer intraperitonealen Applikation von Bevacizumab miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Injektion des Antikörpers eine viel versprechende Alternative darstellt. Sowohl in der Monotherapie als auch in einer Kombinationstherapie mit Paclitaxel war festzustellen, daß sich der Überlebenszeitraum verlängert und sich der Bauchumfang reduziert hat.

In der Behandlung maligner Tumore stellen die konditional replikativen Adenoviren eine neue sichere Behandlungsmöglichkeit dar. Für eine effektive und sichere gentherapeutische Behandlung des Ovarialkarzinoms ist eine gezielte Infektion der malignen Tumorzellen ebenso wichtig wie eine auf Karzinomzellen spezialisierte Virusreplikation. Um diese Voraussetzungen zu schaffen, werden konditional replikative Adenoviren verwendet, bei denen eine Modifikation der adenoviralen Fiber durch Einsatz einer 5/3 Fiber-Chimäre vorliegt. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt ein etablierter Ansatz, um die beim Ovarialkarzinom vorhandene CAR-Defizienz zu umgehen. Für eine gezielte virale Infektion der Karzinomzelle und Replikation in der Karzinomzelle wurde für die Versuche der *Multiple Drug Resistance* Gen 1 Promotor (MDR1-Promotor) gewählt. MDR1 gilt als das bedeutendste Resistenzgen beim Ovarialkarzinom und ist verantwortlich für die rasche Resistenzentwicklung auf Zytostatika. Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell durchgeführt. Es zeigten sich in den Gruppen, die eine alleinige intraperitoneale virale Therapie mit CRAds oder eine Kombinationstherapie bestehend aus CRAd, Zytostatikum und/oder Antikörper erhalten haben, die längsten Überlebenszeiträume. Somit konnte die Effektivität der MDR1 gesteuerten Adenoviren und der positive Einfluss auf den Überlebensfaktor bewiesen werden. Um die spezifische Infektion der malignen Tumorzellen zu demonstrieren, wurde in den Tumoren immunhistochemisch das virale E1A Protein nachgewiesen. Da die hier verwendeten konditional replikativen Adenoviren einen natürlichen Lebertropismus aufweisen, wurden die Lebern der Mäuse hinsichtlich einer möglichen Lebertoxizität histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Es konnten in der H&E Färbungen und in den immunhistochemischen untersuchten Schnitten der Lebern keine beweisende virale Infektion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die auf chemoresistente-MDR-exprimierende Ovarialkarzinomzellen zielende Therapie mittels konditional replikativer Adenoviren eine viel versprechende Alternative für eine zukünftige Therapie des zytostatikaresistenten Ovarialkarzinoms darstellt.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP Binding Cassette
ABC Methode	Avidin-Biotin-Complex Methode
Ad	Adenovirus
Ad3	Adenovirus Serotyp 3
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
Ad5/3	Fiberchimäre aus Ad5 Fiber (tail, shaft) und Ad3 Fiber (knob)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>Breast Cancer 1 Gen</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2 Gen</i>
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CR2	<i>constand region 2</i>
COX 2	Cyclooxygenase 2
CRAd	Konditional replizierendes Adenovirus
CXR4	Alpha Chemokin Rezeptor
DAB	3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1A	<i>adenovirales immediate early E1-Gen</i>
E-Gene	adenovirale frühe Gene (E1 bis E4)
et al.	und andere
e.V.	eingetragener Verein
FCS	fötale Kälberserum
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
g	Gramm
GCV	Ganciclovir ([±]-9-[1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl]guanine)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
G1, G2 Phase	<i>Gap</i> (engl.) = Lücke, Abstand
h	Stunde
HSVtk	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H₂O₂	Wasserstoffperoxyd

i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IHC	Immunhistochemie
IRS Score	Immunreaktiver Score
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Luc	Luziferase
MDR	<i>Multiple Drug Resistance Gen</i>
MDR1	<i>Multiple Drug Resistance Gen 1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
m²	Quadratmeter
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mM	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MSLN	Mesothelin-Promotor
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (puffer based saline)
p-gp	p-Glykoprotein
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
Rb	Retinoblastom
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RGD-4c	Arginin-Glycin Asparginsäure Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe Combined Immune Deficiency</i>
SLPI	<i>Secretory Leucoprotease Inhibitor</i>
S-Phase	Synthesephase
TVA	Tierversuchsanstalt
UpM	Umdrehung per Minute
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vol	Volumen

VP	Viruspartikel
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
%	Prozent
°C	Grad Celcius
<	kleiner als
≤	kleiner gleich
>	größer als
≥	größer gleich

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Malignome bei Frauen	1
1.2	Das Ovarialkarzinom	1
1.2.1	Therapie des Ovarialkarzinoms	3
1.2.2	Peritonealkarzinose- Aszites	3
1.2.3	Die Resistenzentwicklung des Ovarialkarzinoms- das MDR-1 Gen	5
1.3	Gentherapeutische Ansätze beim Ovarialkarzinom	7
1.4	Adenovirale Gentherapie	9
1.4.1	Adenovirale Infektion der Zielzelle	10
1.4.2	Adenoviraler Replikationszyklus	10
1.4.3	Adenoviraler Gentransfer	11
1.4.4	Konditional replikative Adenoviren (CRAds)	11
1.4.4.1	Transduktionelles Targeting	13
1.4.4.2	Transkriptionelles Targeting	14
1.5	Das Ad5/3MDR1E1	15
1.5.1	5/3 Fiberchimerisierung	15
1.5.2	MDR1-Promotor	17
1.5.3	Tumorspezifische E1A Deletion	17
2	Zielsetzung der Arbeit	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Zellkultur	20
3.2	Subkultivierung der Zellen	20
3.3	Zellzählung	21
3.4	Kryokonservierung	21
3.5	Tierexperiment	21
3.5.1	Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	22
3.5.2	Tumorzellen	22
3.5.3	Aufbereitung der Pharmazeutika	22
3.6	Verwendete Adenoviren	23
3.7	Experimentelles Design	24
3.8	Probenentnahme bei den Mäusen	26
3.8.1	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien	29
3.9	H&E-Färbung und Immunhistochemie	31
3.9.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	31
3.9.2	Immunhistochemie	33
3.9.2.1	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Ergebnisse der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Bevacizumab	39

4.1.1	Überlebensdauer	39
4.1.2	Gewicht	40
4.1.3	Querschnittsfläche Abdomen	42
4.1.4	Pathologische Untersuchung des Tumorgewebes	43
4.1.4.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung des Tumorgewebes	44
4.1.4.2	Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes	46
4.2	Untersuchung einer Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	48
4.2.1	Überlebensdauer	48
4.2.2	Gewicht	50
4.2.3	Querschnittsfläche Abdomen	51
4.2.4	Pathologische Untersuchung des Tumorgewebes	52
4.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung des Tumorgewebes	53
4.2.4.2	Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes	55
4.2.5	Histologische Untersuchung der Leber	56
4.2.5.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung der Leber	57
4.2.5.2	Immunhistochemische Färbung der Leber	58
5	Diskussion	60
6	Schlußfolgerungen	65
7	Literatur und Quellenverzeichnis	66
8	Abbildungsverzeichnis	92
9	Tabellenverzeichnis	93
10	Danksagung	94
11	Eidesstattliche Versicherung	95

1 Einleitung

1.1 Malignome bei Frauen

In Deutschland und in den westlichen Industrienationen stellen maligne Tumorerkrankungen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. In Deutschland erkranken jedes Jahr 450.000 Menschen neu an Krebs, 216.000 versterben. Bei Frauen ist die häufigste Krebsart mit 59.510 Neuerkrankungen pro Jahr das Mammakarzinom gefolgt vom Colonkarzinom mit 33.620 Neuerkrankungen und dem Bronchialkarzinom mit 15.180 Neuerkrankungen. Das Ovarialkarzinom stellt das fünft-häufigste Malignom der Frau dar (Deutsche Krebshilfe e.V., 2010).

1.2 Das Ovarialkarzinom

In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 7.700 Frauen am Ovarialkarzinom. An 5. Stelle steht es bei den Krebstodesfällen (Robert Koch Institut, 2010). Das Ovarialkarzinom ist nach dem Corpuskarzinom der zweithäufigste weibliche Genitaltumor, hat aber aufgrund seiner hohen Mortalität eine schlechtere Prognose (Siegel et al., 2013). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren und liegt somit ein Jahr unter dem mittleren Erkrankungsalter für Krebs insgesamt (Robert Koch Institut, 2010). Ca. 90% der Malignome des Ovars stellen epitheliale Tumore dar (Alvarez et al., 1999), (Pfisterer, 2002), (Quirk and Natarajan, 2005). Des Weiteren kommen auch Keimzell-, Keimstrangdrüsentumore oder Sarkome vor. Bei Patientinnen unter 45 Jahren, 5-10% der Ovarialkrebspatientinnen, treten vermehrt Keimzelltumore auf. Neueste pathologische Untersuchungen konnten aufweisen, dass das Ovarialkarzinom auch aus nicht Ovargewebe entsteht und dass die einzelnen Histotypen oftmals nur wenige molekuläre Ähnlichkeiten zeigen (Kurman and Shih Ie, 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass oftmals die distale Tube, aber auch das Ovargewebe der Ursprungsort für ein seröses Ovarialkarzinom sind (Piek et al., 2001), (Lee et al., 2007), (Levanon et al., 2010). Klarzellige und endometrioiden Karzinome stehen in einem engen Zusammenhang mit einer Endometrioseerkrankung (Kuo et al., 2009), (Jones et al., 2010), (Wiegand et al., 2010). Die Mehrzahl von invasiv muzinösen Karzinomen sind Metastasen am Ovar. Hier liegt oftmals eine maligne Erkrankung des Magen-Darm-Traktes vor (Lee and Young, 2003), (Zaino et al., 2011), (Kelemen and Kobel, 2011). Verbesserte histologische Einteilungen, immunologische Marker und genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass Tumore die bisher dem endometrioiden Ursprung zugeordnet wurden, eher zu

den serösen Tumoren eingeteilt werden müssen (Kobel et al., 2008), (Kobel et al., 2009), (Madore et al., 2010).

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weitgehend ungeklärt, es gibt verschiedene Hypothesen zur Entstehung. Die durch die Ovulation immer wiederkehrende Ruptur und Regeneration des Oberflächenepithels des Ovars bei gleichzeitig erhöhtem Gonadotropinspiegel steigert die Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung des Ovaryepithels: Incessant-Ovulation-Theorie nach Fathalla 1971 (Fathalla, 1971). Somit werden als Risikofaktoren, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, unter anderem eine frühe Menarche, späte Menopause und Nulliparität genannt (Whittemore et al., 1992), (Hartge et al., 1994), (Hankinson et al., 1995). Stillen und die langjährige Einnahme von oralen Kontrazeptiva haben eine protektive Funktion (Franceschi et al., 1991), (Beral et al., 2008). Eine Tubenligatur oder eine Hysterektomie scheinen ebenso einen protektiven Einfluss zu haben (Irwin et al., 1991), (Kauff et al., 2008), (Rebbeck et al., 2009). Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko liegt bei Frauen vor, deren Verwandte ersten Grades an Mamma- oder Ovarialkarzinom erkrankt sind oder die selbst an einem Mamma-, Darm-, oder Corpuskarzinom leiden. Genetische Prädispositionen, Mutationen des BRCA 1- (*Breast Cancer 1*) und BRCA 2- (*Breast Cancer 2*) Tumorsuppressorgens liegen bei ca. 5% der Ovarialkarzinom-Patientinnen vor. Das Risiko, am Ovarialkarzinom bis zum 70. Lebensjahr zu erkranken, steigt für die Mutationsträgerinnen des BRCA 1 auf bis zu 65% und für die Mutationsträgerinnen des BRCA 2 auf bis zu 44% (van der Kolk et al., 2010). Frauen, die aus einer Risikofamilie stammen, erkranken im Durchschnitt 10 Jahre früher als Frauen ohne das gleiche familiäre Risiko (early onset). Die Diagnose des Ovarialkarzinoms wird meistens erst in einem sehr späten Stadium der Erkrankung diagnostiziert. Zu den Hauptsymptomen zählen: diffuse Unterbauchbeschwerden, akutes Abdomen (durch tumorbedingte Darmkompression oder Stieldrehung) oder eine Tumorkachexie mit gleichzeitiger massiver Zunahme des Bauchumfanges durch eine Peritonealkarzinose mit konsekutivem Ascites.

1.2.1 Therapie des Ovarialkarzinoms

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht im Wesentlichen aus zwei Maßnahmen: der operativen Therapie zur Reduzierung der Tumorlast und der postoperativen adjuvanten Chemotherapie (Carboplatin und Paclitaxel) für die FIGO-Stadien IIb-IV (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) (du Bois et al., 2003). Mit der radikalen operativen Tumorentfernung (Debulking), die den Goldstandard der Ovarialkarzinomtherapie darstellt (Pfisterer et al., 2003), (Wimberger et al., 2007), (Abaid et al., 2010), wird versucht, eine komplette Tumorreduktion (R0-Resektion) zu erreichen, da die makroskopische Tumorfreiheit eine Grundvoraussetzung für einen optimalen Therapieerfolg bedeutet (Lichtenegger et al., 1998), (Breidenbach et al., 2002), (Bristow et al., 2002), (Harter et al., 2006), (du Bois et al., 2009). Liegt postoperativ ein Tumorrest von ≤ 1 cm vor, haben diese Patientinnen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit suboptimalem Debulking (du Bois et al., 2009). Zunächst zeigt das Ovarialkarzinom eine hohe Ansprechrate auf Zytostatika, aber unter der Primärtherapie kommt es immer wieder zur Entstehung von Mehrfachresistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika (Schondorf et al., 2002), (Hille et al., 2006), (Meinhold-Heerlein and Hauptmann, 2014). Aufgrund dieser Mehrfachresistenzen kommt es trotz radikal chirurgischer Primärtherapie und darauf folgender Kombinationschemotherapie bei 40%-60% der Patientinnen zur Entwicklung von Ovarialkarzinomrezidiven (Ozols, 2002), (Fung-Kee-Fung et al., 2007).

1.2.2 Peritonealkarzinose- Aszites

Am häufigsten tritt ein Rezidiv in Form einer Peritonealkarzinose mit Aszitesbildung auf (Pfisterer, 2002). In diesem Stadium der Erkrankung handelt es sich in den meisten Fällen um eine Palliativsituation. Bis vor einigen Jahren konnte eine Verbesserung der Lebensqualität oftmals nur durch eine mehrfach wiederholte Parazentese erreicht werden (Ayantunde and Parsons, 2007). Doch auch hierbei zeigte sich eine starke Belastung der Patientinnen aufgrund der mehrfachen Wiederholungen oder auch Infektionen (Becker et al., 2006), (Chung and Kozuch, 2008). Eine wirklich dauerhafte Symptomlinderung konnte bisher nicht erreicht werden. Bei der Behandlung der Rezidive steht die Chemotherapie im Vordergrund. Nach dem Zeitpunkt des Auftretens werden die Rezidive in Früh- und Spätrezidive aufgeteilt. Die Frührezidive treten während der Primärtherapie oder in einem Zeitraum von weniger als 6 Monaten nach Beendigung der Primärtherapie auf. Diese frühen,

platinrefraktären Rezidive haben eine schlechtere Prognose als die platinsensiblen Spätrezidive und werden mit einer nicht-platinhaltigen Monotherapie z.B. mit pegyliertem, liposomalem Doxorubicin oder Topotecan oder Gemcitabin oder Paclitaxel behandelt. Tritt ein Rezidiv nach einem tumorfreien Intervall von > 6 Monaten auf, so wird es als platinsensibles Spätrezidiv bezeichnet und eine Kombinationstherapie bestehend aus Carboplatin mit entweder Paclitaxel oder pegyliertem, liposomalem Doxorubicin oder Gemcitabin angewendet. Bei einem platinsensiblen Spätrezidiv gibt es die Möglichkeit einer sekundären tumorreduktiven Operation, abhängig von der Länge des rezidivfreien Intervalls und der individuellen Situation der Patientin. Die zeitliche Länge des tumorfreien Intervalls korreliert mit der Chance der postoperativen Tumorfreiheit (Janicke et al., 1992), (Eisenkop et al., 1995), (Park et al., 2010), (Tentes et al., 2010). Das Wachstum, die Progression und die Metastasierung maligner Tumore sind angiogeneseabhängig, da der Tumor ab einer bestimmten Größe ein eigenes Gefäßsystem aufbauen muss. Für die Regulation dieser pathologischen Angiogenese ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) von entscheidender Bedeutung, (Ferrara and Henzel, 1989), (Tischer et al., 1989), (Ferrara and Davis-Smyth, 1997), (McMahon, 2000). In benignen Geweben ist die VEGF-Konzentration gering. Im malignen Tumor dagegen wird die VEGF-Expression gesteigert und der Gefäßwachstumsfaktor VEGF aktiviert Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen. Daraufhin folgt eine Lyse des Bindegewebes, welches die Kapillaren umgibt und es kommt zu einer Zellmigration kleinerer Zellausläufer in das Gewebe. Durch Proliferation und Migration schon bestehender Endothelzellen entstehen neue Kapillaren. Mit der Umwandlung zu Ateriolen, Arterien, Venolen und Venen wird der Prozess der Angiogenese abgeschlossen (Gospodarowicz et al., 1989), (Ferrara, 1999). Die VEGF-Expression korreliert negativ mit der Tumorprogression und der Überlebenschance der Patientinnen. Der VEGF-Antikörper Bevacizumab bindet mit hoher Affinität an alle humanen VEGF-Isoformen, daraus folgt eine Blockierung der Bindung von VEGF an die Rezeptoren VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor 2, die sich an der Oberfläche von Endothelzellen befinden (de Vries et al., 1992), (Terman et al., 1992). Es folgt die Hemmung der Tumorprogression und die mikrovaskuläre Permeabilität wird verringert (Yukita et al., 2000), (Jain, 2001), (Numnum et al., 2006). Durch die zusätzliche Anwendung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab kann die Lebensqualität durch eine verringerte Aszitesbildung verbessert werden (Yukita et al., 2000). Ebenso kann auch die Überlebenszeit durch den Einsatz von Bevacizumab verlängert werden. Dies konnte ihm Rahmen der GOG-218-Studie bewiesen werden. Hier zeigte sich ein Vorteil der Kombinationstherapie im Vergleich zur

Monochemotherapie (14,1 Monate versus 10,3 Monate) (Katsumata et al., 2009). In einer weiteren Studie (AGO-OVAR 11/ICON7) konnte ebenfalls ein verlängertes Überlebensintervall für die Zusatzbehandlung mit Bevacizumab nachgewiesen werden (Perren et al., 2011). Somit stellt Bevacizumab einen wichtigen Bestandteil aktueller Studien dar, um eine weitere verbesserte Wirkung zu erzielen (Heitz et al., 2012). Seit November 2012 gehört der VEGF-Antikörper aufgrund der vielen positiven Studienergebnisse zur Therapie des ersten platin-sensiblen Rezidivs (Aghajanian et al., 2012).

1.2.3 Die Resistenzentwicklung des Ovarialkarzinoms- das MDR-1 Gen

Zu Beginn der Chemotherapie ist das Ovarialkarzinom in den meisten Fällen chemosensibel, doch unter der Primärtherapie und auch bei Ovarialkarzinomrezidiven kommt es häufig zu Zytostatikaresistenzen (Schondorf et al., 2002), (Hille et al., 2006). Eine *Multiple-Drug-Resistenz* basiert auf der Ausbildung von aktiven Transportproteinen aus der Familie der ATP Binding Cassette Transporter (ABC-Transporter). Beim Ovarialkarzinom hat besonders das *Multiple Drug Resistance Gen 1* (MDR-1 Genprodukt; p-Glykoprotein (p-gp)) eine große Bedeutung bei der Entstehung von Chemotherapieresistenz, besonders in der Resistenzentwicklung gegenüber Anthrazyklinen und Taxanen (Miller and Ojima, 2001), (Zhou, 2008), (Li et al., 2010a). Das MDR-1 Gen stellt eine membranständige Effluxpumpe dar, die in vielen Geweben wie z.B. in der Lunge, der Leber, der Niere oder in der Plazenta vorhanden ist (Cordon-Cardo et al., 1990), (Sugawara et al., 1997). Sie ist für die gezielte Stoffelimination aus der Zelle zuständig und schützt die Zelle somit vor toxischen Substanzen (Kerb et al., 2001), (Leslie et al., 2005). Tumorzellen erhalten durch diesen Mechanismus einen Wachstumsvorteil in der Gegenwart MDR-assoziierter Agenzien (Coldman and Goldie, 1987). Viele Medikamente können das MDR-1 Gen induzieren (z.B. Carbamazepin, Rifampicin) und auch inhibieren (z.B. Cyclosporin, Erythromycin, Verapamil) (Perez-Tomas, 2006). Malignome können bezüglich des MDR-1 Status unterschieden werden. Kolon-, Nieren- und Leberkarzinome weisen von Beginn an eine hohe MDR-1 Gen-Aktivität auf. Das Ovarialkarzinom, das Non-Hodgkin Lymphom und die chronisch myeloische Leukämie zeigen gelegentlich vor der Zytostatikatherapie eine leicht erhöhte MDR-1 Gen-Aktivität. Dagegen zeigen die akute lymphatische Leukämie, das Mammakarzinom und das Phäochromozytom erst nach einer Zytostatikatherapie eine erhöhte MDR-1 Gen-Aktivität (Goldstein et al., 1989). Bei der Untersuchung der basalen MDR-1 Gen-Aktivität von unbehandelten humanen Ovarialkarzinomzellen konnte gezeigt

werden, dass insbesondere bei gut differenzierten serösen und muzinösen Ovarialkarzinomzellen eine hohe basale MDR-1 Gen-Expression vorliegt (Arao et al., 1994). Diese MDR-1 Gen-Expression in primären, unbehandelten Ovarialkarzinomen steht im engen Zusammenhang mit der Tumorprogression (Lu et al., 2007). Findet sich eine niedrige MDR-1 Gen-Expression in Ovarialtumorzellen, so korreliert diese mit einer höheren Überlebensrate der Patientinnen (Materna et al., 2004), (Raspollini et al., 2005), (Odening et al., 2009), liegt dagegen eine erhöhte Expression des MDR-1 Gens vor, so ist das Risiko, Gehirnetastasen beim Ovarialkarzinom zu entwickeln, erhöht (Matsuo et al., 2010). Weitere direkte Zusammenhänge lassen sich zwischen Tumorstadium, Grading, Aszites, Rezidivhäufigkeit und der MDR-1 Gen-Überexpression nachweisen (Chen et al., 2009). Während der Zytostatikatherapie können bestimmte Zytostatika wie z.B. Cisplatin, Doxorubicin und besonders Paclitaxel sowohl in primären Ovarialkarzinomzellen als auch in Rezidivkarzinomzellen zu einer verstärkten Induktion des MDR-1 Gens und somit zu einer verstärkten Expression des MDR-1 Gens auf der Zellmembran chemoresistenter Karzinome führen (Nooter and Herweijer, 1991), (Schondorf et al., 2003), (Hille et al., 2006). Infolge dieser verstärkten Induktion des MDR-1 Promoters kommt es zu einer vermehrten p-gp Synthese, dadurch werden Zytostatika aktiv aus den Zellen heraustransportiert (Miller and Ojima, 2001), ohne dass sie dort effektiv zytostatisch wirken konnten.

1.3 Gentherapeutische Ansätze beim Ovarialkarzinom

Durch Debulking und Chemotherapie kann zwar effizient die Primärtumorlast reduziert werden, doch die Entstehung von Rezidiven und inapparenten Mehrfachresistenzen unter Chemotherapie zeigen die Notwendigkeit von alternativen Therapiemöglichkeiten auf. Neue Erkenntnisse über die molekulare Entstehung von Malignomen ermöglichen neue Therapieansätze in der Behandlung von Krebserkrankungen. Besonders die Entwicklung der Gentherapie stellt eine innovative Therapieoption dar. Das therapeutische Gen wird dabei in die Zielzelle eingeschleust und kann so über sein Genprodukt, das sich positiv auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt, am Ursprungsort der Erkrankung wirken (Mountain, 2000). Liegen der Erkrankung zum Beispiel Gendefekte zugrunde, so können diese mittels Gentherapie kompensiert werden. Ein großer Vorteil der Gentherapie besteht darin, dass eine gezielte Wirkung am Ursprungsort der malignen Erkrankung durchgeführt werden kann. Zurzeit werden viele klinische Gentherapiestudien in unterschiedlichen Krankheitsbereichen durchgeführt. Der größte Anteil mit 64,2% der Studien findet sich im Bereich der Tumorerkrankungen, gefolgt von monogenetischen Erkrankungen (Zystische Fibrose, erbliche Muskeldystrophie) mit 9,2%, Infektionskrankheiten mit 8% und Herz-Kreislaufkrankungen mit 7,8% (The Journal of Gene Medicine 2015 John Wiley and Sons Ltd. www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

Aufgrund der molekularen Unterschiede zwischen benignen und malignen Zellen kann durch Gentherapie gezielt in die Prozesse der Karzinogenese eingegriffen werden, dabei werden unterschiedliche Gentherapiekonzepte genutzt. In der sogenannten Mutationskompensation wird ein funktionales Gen, z.B. das Tumorsuppressorgen p53 eingebracht, das zur Korrektur des krebserzeugenden Genmutationsdefektes führt (Nielsen and Maneval, 1998), (Clayman et al., 1999), (Roth, 2006), (Sakai et al., 2010). Bei der Suizidgentherapie (Prodrugtherapie) wird ein bestimmtes Gen in die malignen Tumorzellen eingeschleust. Das Produkt dieses Suizidgens, meist ein Enzym, bewirkt die intrazelluläre Konvertierung einer separat verabreichten zunächst nicht-toxischen Substanz (Prodrug) zu einem Toxin, welches die maligne Tumorzelle abtötet (McCormick, 2001). Die prominenteste Enzym-Prodrug-Kombination stellen die Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSVtk) und Ganciclovir (GCV) dar (Furman et al., 1980), (Moolten, 1986). Einen weiteren Ansatz stellen die onkolytischen Adenoviren oder konditional replizierenden Adenoviren (CRAds) dar. CRAds besitzen ein sehr großes Wirtsspektrum und die Infektion erfolgt

sowohl in ruhende als auch in teilungsaktive Zellen (Wickham et al., 1993). Mittels Rezeptorbindung erfolgt die virale Infektion der Zieltumorzelle (Bergelson et al., 1997), (Tomko et al., 1997), gefolgt von der viralen Replikation, die zu einer gezielten Tumorzellzerstörung führt (Bauerschmitz et al., 2002a), (Raki et al., 2006).

Die größte Herausforderung in der Forschung der Gentherapie beruht auf der Entwicklung sicherer, nicht toxischer Vektorsysteme und der Gewährleistung einer ausreichend hohen Gentransfereffizienz. Des Weiteren muss eine spezifische Transgenexpression erzielt werden, um mögliche Nebenwirkungen zu vermeiden. Weil sie diesen Voraussetzungen genügen und vielfältige gezielte Manipulation hinsichtlich der Genexpression und zellspezifischer Virusreplikation zulassen, haben sich in den letzten Jahren Viren als Genvehikel etabliert. Nicht-virale Vektoren, wie Plasmide oder synthetisch hergestellte liposomale Vektoren, lassen sich zwar leichter in großen Mengen herstellen und weisen eine geringere Immunogenität und eine hohe DNA- Kapazität auf, aber ihre Zellspezifität ist zu gering (Roder et al., 2003). In ca. 70% aller momentan durchgeführten klinischen Gentherapie-studien werden virale Genvektoren verwendet. Die Auswahl des verwendeten Virus wird von mehreren unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Berücksichtigt wird die Art der Zielzelle bzw. des Zielgewebes und auch die Unterscheidung, ob eine transiente (Adenovirus, Vakzinevirus) oder eine langfristige (Retrovirus, Adeno- assoziiertes Virus) Transgenexpression angestrebt wird (Danthinne and Imperiale, 2000). Adenoviren sind momentan mit 22,5% die am häufigsten genutzten Vektoren, gefolgt von Retroviren mit 18,8% und Plasmid-DNA mit 17,5% (The Journal of Gene Medicine 2015 John Wiley and Sons Ltd. www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

1.4 Adenovirale Gentherapie

Am bedeutendsten für die Gentherapie mittels viraler Vektorvehikel sind derzeit die Adenoviren. Sie wurden im Jahre 1953 erstmals von W.P. Rowe aus adenoidem Gewebe und Tonsillen isoliert (Rowe et al., 1953). Adenoviren zeichnen sich durch ein großes Wirtszellspektrum und eine hohe DNA-Kapazität aus. Ferner sind ihre Gentransferraten *in vivo* als auch *in vitro* in hohem Maße stabil. Maßgeblich sind zudem ihre Gentransduktion in teilungsaktive und teilungsinaktive Zellen und die Möglichkeit, sie für die klinische Testung sowohl in hoher Menge als auch hoher Qualität (*Good Manufacturing Practice: GMP*) zu kultivieren (Wickham et al., 1993), (Bauerschmitz et al., 2002a), (Vorbürger and Hunt, 2002), (Imperiale and Kochanek, 2004). Das Risiko einer Mutagenese ist sehr gering, da das adenovirale Genom nicht in das Wirtszellgenom integriert wird und nach erfolgter Infektion meist extrachromosomal verbleibt (Harui et al., 1999), (Dormond et al., 2009). Ebenso ist die Pathogenität für den Menschen sehr gering (Takafuji et al., 1979). Die über 50 bekannten humanen Serotypen der Adenoviren (Subtypen A-F) sind verantwortlich für folgende Erkrankungen beim Menschen: Pathologien des Respirationstraktes (grippaler Infekt, Bronchitis), Bindehautentzündungen und Entzündungen des Magen-Darm-Traktes (Brody and Crystal, 1994), (Brody et al., 1994), (Nemerow and Stewart, 1999). Die häufigsten adenoviralen Vektorsysteme gehören zum Serotyp 5 (Ad5) aus der Gruppe C. Ein Nachteil der Adenoviren beruht auf ihrem natürlichen Tropismus. Dieser führt bei intravasalen Adenoviren zu einer Akkumulation insbesondere in der Leber, mit darauffolgender Hepatotoxizität (Tanaka et al., 2007), (Arnberg, 2009). Aber auch in der Milz, dem Herz und in den Nieren findet sich eine Akkumulation (Huard et al., 1995), (van der Eb et al., 1998), (Reynolds et al., 1999), (Wood et al., 1999), (Bilbao et al., 2000). Einen Lösungsansatz hierzu bietet das transduktionale Targeting, mit dem eine selektive Infektion maligner Tumorzellen angestrebt wird.

1.4.1 Adenovirale Infektion der Zielzelle

Die adenovirale Infektion einer Zelle erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt beginnt mit einer initialen Bindung des Viruspartikels mittels der am carboxy-terminalen Ende der viralen Fiber befindlichen Knob Region an den korrespondierenden Rezeptor der Zielzelle. Dieser Rezeptor ist im Falle des Adenovirus Serotyp 5 und auch der meisten anderen Serotypen der Coxsackie-Adenovirus Rezeptor CAR (Bergelson et al., 1997), (Tomko et al., 1997). CAR stellt ein 46 kDa großes integrales Membranprotein dar, das über eine typische Transmembrandomäne verfügt, sowie über eine lange zytoplasmatische Domäne und eine extrazelluläre Region, bestehend aus zwei immunglobulinähnlichen Domänen (Philipson and Pettersson, 2004). Im zweiten Schritt kommt es zu einer Interaktion zwischen dem RGD Motiv (Arginin-Glycin-Aspartat) des adenoviralen Penton Proteins und den $\alpha_v\beta$ -Integrinen der Zelle (Wickham et al., 1993). Dies führt zu einer Internalisierung des Virus über Endozytose durch Vesikel, dabei kommt es zum Verlust der Fiberstruktur (Varga et al., 1991), (McDonald et al., 1999). Aufgrund einer pH Erniedrigung im Endosom kommt es zu einer Konformationsveränderung der Kapsidproteine und zu einer Interaktion mit der Zellmembran; dies führt zu einer Zerstörung der Vesikel. Die freigesetzten Viruspartikel befinden sich im Zytoplasma und werden, mittels Mikrotubuli vermitteltem Transport, zur Kernmembran transportiert und durch Kernporen in den Zellkern geschleust. Im Nucleus liegt die adenovirale DNA extrachromosomal vor und es erfolgt die Transkription. Die leeren Virushüllen werden abgebaut.

1.4.2 Adenoviraler Replikationszyklus

Die gesamte adenovirale Replikation wird in 2 Phasen unterteilt (eine frühe und eine späte Phase, jeweils vor oder nach der DNA Replikation) (Fessler and Young, 1998). Nach der Infektion der Zielzelle wird das virale Gen E1A als erstes Gen transkribiert. Dessen Genprodukt induziert nachfolgend wiederum die Transkription früherer Gene (E1B-E4) (Volpers and Kochanek, 2004), (Howarth et al., 2010). Der Genbereich E1 ist für die virale Replikation verantwortlich, da er den zellulären Metabolismus zugunsten der viralen Replikation manipuliert (Endter and Dobner, 2004). Der Bereich E3 dient dem Schutz der infizierten Zelle vor dem Immunsystem (Russell et al., 2004). Die Replikation der viralen DNA erfolgt mittels der DNA Replikationsmechanismen der Wirtszelle. Späte Gene kodieren für strukturelle Virusproteine. Die Zusammensetzung neuer Virionen erfolgt aus Virusgenomen und viralen Hüllproteinen, danach erfolgt die Induktion der Zelllyse und es

kommt zur Freisetzung der neu produzierten Virionen, die dann wiederum benachbarte Zellen infizieren können.

1.4.3 Adenoviraler Gentransfer

Aufgrund ihrer leichten Modifizierbarkeit zu Genvehikeln werden Adenoviren in gentechnologischen Anwendungen eingesetzt. In der ersten Generation der adenoviralen Vektoren wurde eine Deletion der frühen Gene E1 und E3 durchgeführt, um eine höhere Gentransportkapazität zu erlangen, sie können ca. 7,5 kb Fremd-DNA aufnehmen (Bett et al., 1994). Infolge der Deletion des E1 Gens sind die Erstgenerationsvektoren replikationsinkompetent (Danthinne and Imperiale, 2000). Deshalb muss die Produktion dieser rekombinanten adenoviralen Vektoren in Zielzellen erfolgen, die diese Deletion des E1 Gens komplementieren und somit die Replikation ermöglichen. In der zweiten Generation der adenoviralen Vektoren tragen zusätzliche Deletionen zu einer Erhöhung der Insertkapazität bei und die Vektoren erhalten somit einen größeren anti-tumoralen Effekt (Gorziglia et al., 1996), (Krasnykh et al., 2000), (Barton et al., 2006). In den adenoviralen Vektoren der dritten Generation wurde fast das gesamte Adenovirusgenom entfernt (Gutless Vektoren) und somit die Möglichkeit erschaffen, bis zu 36 kb Fremd-DNA zu integrieren (Alba et al., 2005). Trotz guter präklinischer Erfolge erzielten nicht-replikative Adenoviren aufgrund geringer Gentransferraten sowie mangelnder Zellspezifität, in klinischen Studien nur mäßige Erfolge (Vorbürger and Hunt, 2002). Nach den neuesten Erkenntnissen scheint die Ausbreitung der therapeutischen Viren im Zielgewebe und auch die sekundär erfolgte Infektion benachbarter Zielzellen der entscheidende Faktor für die klinische Effizienz der Gentherapie zu sein. Deshalb gewinnen die replikationskompetenten, onkolytischen Viren immer mehr an Bedeutung, da ihre Zielzellen-Infektion die Tumorzellzerstörung durch die virale Replikation zur Folge hat (Relph et al., 2005), (Zhang et al., 2010). Durch diese selektive Replikation in Tumorzellen erzielen diese so genannten onkolytischen Adenoviren oder konditional replikativen Adenoviren (CRAds), höhere Transduktionsraten und bessere Tumorpenetration. Deshalb konnten sie in mehreren Studien sicherer eingestuft werden als nicht replikative Adenoviren (Hemminki and Alvarez, 2002), (Lichtenstein and Wold, 2004), (Kanerva et al., 2007).

1.4.4 Konditional replikative Adenoviren (CRAds)

Die konditional replikativen Adenoviren werden als onkolytische Agenzien in der Tumorthherapie verwendet. CRAds repräsentieren eine neue Klasse anti-tumoraler Vektoren,

die den Ansprüchen einer sich selbst erneuernden und selbst limitierenden Therapieoption genügen. Zur Minderung der Nebenwirkungen und Optimierung der Sicherheitsaspekte wurden Modifikationen der CRAAd-Vektoren durchgeführt, so dass sich die Replikation nur auf malignes Tumorgewebe beschränkt (Abbildung 1).

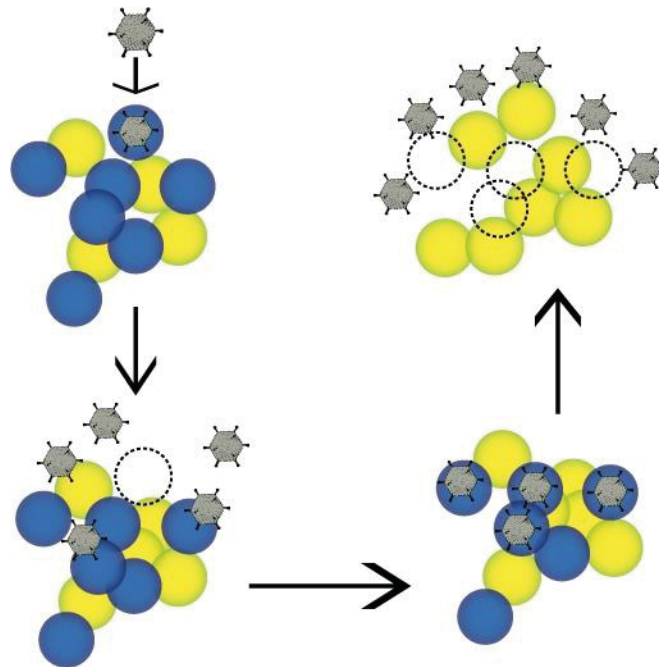


Abbildung 1: Schematischer CRAAd Replikationszyklus

Die Infektion von malignen Tumorzellen (blau) resultiert in Virusreplikation, Onkolyse und Freisetzung der Virionen. In benignen Zellen (gelb) erfolgt keine Replikation, d.h. diese Zellen werden nicht lysiert.

In benignen Zellen wird die adenovirale Replikation unterdrückt, wohingegen die Virusreplikation nach Infektion der Tumorzelle zu einer Amplifikation der initialen Vektordosis führt. Ein Replikationszyklus dauert je nach Serotyp zwischen 18 und 36 Stunden. Nach Infektion der Zelle folgt die selektive virale Replikation in den Zielzellen, welche mit Lyse der Zelle, Freisetzung der neu gebildeten Viren und Infektion der Nachbarzellen endet. Folge ist ein tumorspezifisches, sich selbst amplifizierendes Therapiekonzept, das solange fortbesteht, wie Tumorzellen existieren. Theoretisch ist ein CRAAd-Partikel ausreichend, um eine effiziente Tumورpenetration und Zelllyse des Tumorgewebes (Onkolyse) zu induzieren. Bis heute wurden drei verschiedene Klassen von CRAAd-Vektoren (Typ I-III) durch gezielte Modifikation des CRAAd-Genoms entwickelt.

Typ I: In diesen CRAAd finden sich unterschiedliche Deletionen in den Replikationsgenen, die für die Virusreplikation nötig sind. Diese Deletionen können tumorspezifisch kompensiert werden. Das ist möglich, da es Unterschiede in den Zellzyklusregulationen zwischen

benignen und malignen Tumorzellen gibt. Als Beispiel ist hier die 24 Basenpaar (bp)-Deletion ($\Delta 24$ -Deletion) in der Retinoblastom-Binderegion (Rb-Binderegion) CR2 (*constant region 2*) des E1A Gens zu nennen (Fueyo et al., 2000). Durch die Entfernung der Bindestelle des Retinoblastom-Proteins kommt es zur viralen Bindung und Replikation in Zellen mit defektem Rb-Pathway, wie es in Tumorzellen zu finden ist (Wang et al., 1995), (Nettelbeck, 2008). Bei einer weiteren Deletion, der $\Delta 2$ -Deletion des E1A-Gens, wird die Bindestelle für das zelluläre p300-Protein entfernt, so dass es zu einer Verhinderung der Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase kommt. Dadurch kommt es zu einer Beschränkung der Replikation auf Zellen, wie z.B. maligne Tumorzellen, die unabhängig vom p300-Pathway proliferieren (Howe et al., 2000), (Nettelbeck et al., 2002). Durch eine Kombination mehrerer Deletionen kann die Tumorselektivität erhöht werden, jedoch kommt es zu einer Abnahme der viralen Replikation (Bauerschmitz et al., 2002a).

Typ II: Durch den Einbau tumorspezifischer Promotoren in die CRAds vor frühe virale Gene kann eine Steuerung der viralen Replikation erfolgen, so dass eine Transkription nur in der Zielzelle erfolgt (transkriptionelles Targeting) (Dorer and Nettelbeck, 2009), (Li et al., 2010b). Damit ist die Virusreplikation abhängig von der Aktivität und Spezifität des heterologen Promotors.

Typ III: Diese CRAds basieren auf der Kombination aus den CRAd-Typen Typ I und Typ II. Dementsprechend sind in diesen CRAds Deletionen in relevanten Replikationsgenen und heterologe Promotoren zu finden, die diese Replikationswege regulieren. Die CRAds vom Typ III verfügen über die höchstmögliche Spezifität der adenoviralen Replikation (Nettelbeck et al., 2002), somit kann die Tumorselektivität weiter erhöht werden (Haviv and Curiel, 2003).

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

1.4.4.1 Transduktionelles Targeting

Das transduktionelle Targeting dient der gezielten Infektion maligner Tumorzellen, um eine möglichst hohe onkolytische Wirkung zu erzielen. Der natürliche Rezeptor (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, CAR) des Adenovirus 5 (Ad5) wird auf Tumorzellen aber nur sehr unzureichend exprimiert (Jee et al., 2002), (Kawashima et al., 2003), (Sakurai et al.,

2007). CAR fungiert zusätzlich als Tumorsuppressorgen und wird in bestimmten Tumorentitäten herunterreguliert (Short et al., 2004). Beim Ovarialkarzinom zeigt sich nur eine geringe Anzahl der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptoren, daher ist eine Infektion mit Ad5 nur sehr begrenzt möglich (Kanerva et al., 2002a), (Rein et al., 2006), (Ingram et al., 2010). Benignes Gewebe von Leber, Lunge, Milz oder Niere exprimiert dagegen eine hohe Anzahl von CAR's (Glasgow et al., 2006). Dies stellt die Verwendung der Adenoviren vor das Risiko von toxischen Nebenwirkungen z.B. an der Leber (Evoy et al., 1997), (Barnett et al., 2002), (Sharma et al., 2009). Um gleichwohl eine ausreichende Infektionsrate der Zieltumorzellen zu erreichen und gleichzeitig die toxischen hepatischen Nebenwirkungen zu reduzieren, ist eine Veränderung des Tropismus vonnöten (Rein et al., 2005). Auf Ovarialkarzinomzellen werden Ad3-Rezeptoren in einer großen Anzahl exprimiert (Kanerva et al., 2002a). Um eine bessere Bindung zwischen Adenovirus und Ovarialkarzinomzelle zu erreichen, wurde eine Fiber-Knob-Domäne des Adenovirus vom Serotyp 5 durch ein Fiber-Knob des Adenovirus vom Serotyp 3 ersetzt (Kanerva et al., 2002b), (Tsuruta et al., 2007). Die Ad5/3 modifizierten Vektoren können signifikant höhere Transduktionsraten bei Ovarialkarzinomzellen mit herabgesetzter CAR-Expression erzielen als Ad5-Vektoren (Kanerva et al., 2002b), (Hall et al., 2009). Eine Veränderung der Länge und der Flexibilität der Fiber-Shaft-Domäne kann die Interaktion zwischen Adenovirus und Tumorzelle beeinflussen. Gezeigt wurde dies in der Gentherapie des Ovarialkarzinoms, da durch diese modifizierte Shaft-Domäne der Lebertropismus adenoviraler Vektoren reduziert werden kann (Breidenbach et al., 2004).

1.4.4.2 Transkriptionelles Targeting

Das transkriptionelle Targeting ermöglicht eine adenovirale Tumorselektivität. Hierbei werden genetische Steuerelemente (Promotoren) genutzt, um die adenovirale Replikation auf Tumorzellen zu beschränken. In Tumorzellen findet sich oftmals eine Hochregulation vieler Gene, die in normalem oder gesundem Gewebe nicht zu finden ist. Die Promotoren dieser im Tumorgewebe hochregulierten Gene können als tumorspezifische Promotoren (TSP) für die Steuerung der onkolytischen Adenoviren genutzt werden (Cody and Douglas, 2009). Dafür wird ein tumorspezifischer Promotor vor frühe virale Gene (E1A, E1B) geschaltet, die essentiell für die virale Replikation in der Wirtszelle sind. Die Virusreplikation ist abhängig von der Aktivität des Promotors in der infizierten Wirtszelle, somit eignen sich tumorspezifische Promotoren, da diese im gesunden Gewebe keine Aktivität und im Tumorgewebe eine sehr starke Aktivität aufweisen (Wong et al., 2010). Dadurch

können toxische Nebenwirkungen reduziert werden. In vergangenen Untersuchungen konnte für die Therapie des Ovarialkarzinoms der *Secretory Leucoprotease Inhibitor-Promotor* (SLPI-Promotor) (Rein et al., 2005), der Mesothelin-Promotor (MSLN-Promotor) (Breidenbach et al., 2005), (Tsuruta et al., 2007), der Cyclooxygenase2-Promotor (COX2-Promotor) (Bauerschmitz et al., 2006) und der Alpha Chemokin Rezeptor-Promotor (CXCR4-Promotr) (Rocconi et al., 2007) identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das SLPI-Gen in Tumorproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gegenüber gesundem epithelialen Ovarialgewebe 60-fach überexprimiert wird (Hough et al., 2000), (Hough et al., 2001). Beim MSLN-Promotor handelt es sich um ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das in verschiedenen Tumortypen wie Ovarialkarzinomen, Mesotheliomen und einigen Plattenepithelkarzinomen überexprimiert wird. Im Normalgewebe findet sich keine Expression. Das COX2-Gen kodiert das Enzym Cyclooxygenase2, welches unter physiologischen Bedingungen nicht in Geweben nachweisbar ist. In Ovarialkarzinomzellen zeigt sich dagegen eine starke Expression dieses Enzyms. Im Falle des chemoresistenten Ovarialkarzinoms konnte der *Multiple Drug Resistance Promotor* (MDR1-Promotor) identifiziert werden. Dieser ist ein induzierbarer Promotor, das bedeutet, dass eine niedrige basale Aktivität in Ovarialkarzinomzellen vorliegt und eine Zytostatikatherapie zu einer verstärkten Genexpression führen kann (Abolhoda et al., 1999), (Kuo, 2009). Nach einer Behandlung mit Anthrazyklinen oder Taxanen zeigt sich eine erhöhte MDR1-Expression (erhöhte p-Glykoprotein Synthese), wodurch die bei einem Rezidiv erneut eingesetzten Chemotherapeutika vermehrt aktiv aus der Tumorzelle heraustransportiert werden (Miller and Ojima, 2001), (Schondorf et al., 2003), (Martirosyan et al., 2010). Dieser MDR1-Promotor scheint ein sehr guter und vielversprechender Kandidat für die Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms zu sein. Der Ansatz erlaubt es, gezielt Ovarialkarzinomzellen zu eliminieren.

1.5 Das Ad5/3MDR1E1

In der vorliegenden Arbeit wurden konditional replizierende Adenoviren verwendet, die verschiedene Targeting-Strategien in sich vereinen.

1.5.1 5/3 Fiberchimerisierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die onkolytische Potenz der replikationskompetenten Adenoviren von der Infektionsrate der malignen Tumorzellen abhängig ist (Douglas et al., 2001), (Van Geer et al., 2010). In dieser Arbeit wurden CRAbs verwendet, die auf dem

Serotyp 5 basieren, deren Chimäre aber die Knob-Domäne des Adenovirus des Serotyps 3 tragen (Kanerva and Hemminki, 2004). Somit kommt es zu einer CAR unabhängigen Transduktion. Durch diese fibermodifizierten Adenoviren kann der Gentransfer in Ovarialkarzinomzellen nachweislich um den Faktor 300 gesteigert werden (Kanerva et al., 2002a). Ebenfalls konnte bereits bewiesen werden, dass die chimären Ad5/3-Vektoren den Ad5-basierenden Vektoren sehr stark ähneln, somit konnte ihre Verwendung in der weiteren Forschung als sicher eingeschätzt werden (Rein et al., 2005), (Dias et al., 2010).

1.5.2 MDR1-Promotor

Unter einer Primärtherapie des Ovarialkarzinoms oder auch bei Ovarialkarzinomrezidiven findet sich vermehrt eine MDR1 assoziierte Zytostatikaresistenz der Tumorzellen (Schondorf et al., 2002), (Hille et al., 2006). Im direkten Vergleich zwischen benignem Ovarialgewebe und malignem Ovarialtumorgewebe konnte gezeigt werden, dass bei unbehandeltem Ovarialkarzinomgewebe eine höhere MDR1-Expressionsrate vorliegt (Arao et al., 1994), (Cheng et al., 2000), (Auner et al., 2010). Somit wird MDR1 als ein wichtiger Promotor in der Therapie des Ovarialkarzinoms mittels CRAbs angesehen. In *in vitro* Versuchen mit MDR1 gesteuerten Adenoviren konnten bereits erfolgreiche Ergebnisse verzeichnet werden. In Zytotoxizitätsassays wurde ein stärkerer onkolytischer Effekt mittels MDR1-Promotor assoziierten Adenoviren hervorgerufen als mit Vergleichsviren (Bauerschmitz et al., 2008). Um diese Effektivität *in vivo* nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit in einem *in vivo* Mausmodell CRAbs verwendet, denen der MDR1-Promotor vor das frühe virale Gen E1A geschaltet wurde. Daraus folgt eine Virusreplikation in Zellen mit einer hohen MDR1-Expression, in diesem Fall den Ovarialkarzinomzellen. Eine basale Expression des MDR1-Gens findet sich besonders in der Leber und der Niere (Cordon-Cardo et al., 1990), (Yoshikawa et al., 2004), (Israeli et al., 2005), (Liu et al., 2010), deshalb ist eine für das maligne Tumorgewebe gezielte Virusinfektion wichtig.

1.5.3 Tumorspezifische E1A Deletion

Zusätzlich zum transkriptionellen und transduktionellen Targeting kann durch eine genetische Veränderung der essentiellen Virusgene die Tumorspezifität der CRAbs gesteigert werden. Diese Veränderung stellt einen weiteren zusätzlichen Sicherheitsmechanismus dar, um die virale Replikation auf maligne Tumorzellen zu reduzieren. Diese Veränderung kann durch eine $\Delta 24$ -Deletion in der CR2-Region des E1A-Gens erfolgen. Dabei werden acht Aminosäuren aus dem E1A-Genprodukt entfernt (Fueyo et al., 2000). Das E1A-Protein des Wildtypvirus bindet ohne vorherige Deletion an das Retinoblastom-Protein (Rb1) und induziert somit die S-Phase mit folgender Zellproliferation und Virusreplikation. Erfolgt die 24 Basenpaar-Deletion aus dem E1A-Gen, wird die Bindungsstelle für das Rb1-Protein entfernt: Es kann zu keiner Bindung zwischen Adenovirus und benignen Zelle kommen, und es wird auch kein Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase induziert. Da die Zellzyklusprogression jedoch essentiell für die Virusvermehrung ist, wird die Virusreplikation damit in benignen Wirtszellen verhindert. In malignen Tumorzellen ist dieser Rb-Pathway oftmals defekt, so dass die Zellproliferation unabhängig von der Rb-vermittelten

Zellzykluskontrolle erfolgen kann (D'Andrilli et al., 2004), (Wong et al., 2010). Daher können die $\Delta 24$ -deletierten CRAbs in diesen malignen Tumorzellen replizieren (Fueyo et al., 2000). Durch diese gezielte Deletion des E1A-Gens kann eine Replikationsabhängigkeit von einem defekten Rb-Pathway geschaffen und somit die Replikation der CRAbs auf maligne Tumorzellen reduziert werden. Aufgrund der guten Ergebnisse in Sicherheit und Effizienz wird die $\Delta 24$ -Deletion der CRAbs als ein weiterer Sicherheitsmechanismus im Bereich der Gentherapie von malignen Tumoren verwendet (Rocconi et al., 2007), (Dias et al., 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

Maligner Ascites ist ein klinisch relevantes und schwer zu behandelndes Symptom bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Ein neuer Therapieansatz in der medikamentösen Behandlung dieser Erkrankung ist der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab. Bevacizumab ist in der Therapie unterschiedlicher Malignome bereits fest etabliert. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unterschiedliche Applikationsmodi von Bevacizumab bei Ovarialkarzinompatientinnen mit malignem Ascites zu untersuchen. Hierzu wurde in einem Ovarialkarzinom – Mausmodell die intravenöse mit der intraperitonealen Applikation, sowohl in Form einer Monotherapie, als auch in Kombination mit Zystostatika miteinander verglichen.

Ein 2. Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung synergistischer Effekte einer antiangiogenen Therapie mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab und einer Krebsgentherapie mit konditional replizierenden Adenoviren (CRAds). Das Wirkprinzip von CRAds ist die selektive Virusreplikation in der Tumorzelle mit nachfolgender Onkolyse. Die selektive Replikation wird gesteuert mittels transkriptionalem Targeting unter Einsatz tumorspezifischer Promotoren. In der vorliegenden Arbeit wurde das CRAd über den korrespondierenden Promotor des MDR1-Gens gesteuert. Das MDR1-Gen ist das bedeutendste Resistenzgen des Ovarialkarzinoms und verantwortlich für die rasche Zystostatikaresistenz von Ovarialkarzinomzellen nach Zystostatikaapplikation. Durch die selektive Steuerung der Replikation des onkolytischen Adenovirus über den MDR1-Promotor eignet sich dieses gentechnisch hergestellte Virus in besonderer Weise zur Behandlung zystostatikaresistenter Ovarialkarzinomzellen. Dies konnte in Voruntersuchungen bereits *in vitro* gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, synergistische Effekte zwischen einer MDR1-gesteuerten Krebsgentherapie und Zystostatika bzw. einer anti-VEGF-Antikörpertherapie zu untersuchen. Eine derartige Untersuchung liegt bislang nicht vor. Die Untersuchungen wurden durchgeführt an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell mit Peritonealkarzinose. Um einen Hinweis auf die klinische Anwendbarkeit zu erhalten, wurden zusätzlich Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Für den Tierversuch wurden die humanen Tumorzellen der Zelllinie SKOV3ip verwendet, um ein gutes intraperitoneales Anwachsen der Tumorzellen zu ermöglichen. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SKOV3ip ein verstärktes invasiveres intraperitoneales Wachstum aufzeigen konnte als die Zelllinie SKOV3 (Bai et al., 2006).

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (Vol. 550 ml, Cellstar, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gezüchtet. Um ein optimales Wachstumsmilieu zu erreichen, wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen im Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium (RPMI Media 1640, Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde zunächst mit L-Glutamin 20 mM (Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland), mit dem Antibiotikum Gentamycin 50 µg/ml (Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) und mit *Foetal Calf Serum* (FCS) 500 ml (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt, der Mediumswechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.

3.2 Subkultivierung der Zellen

Nach Erreichen von Konfluenz wurde eine Subkultivierung durchgeführt. Für das Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gewaschen und anschließend trypsinisiert. Dazu wurden 5 ml Trypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (1:10 mit PBS verdünnt) hinzugefügt und die Kulturflasche für ca. 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Sobald eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu erkennen war, wurde der Ablösevorgang mit Zugabe von 5 ml Kulturmedium beendet. Das im Medium enthaltene *Foetal Calf Serum* (FCS) stoppte den Ablösevorgang indem es das Trypsin inhibierte. Die entstandene Suspension aus Zellen, Medium und Trypsin wurde in ein 15 ml Falconröhrchen (BD Biosciences, New York, USA) überführt und für 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

3.3 Zellzählung

Zur Vorbereitung wurde ein Deckgläschen auf die Neubauer-Zählkammer (Beyer GmbH, Düsseldorf, Deutschland) aufgesetzt, an den Kontaktstellen zeigten sich so genannte „Newtonringe“. Dies war das Zeichen, dass eine korrekte Anheftung vorlag und dass die Tiefe der Zählkammer 0,1 mm betrug. Um die Zellen mittels der Neubauer-Zählkammer zählen zu können, wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gemischt und dann jeweils 10 µl unter jede Seite der Zählkammer pipettiert. Aufgrund der Trypanblaufärbung konnte ein Vitalitätstest der Zellen durchgeführt werden. Geschädigte Zellen nahmen den blauen Farbstoff auf und ließen sich so von den transparent erscheinenden vitalen Zellen unterscheiden. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Zellzahl verwendet:

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

Abbildung 2: Formel zur Berechnung der Zellzahl

3.4 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die sedimentierten Zellen in Gefriermedium (Kulturmedium+ 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) resuspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -20°C gelagert.

3.5 Tierexperiment

Die Tierversuche wurden durchgeführt in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Zuvor erfolgte eine Meldung über die geplanten Versuche an die Bezirksregierung Düsseldorf. Ein Tierversuchsantrag wurde gestellt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 8.87-50.10.37.09.223) genehmigt. Als Experimentatorin absolvierte ich erfolgreich den Versuchstierkudkurs der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Um eine adäquate Durchführung der Experimente zu gewährleisten, wurde ich bei Bedarf von einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf unterstützt. Sie absolvierte ebenfalls erfolgreich den Versuchstierkudkurs der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für die Versuche wurden 130 weibliche SCID (*Severe Combined Immune Deficiency*) Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von der

Firma Taconic (Eiby, Dänemark) bezogen. SCID Mäuse haben aufgrund eines kombinierten B- und T-Zelldefektes eine herabgesetzte humorale und zelluläre Immunität und eignen sich daher besonders für die Untersuchung humaner Karzinome. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere 6 Wochen alt und wogen jeweils ca. 20 g.

3.5.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Im S2 Labor der Tierversuchsanstalt Düsseldorf herrschten für den gesamten Zeitraum standardisierte Bedingungen mit 22 +/- °C Raumtemperatur, 55 +/- % relative Luftfeuchtigkeit und Kunstlichtbeleuchtung ca. 320 Lux in 1 Meter Höhe mit einem 12/12 Rhythmus. Die Mäuse wurden für die Zeit des Versuches in offenen Makrolonkäfigen gehalten. Als Einstreu wurde unbehandeltes Weichholzgranulat genutzt. Als ad libitum Nahrung für die Tiere wurden ca. 8 mm große unbehandelte Würfel Trockenfutter verwendet. Das ad libitum Tränkwasser wurde mit Ozon angereichert, entchlort und zur Keimabtötung zudem bestrahlt. Die Käfige wurden einmal wöchentlich von den Tierpflegern der Tierversuchsanstalt Düsseldorf gesäubert und mit frischer Einstreu ausgelegt. Aufgrund der besonderen Immundefizienz der SCID Mäuse, wurde von den Experimentatoren und dem Tierpflegepersonal spezielle Schutzkleidung getragen. Zu Beginn der Versuche wurden die Mäuse in 13 Gruppen randomisiert.

3.5.2 Tumorzellen

Die Kultivierung und Subkultivierung der Zellen fand im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Universität Düsseldorf statt. Für die Kultivierung der Zellen wurden Zellkulturflaschen mit einem Volumen von 550 ml verwendet. Zeitgerecht ausgesät konnten für Therapie 1 und Therapie 2 jeweils 2×10^7 Zellen/ Flasche aus 45 Flaschen geerntet werden. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert. Für die Injektion wurden je 1×10^7 Zellen in 500 µl Kulturmedium in 1ml Tuberculin-Spritzen (B.Braun, Melsungen, Deutschland) aufgezogen.

3.5.3 Aufbereitung der Pharmazeutika

Die verwendeten Medikamente wurden am jeweiligen Tag der Injektion aus der Zentralapotheke der Universitätsklinik der Universität Düsseldorf abgeholt. Bevacizumab lag als 100mg/4ml Injektionslösung vor (Roche, Basel, Schweiz). Die Standarddosierung von Bevacizumab liegt bei 10mg/kg Körpergewicht. Die Berechnung für den Versuch ergab eine Dosierung von 10µg/g Körpergewicht/Maus. Das Körpergewicht der Mäuse lag zu Beginn

der Versuche bei ca. 20 g. Der Antikörper wurde 1:5 mit Aqua dest. (B.Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt, in sterile 1 ml Tuberculin-Spritzen aufgezogen und bis zum Injektionszeitpunkt auf Eis gelagert. Paclitaxel lag als 6 mg/ml Injektionslösung vor (Neocorp AG, Weilheim, Deutschland). Die Standarddosierung von Paclitaxel beträgt 10mg/kg Körpergewicht. Die Berechnung für den Versuch ergab ebenfalls eine Dosierung von 10µg/g Körpergewicht/Maus. Paclitaxel wurde 1:15 mit Natriumchlorid (NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnt und in sterile 1ml Tuberculin-Spritzen aufgezogen. Novantrone lag als 2mg/ml Injektionslösung vor (Baxter Oncology GmbH, Halle, Deutschland). Die Standarddosierung von Novantrone beträgt 1mg/kg Körpergewicht. Die Berechnung für den Versuch ergab eine Dosierung von 1µg/g Körpergewicht/Maus. Novantrone wurde 1:50 mit Natriumchlorid verdünnt, in sterile 1 ml Tuberculin-Spritzen aufgezogen und bis zum Injektionszeitpunkt auf Eis gelagert.

3.6 Verwendete Adenoviren

Das replikationsdefiziente Adenovirus Ad5MDRluc und das fiberchimerisierte Adenovirus Ad5/3MDR1E1 wurden freundlicherweise von Prof. Curiel (University of Birmingham, Alabama, USA) zur Verfügung gestellt. Da die Viren bei -20°C lagerten, wurden sie kurz vor der Injektion in einem mit Eis gefüllten Styroporbehälter bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Verdünnung erfolgte gemäß der Virentiter mit sterilem Natriumchlorid, so dass 10^9 Viruspartikel (VP)/ml NaCl vorlagen. Zur Injektion wurden sterile 1ml Tuberculin-Spritzen mit je 5×10^8 VP/500µl Natriumchlorid aufgezogen und bis zur Injektion auf Eis gelagert. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer Verabreichung von 1×10^{12} VP bei einer 60 kg schweren Patientin keine dosislimitierenden Nebenwirkungen zu erwarten sind (Bauerschmitz et al., 2002b). Von den in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren, Ad5/3MDR1E1 und Ad5MDRluc, wurde gemäß der Umrechnung für jede Injektion eine Dosis von jeweils 5×10^8 Viruspartikel verwendet.

3.7 Experimentelles Design

Vor Beginn der Versuche wurden die Mäuse randomisiert auf Gruppen verteilt. Tabellen 1 und 2 zeigen die Behandlung der 13 verschiedenen Gruppen.

Tabelle 1: Untersuchung der Effizienz einer intravenösen versus intraperitonealer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab

Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Bevacizumab					
Gruppe		Tag 1	Tag 10	Tag 11	Tag 15
1	Negativkontrolle	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen			
2	Bevacizumab i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevacizumab 10µg/g		
3	Bevacizumab i.v.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevacizumab 10µg/g		
4	Paclitaxel i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen		Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g
5	Bevacizumab i.p. + Paclitaxel i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevacizumab 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g
6	Bevacizumab i.v. + Paclitaxel i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevacizumab 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g

Tabelle 2: Untersuchung einer Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab

Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab						
Gruppe		Tag 1	Tag 10	Tag 11	Tag 15	Tag 16
7	Ad5MDRIuc i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen				Ad5 MDR1uc
8	Paclitaxel i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen		Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	
9	Ad5/3MDR1E1 i.p.	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen				Ad5/3MDR1E1
10	Novantrone i.p. + Ad5/3MDR1E1	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen		Novantrone 1µg/g	Novantrone 1µg/g	Ad5/3MDR1E1
11	Paclitaxel i.p. + Ad5/3MDR1E1	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen		Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	Ad5/3MDR1E1
12	Novantrone + Bevacizumab i.p. + Ad5/3MDR1E1	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevaci- zumab 10µg/g	Novantrone 1µg/g	Novantrone 1µg/g	Ad5/3MDR1E1
13	Paclitaxel + Bevacizumab i.p. + Ad5/3MDR1E1	SKOV3ip 1x10 ⁷ Zellen	Bevaci- zumab 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	Paclitaxel 10µg/g	Ad5/3MDR1E1

Am Tag 1 wurde allen 130 Mäusen SKOV3ip Ovarialtumorzellen (1x10⁷Zellen) intraperitoneal verabreicht. Vor der Injektion wurde der Bauch mittels Hautantiseptikum (Kodan, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert, um eine mögliche Infektion durch die Injektion zu verhindern. Die Injektion erfolgte mittels steriler 1ml Tuberculin-Spritzen und Kanülen mit dem Gauge-Wert 23 G (Smith's Medical, St.Paul, USA) in den linken Unterbauch der Mäuse. Für alle weiteren Injektionen wurden sterile 1ml Tuberculin-Spritzen und Kanülen mit dem Gauge-Wert 26 G (Smith's Medical, St.Paul, USA) genutzt. Am Tag 10 wurde den Gruppen 2, 5, 12 und 13 pro Maus jeweils 10µg/g Körpergewicht Bevacizumab i.p. injiziert. Die Gruppen 3 und 6 erhielten ebenfalls 10µg/g Körpergewicht Bevacizumab, aber diesen beiden Gruppen wurde der VEGF-Antikörper über die Schwanzvene i.v. verabreicht. Dafür wurden die Mäuse einzeln in eine Injekti-

onsröhre gesetzt, um sie sicher zu fixieren. Die Injektion erfolgte nach einer Wärmebestrahlung der Schwanzvene mittels einer Rotlichtlampe. Durch die Wärmebehandlung dilatierte die Vene, so wurde die intravenöse Injektion vereinfacht. Am Tag 11 wurde den Gruppen 4, 5, 6, 8, 11 und 13 pro Maus 10µg/g Körpergewicht Paclitaxel i.p. injiziert. Am gleichen Tag wurde den Gruppen 10 und 12 1µg/g Körpergewicht Novantrone intraperitoneal verabreicht. Am Tag 15 wurde den Gruppen 4, 5, 6, 8, 11 und 13 erneut 10µg/g Körpergewicht Paclitaxel intraperitoneal injiziert. Die Gruppen 10 und 12 erhielten am Tag 15 1µg/g Körpergewicht Novantrone intraperitoneal gespritzt. Am Tag 16 erfolgte die Beimpfung der Gruppe 7 mit dem Virus Ad5MDRluc. Die Gruppen 9, 10, 11, 12, 13 erhielten am gleichen Tag das Virus Ad5/3MDR1E1, jeweils 5×10^8 Viruspartikel in 500µl Natriumchlorid gelöst, intraperitoneal.

An den folgenden 120 Tagen wurden die Mäuse täglich beobachtet und inspiziert. Dabei wurde unter anderem das allgemeine Wohlbefinden der Tiere beurteilt. Zeigten sich Zeichen einer Dyspnoe, einer starken Kachexie und/oder ein Gewichtsverlust >15%, so wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Zielparameter waren die Untersuchung der Überlebenszeit nach Implantation der Tumore, sowie das Gewicht und der Bauchumfang, um die Aszitesmenge zu evaluieren.

3.8 Probenentnahme bei den Mäusen

Nach 120 Tagen Beobachtungszeit wurden alle noch nicht verstorbenen Tiere mittels cervikaler Dislokation getötet, um das Experiment zu beenden. Die Sektion der Tiere fand unter einer sterilen Reinraumwerkbank (Clean Air, Hilden, Deutschland) der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf statt, die Probenentnahme erfolgte bei allen Tieren in gleicher Weise. Zunächst wurde mittels einer digitalen Waage das Körpergewicht der Mäuse ermittelt. Außerdem wurde mit Hilfe einer Schublehre der Bauchumfang der Tiere von anterior nach posterior und von lateral nach lateral gemessen, um anschließend die Sektion durchzuführen. Bei den meisten Tieren lag ein blutiger Aszites vor, dieser wurde in sterile 1,5 ml Eppendorf-Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Konnte bei der Inspektion des Abdomens ein Tumor festgestellt werden, so wurde er entnommen und in gepuffertem Formalinaldehyd 4% (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufbewahrt. Bei allen Tieren wurde zudem die Leber entnommen und in gepuffertes Formalinaldehyd 4% überführt. Die Tumor- und Leberpräparate konnten für die H&E-Färbungen

und immunhistochemischen Untersuchungen genutzt werden. Abbildungen 3 bis 5 zeigen exemplarisch den Situs von Mäusen der verschiedenen Behandlungsgruppen.

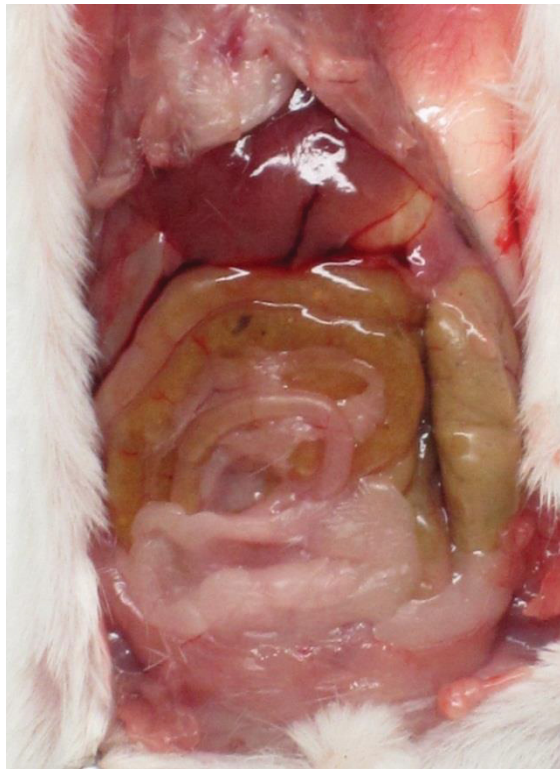


Abbildung 3: Maus aus der Kontrollgruppe K, kein Tumorwachstum, kein Aszites



Abbildung 4: Maus mit blutigem Aszites und intraperitonealem Tumor (Gruppe 1)

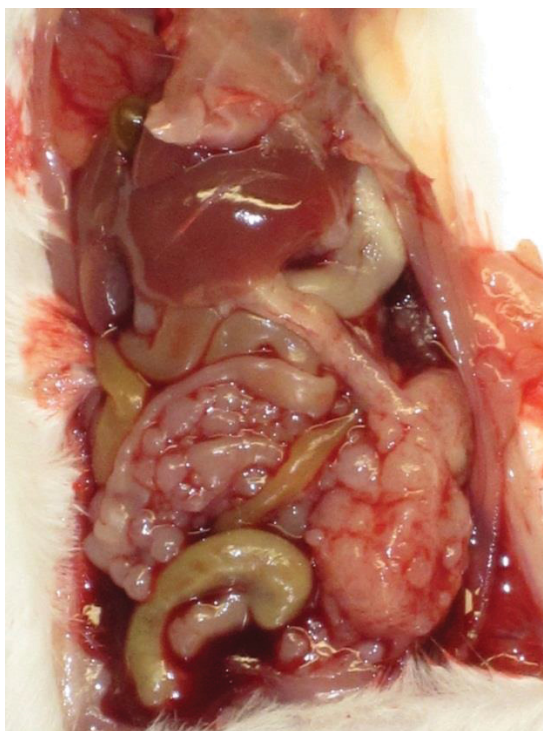


Abbildung 5: Maus mit intraperitonealem Tumorwachstum und blutigem Aszites (Gruppe 3)

3.8.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Standardkulturmedium RPMI 1460	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin 20 mM	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin 50 µg/ml	Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Foetal Calf Serum</i> (FCS), 500 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsinlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formaldehyd (4% gepuffert pH 6,9)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
SKOV3ip	Prof. David Curiel, Gene Therapy Center University of Birmingham, Birmingham, Alabama, USA
Bevacizumab	Roche, Basel, Schweiz
Paclitaxel	Neocorp AG, Weilheim, Deutschland
Novantrone	Baxler Oncology GmbH, Halle, Deutschland
Ad5MDRluc Ad5/3MDR1E1	Prof. David Curiel, Gene Therapy Center University of Birmingham, Birmingham, Alabama, USA
Kodan Hautantiseptikum	Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

Materialien und Geräte	Hersteller
Gewebekulturflaschen 250 ml, 550 ml	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten	Costar Stripette, Corning, New York, USA
Sterile Einmalpipetten 5 ml, 10 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon- Tubes 5 ml, 15 ml, 50 ml	BD Biosciences, New York, USA
Tuberkulinspritzen 1ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen 23G, 26G	Smith's Medical, St.Paul, USA
Eppendorf-Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Histosette II	Les Plastiques Simport Plastics, Beloeil, Canada
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Lauda DR. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Berner Latex Schutzhandschuhe	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Beyer GmbH Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop	Wilovert, Wetzlar, Deutschland
Steril Bank	Clean Air, Hilden, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge1.0, Heraeus, Deutschland
Reinraumwerkbank	Clean Air, Hilden, Deutschland
Digitale Waage	Leifheit AG, Nassau, Deutschland
Schublehre	Famex, Remscheid, Deutschland
Digitalkamera	Canon IXUS 100 IS, Tokyo, Japan

3.9 H&E-Färbung und Immunhistochemie

Die zu untersuchenden Gewebe (Tumoren und Lebern) wurden nach der Entnahme in Formalinaldehyd 4% fixiert. Dann wurden diese Proben in Histosetten II (Les Plastiques Simport Plastics, Beloeil, Canada) umgebettet, um sie im Entwässerungsautomaten (Citadel 2000, Skandon, Frankfurt am Main, Deutschland) zu entwässern. Anschließend wurden die Gewebestücke auf einer Gießstation in Paraffin eingebettet. Nach Durchhärtung der Paraffinblöcke mußten diese auf einer Kühlplatte auf -20°C heruntergekühlt werden, um die Härte für ein verbessertes Schneiden zu erhöhen. Mittels Rotationsmikrotom (Jung RM 2045, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden von jedem Paraffinblock 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden zunächst in ein Wasserbad (Aqua dest.) überführt und anschließend auf Glasobjektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezogen. Das zwischen Deckglas und Gewebeschnitt eingeschlossene Wasser war zu entfernen, indem der Glasobjektträger auf eine Wärmeplatte gelegt wurde. Für die immunhistochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Complex Methode wurden repräsentative Einzelschnitte über Nacht bei 56°C in einem Inkubationsschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) gelagert, in den letzten 10 Minuten wurde die Temperatur auf 100°C erhöht.

3.9.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Für eine Übersichtsfärbung der Präparate wurde eine H&E Färbung (Hämatoxylin-Eosin Färbung) durchgeführt. Bei diesem Färbeverfahren werden durch zwei unterschiedliche Einzelfärbungen verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt. Der erste Farbstoff ist Hämatoxylin und stammt aus dem Blauholzbaum. Nach Aufbereitung entsteht Hämalan mit seiner Färbeeigenschaft. Besonders saure, basophile Strukturen (Zellkerne mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) und raues Endoplasmatisches Retikulum (rER)) werden durch Hämalan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Eosin stellt einen synthetischen Farbstoff dar. Mit seiner sauren Eigenschaft färbt er alle basischen, acidophilen Strukturen (Zellplasmaproteine) rot an.

Die Objektträger mit den Präparateschnitten wurden für 2x10 Minuten in Xylol (organisches Lösungsmittel) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte durch Lagerung in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5%-96%-80%) (Zentralapotheke, Universitätsklinik Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland) für jeweils 3 Minuten. Darauf folgte die 10 minütige Kernfärbung mit Hämalan. Anschließend wurden

die Objektträger in Leitungswasser gewaschen bis keine Farbwolken mehr sichtbar waren. Da Hämalaun die Zellkerne zunächst rot anfärbt und diese erst in stark saurem Milieu (pH 3) ihre blaue Farbe erhalten, wurden die Objektträger für 10 Minuten in Leitungswasser gelagert. Nach der Bläuung bewirkte eine 1%ige Eosin-Lösung die Färbung des Zytoplasmas. Auf einen Waschvorgang in puffer based saline (PBS) folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 99,5%). Um die Schnitte zu klären, wurde Xylol eingesetzt. Die Untersuchung der eingefärbten Präparate fand mit einem Phasenkontrastmikroskop statt, nachdem sie mittels Eukitt (Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland), einem wasserfreien Einschlussmittel, eingedeckt waren.

3.9.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung diente dazu, den VEGF-Nachweis und das virale Protein E1A im Tumorgewebe und in der Leber der Versuchstiere darzustellen. Diese Methode basiert auf der Bindung von Antikörpern an bestimmte Antigenstrukturen der Zielzelle.

Um die entnommenen Gewebe immunhistochemisch zu färben, wurde die Avidin-Biotin-Complex Methode (ABC-Methode) genutzt. Bei dieser enzymatischen Methode wird das Antigen durch Farbreaktion dargestellt. Als Grundlage dient die hohe Bindungsaffinität zwischen Avidin und Biotin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß isolierbares Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Die Gewebeproben werden mit einem Primärantikörper inkubiert. Dieser bindet mit seinem Fab-Fragment spezifisch an ein Gewebsantigen. Anschließend wird mit einem verdünnten biotinylierten Sekundär-Brücken-Antikörper inkubiert, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Am Fc-Fragment des Sekundärantikörpers befindet sich ein Biotin-Rest und dieser verbindet sich nach Zugabe von einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex mit dem Avidin dieses Komplexes. Nach der Inkubation mit einem Peroxidase-Substrat (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) wird das Antigen durch eine bräunliche Färbung sichtbar. Dabei zerfällt die Peroxidase unter Zugabe von Wasserstoffperoxyd zu Sauerstoff und Wasser, Elektronen für den Enzymzerfall werden vom DAB zur Verfügung gestellt und dabei wird das DAB selbst oxidiert. Diese Oxidation stellt sich als braunes Reaktionsprodukt dar.

Um die Schnitte für die immunhistochemische Färbung vorzubereiten, wurden sie für 25 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5%-96%-80%) für jeweils 3 Minuten hydriert. Darauf folgte ein Waschvorgang in Leitungswasser. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten im Citrat Puffer (pH 6,0) gekocht, um eine Demaskierung zu erreichen. Bei der Formaldehydfixierung kann es nämlich durch eine Vernetzung der Eiweißstrukturen zu einer Epitopstrukturenveränderung kommen. Nachdem die Objektträger wieder Raumtemperatur (RT) erreicht hatten, waren sie in Leitungswasser zu waschen, um den Citrat Puffer zu entfernen.

In Geweben, wie z.B. der Leber, befindet sich eine endogene Peroxidase. Um eine endogene Peroxidaseaktivität während der immunhistochemischen Färbung zu verhindern,

wurden die Proben für 15 Minuten in einer 3% H₂O₂ (Wasserstoffperoxyd) Lösung bei RT inkubiert, womit die endogene Peroxidase zu blockieren war. Nachdem die Objektträger mit PBS gewaschen waren, wurden alle weiteren Schritte der Immunhistochemie in Feuchtkammern bei RT durchgeführt, so dass die Schnitte nicht austrocknen konnten. Normalserum (Vector Laboratories, Burlingame, USA) diente dazu, unspezifische Bindungen zu verhindern. Hierfür wurden die Schnitte für 30 Minuten bei RT mit Normalserum inkubiert. Das verwendete Serum muss von einem Tier der gleichen Spezies stammen wie der biotinylierte Zweitantikörper. Nach Abklopfen des überschüssigen Serums fand die Inkubation mit dem Ad-E1A spezifischen, polyklonalen IgG Primärantikörper aus dem Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) für 45 Minuten bei RT statt. Nach Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame, USA) im Überschuss für 30 Minuten bei RT. Das nach Herstellerangaben zubereitete ABC Reagenz (Avidin und biotinylierte Meerrettich-Peroxidase) (Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurde für 30 Minuten bei RT gelagert und nach einem erneuten Waschschrift mit PBS für 30 Minuten aufgetragen. Nach abermaligem Waschen mit PBS fand die Inkubation mit dem DAB Peroxidase Substrat (SkyTec, Logan, Utah, USA) für 5 Minuten bei RT statt. Nach einem erneuten Waschschrift waren die Zellkerne mit Hämalaun gegenzufärben. Hierfür wurden die Objektträger für 2-3 Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend in Leitungswasser gewaschen, bis keine Farbwolken mehr sichtbar waren. Da Hämalaun die Zellkerne zuerst rot anfärbt und diese erst in stark saurem Milieu (pH 3) ihre blaue Farbe erhalten, war es erforderlich, die Objektträger für 10 Minuten in Leitungswasser zu lagern. Um die Präparate möglichst vollständig zu entwässern, wurden diese einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-80%-96%-99,5%) ausgesetzt. Xylol diente anschließend dazu, die Präparate zu klären. Mit Eukitt wurden die Schnitte für die mikroskopische Untersuchung eingebettet. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte ließen sich mittels IRS Score (Immunreaktiver Score) nach Remmele und Stegner (1987) auswerten (Tabelle 4). Hierbei werden die Werte für die Farbintensität der Zellkernfärbung (0-3 Punkte) und der Prozentsatz der positiven Zellen (0-4 Punkte) miteinander multipliziert, wobei für die Farbintensität der vorherrschende Intensitätsgrad ausschlaggebend ist. IRS Score 0-2 = negativ; IRS Score ≥ 3 = positiv.

Tabelle 4: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner 1987

	Keine Farbreaktion 0 Punkte	Schwache Farbreaktion 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion 2 Punkte	Starke Farbreaktion 3 Punkte
Keine positiven Zellkerne 0 Punkte	IRS= 0	IRS= 0	IRS= 0	IRS= 0
<10% positive Zellkerne 1 Punkt	IRS= 0	IRS= 1	IRS= 2	IRS= 3
10-50% positive Zellkerne 2 Punkte	IRS= 0	IRS= 2	IRS= 4	IRS= 6
51-80% positive Zellkerne 3 Punkte	IRS= 0	IRS= 3	IRS= 6	IRS= 9
>80% positive Zellkerne 4 Punkte	IRS= 0	IRS= 4	IRS= 8	IRS= 12

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* VEGF findet sich überwiegend im nuklearen Bereich der malignen Tumorzellen, so dass bei einer braunen Anfärbung des nuklearen Bereichs ein positiver VEGF-Nachweis gezeigt werden kann. Eine blaue Kernfärbung zeigt keinen VEGF-Nachweis und wird somit als negativ gewertet. Aufgrund der daraus resultierenden geringen Fallzahl konnte der IRS Score nicht statistisch ausgewertet werden. Die Ergebnisse repräsentativer Schnitte wurden deskriptiv bewertet.

3.9.2.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Vectastain-ABC-Peroxidase-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Primärantikörper Ad-2/5 E1A (13S-5):sc-430	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
Anti-Mouse IgG biotinylierter Sekundär-AK	Vectastain ABC- Peroxidase Kit
Normalserum (Horse Normal Serum)	Vectastain ABC- Peroxidase Kit
3% Wasserstoffperoxyd	Selbsterstellung aus Stammlösung
DAB (3,3 Diaminobentidin- Tetrahydrochlorid)	SkyTec, Logan, USA
Mayers Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
absteigende Alkoholreihe (99,5%, 96%, 80%) aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80% 96%, 99,5%)	Zentralapotheke, Universitätsklinik Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Einschlussmittel Eukitt	Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland
PBS Puffer	Selbsterstellung aus Stammlösung
Citrat Puffer	Selbsterstellung aus Stammlösung

Materialien und Geräte	Hersteller
Entwässerungsautomat	Citadel 2000, Skandon, Frankfurt am Main, Deutschland
Mikroskop	Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eindeckgläser	Engelbrecht, Engermünde, Deutschland
Rotationsmikrotom	Jung RM 2045, Leica, Wetzlar, Deutschland
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland

Citrat Puffer: Stammlösung (MERCK) 10x konzentriert:

21 g Zitronensäure Monohydrat auf 1000 ml Aqua dest.

pH 6.0 mit 2N NaOH eingestellt

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

PBS Puffer: Stammlösung (MERCK) 10x konzentriert:

80 g NaCl,

2 g KCl,

5,71 g Na₂HPO₄,

2 g KH₂PO₄

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

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

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

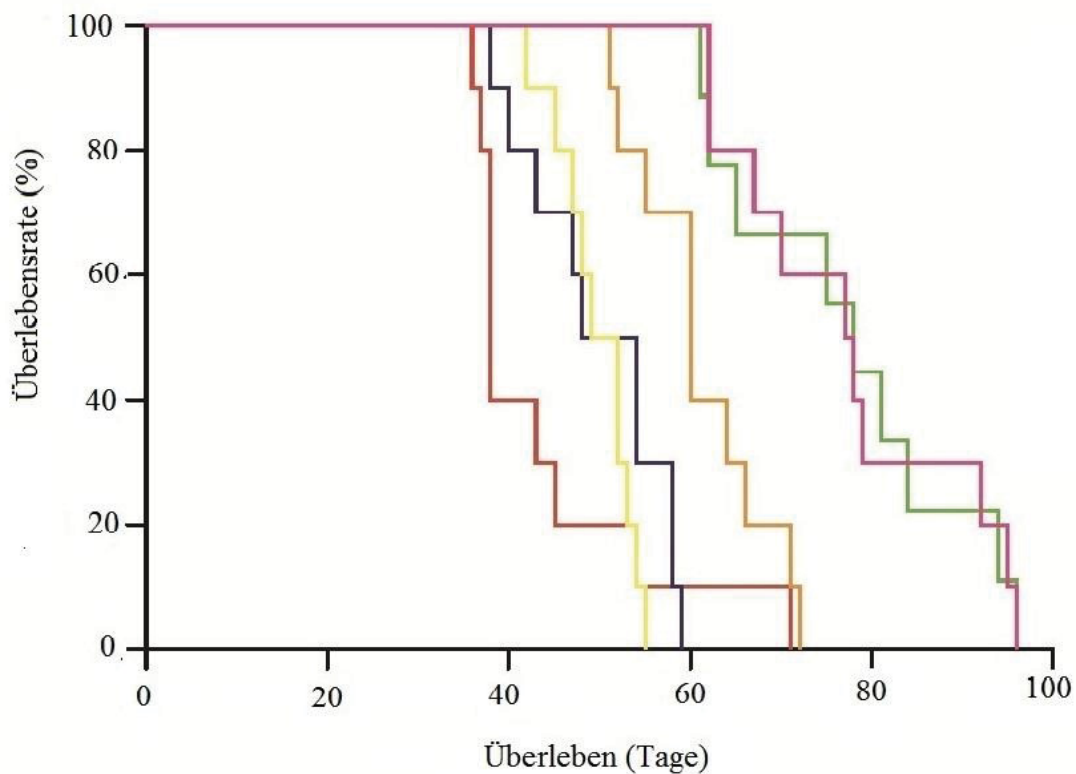
4 Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit wurde an einem *in vivo* Mausmodell der Einfluss der Applikationsart auf die antitumorale Wirkung des VEGF-Antikörpers Bevacizumab untersucht (Therapie 1). Die Versuche dienten dazu, die Effektivität der Reduktion des malignen Aszites zwischen der intravenösen (i.v.) und der intraperitonealen (i.p.) Verabreichung von Bevacizumab zu vergleichen. Zusätzlich wurde geprüft, ob die bisher *in vitro* getestete Effizienz einer MDR gesteuerten Adenoviralen Gentherapie beim Ovarialkarzinom sich *in vivo* verifizieren lässt. Bei bereits durchgeführten *in vitro* Versuchen zeigten sich synergistische Effekte einer Zytostatikatherapie und Adenoviraler Gentherapie. Die Untersuchung des Effektes einer kombinierten Chemo-, Gen- und Antikörpertherapie wurde in einem Tiermodell (Mausmodell; immundefiziente SCID Mäuse) durchgeführt, da die Transduktionseffizienzen *in vivo* von denen bei *in vitro* Experimenten deutlich abweichen können (Therapie 2). Untersucht wurden die Überlebenszeit, das Gewicht, der Querschnitt des Abdomens, die Aszitesmenge, die Tumorselektivität der CRAds und die onkolytische Potenz der Therapie.

4.1 Ergebnisse der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Bevacizumab

4.1.1 Überlebensdauer

Um die Wirksamkeit der Therapie, einer anti-VEGF und Zytostatikatherapie, in Bezug auf die Überlebenszeiten der Mäuse zu untersuchen, wurden verschiedene Behandlungsgruppen miteinander verglichen. Die Abbildung 6 zeigt die Überlebensrate der Gruppen 1-6. In den Gruppen 1-6 der Kombinationstherapie, bestehend aus Paclitaxel und Bevacizumab, betrug das mediane Überleben 38, 51, 50,5, 60, 78 und 77,5 Tage. Aussagen zur unterschiedlichen Effizienz einer intraperitonealen (Gruppe 2) versus einer intravenösen (Gruppe 3) Injektion des Antikörpers Bevacizumab hinsichtlich der Überlebensdauer, lassen sich aufgrund der Versuchsergebnisse mit einem medianen Überleben von 51 Tagen bei i.p. Injektion und 50,5 Tagen bei i.v. Injektion nicht treffen. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied im medianen Überleben bei intraperitonealer Antikörperinjektion in Kombination mit Paclitaxel i.p. (Gruppe 5) mit 78 Tagen zu intravenöser Antikörperinjektion in Kombination mit Paclitaxel i.p. (Gruppe 6) mit 77,5 Tagen. In der Gruppe ohne Therapie (Gruppe 1) kam es dagegen zur kürzesten medianen Überlebensdauer von 38 Tagen. Im paarweisen Vergleich der Überlebensdauer wurden alle Gruppen einzeln mit der Gruppe verglichen, die keine Therapie erhalten hat (Gruppe 1). Es zeigte sich für die Gruppen mit der Kombinationstherapie Bevacizumab i.p. oder i.v. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 5 und Gruppe 6) ein signifikant längeres Überleben als für die Mäuse ohne Therapie (Gruppe 1) ($p\text{-Wert} \leq 0,001$). Nach einer Therapie mit Bevacizumab i.p. (Gruppe 2), Bevacizumab i.v. (Gruppe 3) oder Paclitaxel i.p. (Gruppe 4) zeigte sich im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren ein ebenfalls signifikant verlängerter Überlebenszeitraum ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Das Überleben kann durch eine Kombinationstherapie im Vergleich zu einer Monotherapie verlängert werden ($p\text{-Wert} \leq 0,001$). Kein signifikanter Unterschied im medianen Überleben zeigte sich zwischen der Therapie mit Bevacizumab i.p. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 5) und Bevacizumab i.v. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 6).



- SKOV3ip, keine Therapie (Gruppe 1)
- Bevacizumab i.p. (Gruppe 2)
- Bevacizumab i.v. (Gruppe 3)
- Paclitaxel i.p. (Gruppe 4)
- Bevacizumab i.p. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 5)
- Bevacizumab i.v. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 6)

Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie

4.1.2 Gewicht

Ziel der Behandlung war die Reduktion von Tumor und Azites im Mausmodell. Da die direkte Quantifizierung von Aszites bei den Mäusen nicht möglich ist, wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt, um indirekt den Behandlungserfolg messen zu können. Zu Beginn der Versuche wurden die Mäuse der Gruppen 1-6 einzeln mittels Digitalwaage gewogen, damit während des Beobachtungszeitraumes von 120 Tagen regelmäßig eine Gewichts-

kontrolle durchgeführt werden konnte. Dargestellt wird dies in der Abbildung 7. Das Ausgangsgewicht der Tiere lag am Tag 1 der Versuche bei ca. 20 g pro Maus. Ebenfalls dokumentiert wurde das Gewicht zum Zeitpunkt des Todes.

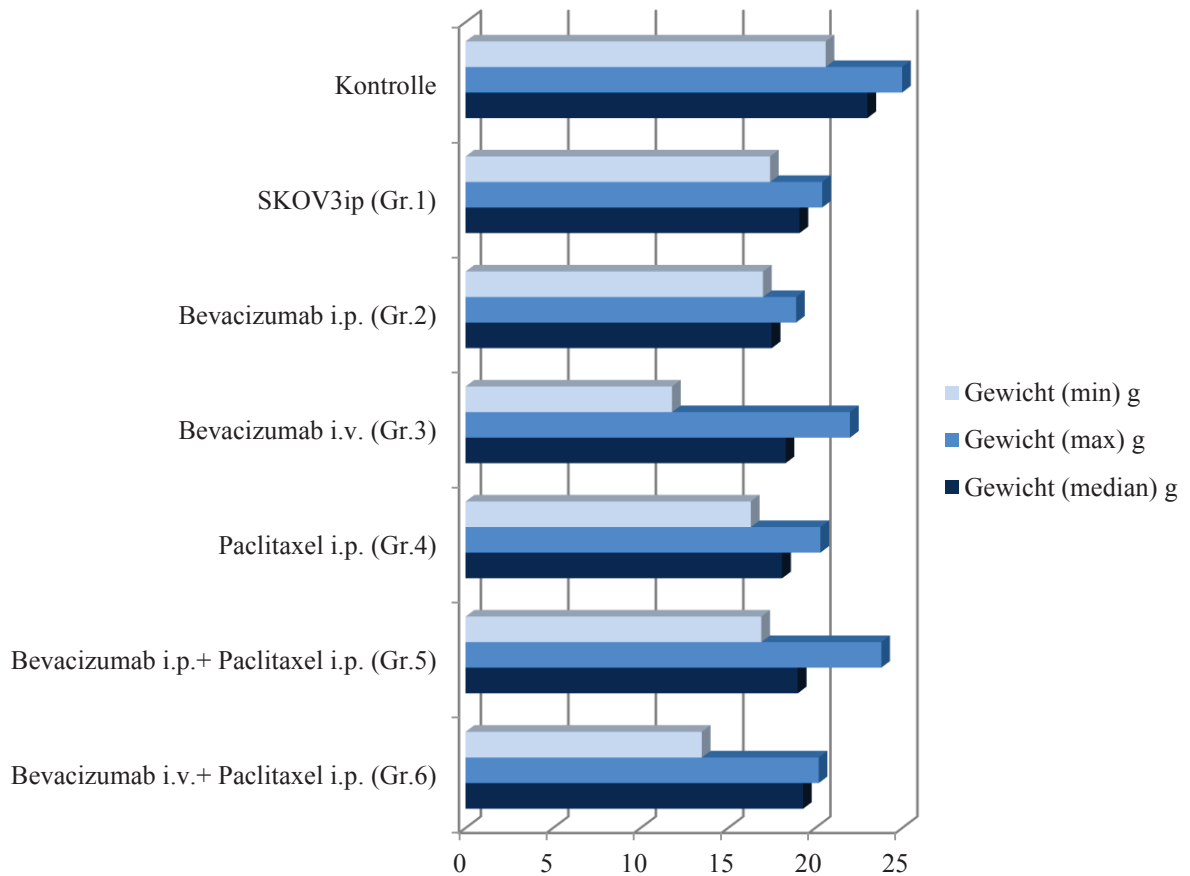


Abbildung 7: Gewicht der Mäuse nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie

4.1.3 Querschnittsfläche Abdomen

Bei der Erkrankung des Ovarialkarzinoms entwickeln viele Patientinnen malignen Aszites aufgrund der Peritonealkarzinose (Pfisterer, 2002). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, es den Einfluss einer anti-VEGF, einer Zystostatikum beziehungsweise einer Kombinationstherapie von Antikörper und Zytostatikum zu untersuchen. Um eine Veränderung des Bauchumfanges zu dokumentieren, wurde das Abdomen der Mäuse mittels einer Schublehre zu Beginn der Versuche und am Todeszeitpunkt vermessen und eine Querschnittsfläche (mm^2) des Abdomens errechnet ($A = \pi \cdot LL \cdot AP / 4$, wobei $LL =$ Abstand lateral links bis lateral rechts und $AP =$ Abstand anterior bis posterior). Die graphische Auswertung dieser Untersuchungsergebnisse ist in der Abbildung 8 dargestellt.

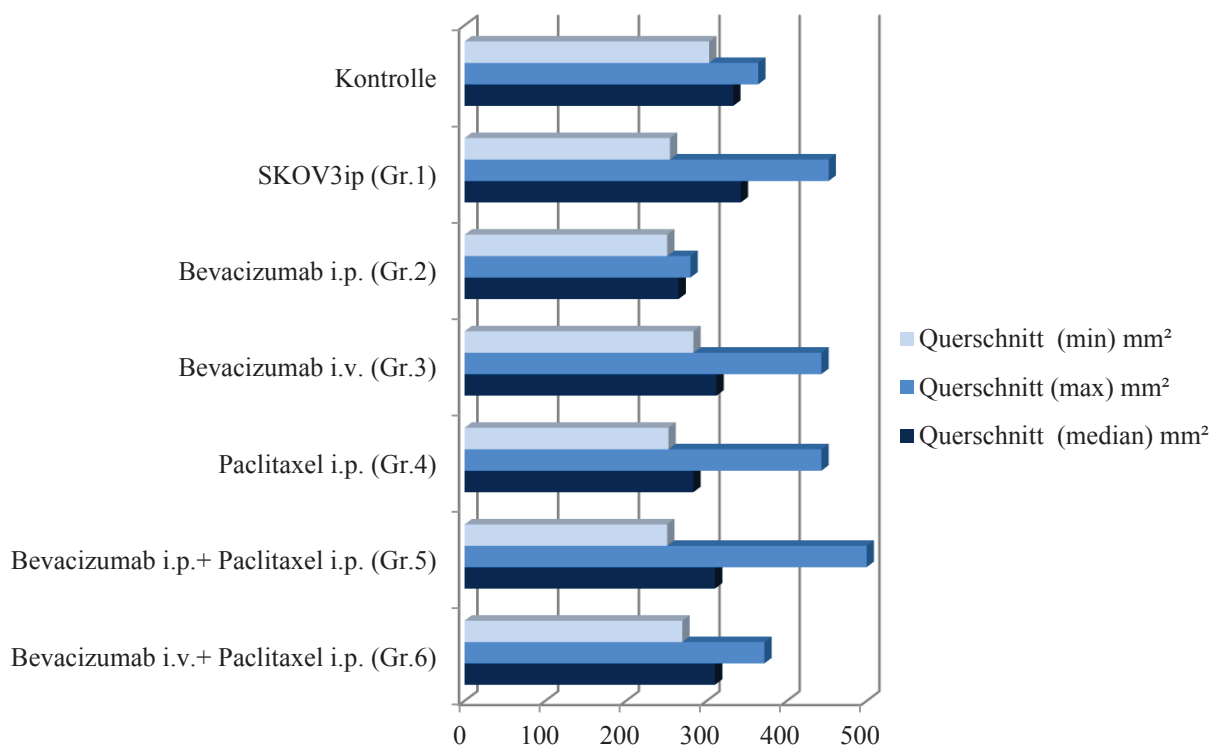


Abbildung 8: Querschnittsfläche Abdomen nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie

In Zusammenschau der Abbildung 6 und Abbildung 7 ergeben sich nachfolgende Ergebnisse: Die Tiere der Gruppe 1 erhielten nur eine Injektion der Ovarialkarzinomzellen SKOV3ip ohne nachfolgende Therapie. Die erste Maus verstarb bereits nach 36 Tagen, zu diesem Zeitpunkt konnte bereits eine deutliche Zunahme des Bauchumfanges der anderen

Tiere dieser Gruppe festgestellt werden. Das Durchschnittsgewicht zum jeweiligen Todeszeitpunkt betrug 19,1 g. Gleichzeitig zeigten sich sehr große Unterschiede in der Querschnittsfläche des Abdomens, wie in der Abbildung 8 zu sehen ist. Die minimale Querschnittsfläche betrug 254,5 mm² und die maximale Querschnittsfläche 452,4 mm². Diese Unterschiede lassen sich mit einer möglichen Tumorkachexie und einer deutlichen Aszitesbildung erklären. Betrachtet man in der Abbildung 6 die mediane Überlebensdauer nach der i.p. Behandlung mit Bevacizumab (Gruppe 2) von 51 Tagen mit der von der i.v. Therapie mit Bevacizumab (Gruppe 3) von 50,5 Tagen, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Zusätzlich ergab sich kein großer Unterschied der medianen Gewichtswerte mit 17,5 g in Gruppe 2 und 18,3 g in Gruppe 3 (Abbildung 7). Da die mediane Querschnittsfläche der Gruppe 3 mit 312,2 mm² größer war als die der Gruppe 2 mit 265,2 mm² (Abbildung 8), sich aber die Körpergewichte kaum unterschieden, kann man eine stärkere Aszitesbildung der Gruppe 3 vermuten. Dies wird unterstützt von dem Vergleichsergebnis des Bauchumfanges von Gruppe 3 mit Gruppe 1 (p-Wert 0,715), hier kann man nicht von einer erfolgreichen Aszitesreduzierung ausgehen. Vergleicht man die alleinige Paclitaxel i.p. Injektion (Gruppe 4), so zeigt sich im Vergleich zur Gruppe 1 ohne weitere Therapie eine Reduzierung des Bauchumfanges (p-Wert $\leq 0,05$). Im Vergleich der Bevacizumab i.p. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 5) und der Therapie Bevacizumab i.v. + Paclitaxel i.p (Gruppe 6) zur nicht therapierten Gruppe 1 zeigen sich folgende p-Werte $\leq 0,001$ und $\leq 0,001$. Vergleicht man die Therapie Bevacizumab i.p. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 5) und die Therapie Bevacizumab i.v. + Paclitaxel i.p (Gruppe 6) jeweils mit der alleinigen Therapie von Bevacizumab (Gruppen 2 und 3) oder Paclitaxel (Gruppe 4), so zeigt sich eine signifikante Reduzierung des Abdomenumfanges bei den Kombinationstherapien (Gruppe 5 und Gruppe 6) (p-Wert $\leq 0,001$).

4.1.4 Pathologische Untersuchung des Tumorgewebes

In Therapie 1 wurde an einem *in vivo* Mausmodell der Einfluss der Applikationsart i.p. und i.v. des VEGF-Antikörpers Bevacizumab auf die antitumorale Wirkung untersucht. In den vorliegenden Versuchen wurden mittels Immunhistochemie das Tumorgewebe der Mäuse der Kontrollgruppe (Gruppe 1), der Gruppe 2 mit der intraperitonealen Bevacizumab Injektion und der Gruppe 3 mit der intravenösen Bevacizumab Injektion auf ihre VEGF Nachweisbarkeit untersucht.

4.1.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung des Tumorgewebes

Die zu untersuchenden Tumorgewebschnitte der Gruppen 1, 2 und 3 wurden mittels der Hämatoxylin-Eosin Färbung angefärbt und mikroskopisch untersucht (Abbildung 9). In diesem Teil der Untersuchungen sollte der Unterschied einer intraperitonealen Verabreichung von Bevacizumab zu einer intravenösen Verabreichung herausgearbeitet werden. Exemplarisch wurden hierfür nur die Tumore aus den Gruppen 1, 2 und 3 mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung untersucht. In allen Färbungen zeigt sich eine papilläre Tumorstruktur, so dass weitere Schnitte auch für die folgende Immunhistochemische Färbung und Untersuchung genutzt werden konnten.

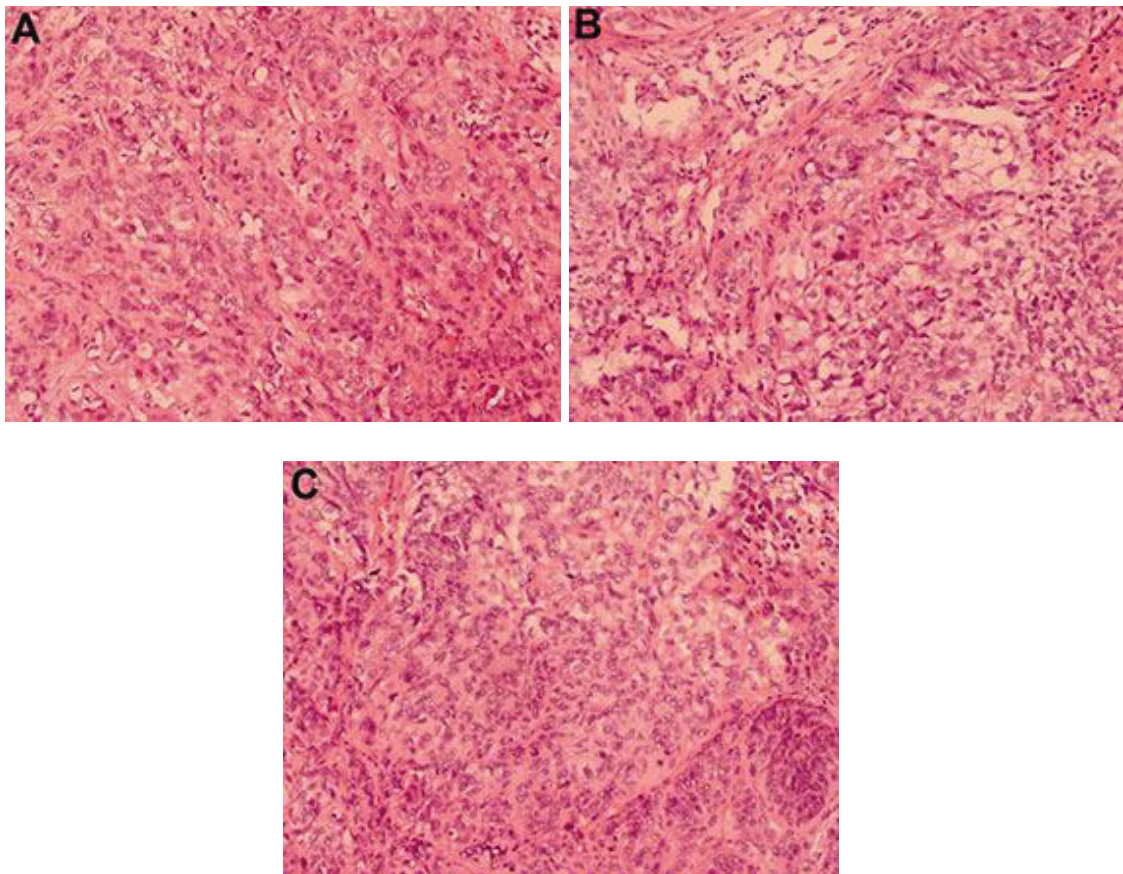


Abbildung 9: Histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes,
Therapie mit Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) ohne Therapie (Gruppe 1)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Bevacizumab i.p. (Gruppe 2)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach) Bevacizumab i.v. (Gruppe 3)

Tabelle 6: Zusammenfassung der Histologischen Untersuchung

Gewebe	Färbung	Histologische Untersuchung
Tumor 1 SKOV3ip	HE	Papilläre Tumorstruktur
Tumor 2 Bevacizumab i.p.	HE	Papilläre Tumorstruktur
Tumor 3 Bevacizumab i.v.	HE	Papilläre Tumorstruktur

4.1.4.2 Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes

Die zu untersuchenden Tumorgewebschnitte der Gruppen 1, 2 und 3 wurden mittels Immunhistochemie angefärbt und mittels Mikroskop und dem Immunreaktiven Score (IRS Score) nach Remmele und Stegner (1987) ausgewertet (Tabelle 8).

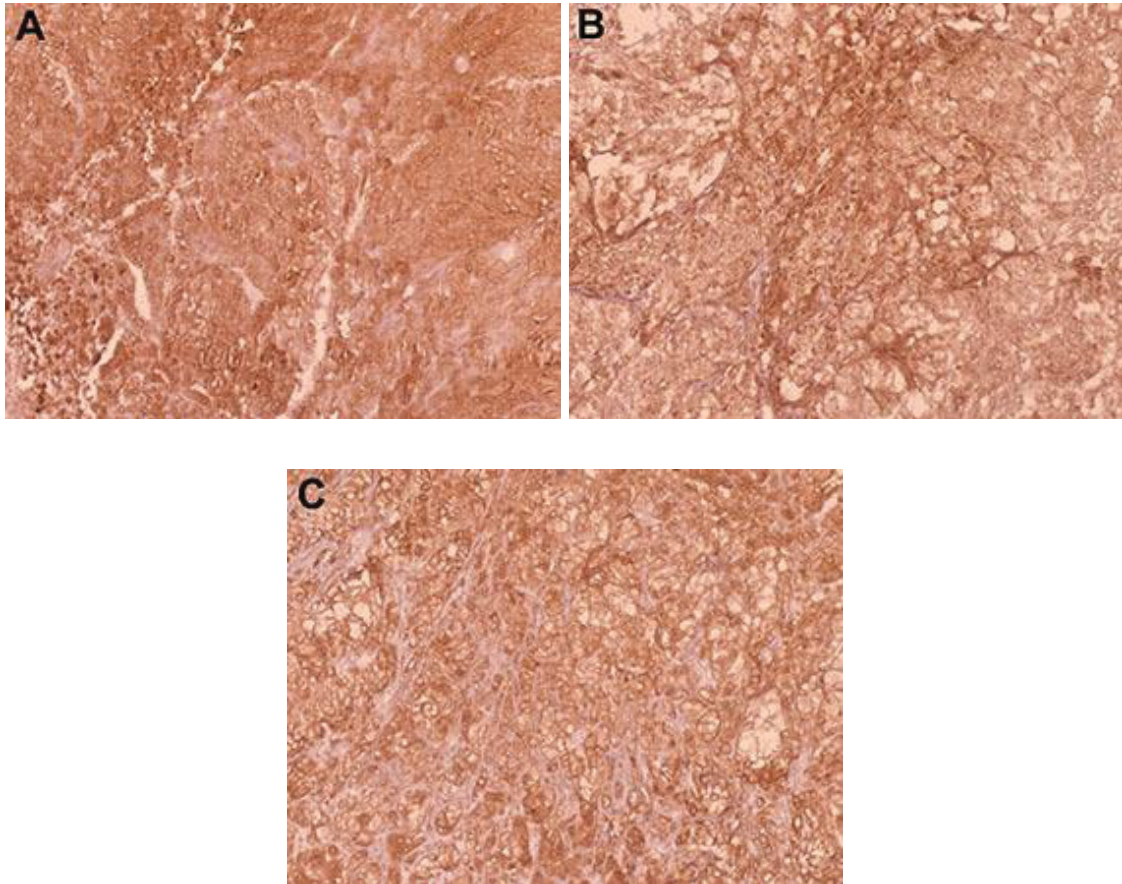


Abbildung 10: Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes,
Therapie mit Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) ohne Therapie (Gruppe 1)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Bevacizumab i.p. (Gruppe 2)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach) Bevacizumab i.v. (Gruppe 3)

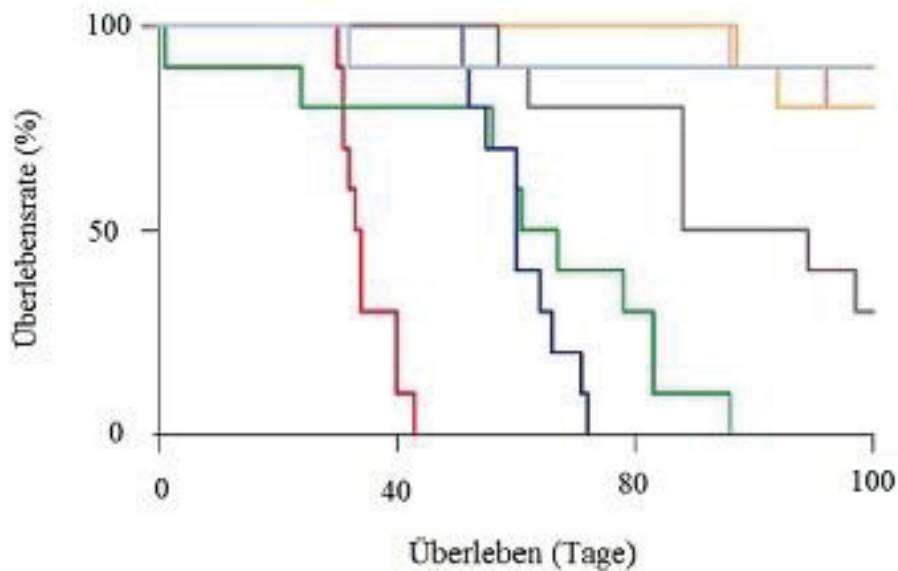
In der Abbildung 10 ist exemplarisch der immunhistochemische Nachweis von VEGF dargestellt. Eine starke Ausprägung des Endothel Wachstumsfaktors lässt sich an der starken Braunfärbung der Zellkerne erkennen. In Abbildung A zeigt sich eine Anfärbung des Ovarialkarzinomtumorgewebes mit einem IRS Score von 12 Punkten. Dies lässt auf eine starke Vaskularisierung des Tumorgewebes schließen. Die Abbildung B zeigt den Tumorgewebe nach einer intraperitonealen Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab, der ein IRS Score von 6 Punkten aufweist. Dies lässt auf ein durch das Bevacizumab verringertes vaskuläres Wachstum des Tumors schließen. In der Abbildung C ist der Ovarialkarzinomtumorgewebe nach einer intravenösen Bevacizumab Therapie mit einem IRS Score von 12 Punkten dargestellt. Dieser starke VEGF Nachweis deutet darauf hin, dass eine intravenöse Verabreichung von Bevacizumab eine geringere Effektivität in der antitumoralen Wirkung aufweist als eine intraperitoneale Injektion.

4.2 Untersuchung einer Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab

4.2.1 Überlebensdauer

Voruntersuchungen zeigten ein günstiges Wirkprofil einer i.p. Therapie im Vergleich zu einer i.v. Applikation einer Chemo- und Antikörpertherapie in Bezug auf die Überlebensdauer als auch auf die Aszites- und Tumorreduktion. Im nächsten Schritt wurde die zusätzliche Effektivität einer i.p. applizierten spezifischen onkolytischen Gentherapie untersucht. Um die Wirksamkeit der verschiedenen Therapiegruppen zu bestimmen, wurde das Überleben der Mäuse dokumentiert (Abbildung 11). In den Gruppen 7-13 betrug das mediane Überleben 33,5, 60, 120, 64, 120, 98,5, 120 Tage. Im Vergleich der Gruppen Paclitaxel i.p. (Gruppe 8) und Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9) ergab sich eine deutlich längere mediane Überlebenszeit der Gruppe 9 mit 120 Tagen. In Gruppe 8 lag der mediane Überlebenszeitraum bei nur 60 Tagen ($p\text{-Wert} \leq 0,001$). Vergleicht man die Gruppe Paclitaxel i.p. (Gruppe 8) mit der Gruppe Paclitaxel i.p. und Ad5/3MDR1E1 Virus i.p. (Gruppe 11), so zeigt sich ein Überlebensvorteil der Gruppe 11, auf die mediane Überlebenszeit bezogen, von 60 Tagen. Diese Verlängerung der Überlebenszeit lässt sich am ehesten durch die zytotoxische Wirkung von Paclitaxel erklären. Die Kombinationstherapie von Ad5/3MDR1E1 i.p. mit Paclitaxel i.p. (Gruppe 11) zeigt keinen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen Virustherapie mit Ad5/3MDR1E1 in Gruppe 9 ($p\text{-Wert} 0,584$). Vergleicht man die Verwendung von Novantrone i.p. in Kombination mit dem Virus Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 10) mit der Kombination Paclitaxel i.p. mit dem Virus Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 11), so zeigt sich, dass die Verwendung von Paclitaxel i.p. mit 120 Tagen Überlebensdauer im Median zu einer verlängerten Überlebenszeit gegenüber der Verwendung von Novantrone i.p. mit einer medianen Überlebensdauer von nur 64 Tagen ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) führt. In der zusätzlichen Kombination mit Bevacizumab i.p. (Gruppe 12 und Gruppe 13) zeigt sich ebenfalls eine verbesserte Überlebensdauer mit 120 Tagen im Median der Gruppe mit der Therapie Ad5/3MDR1E1 i.p. + Paclitaxel i.p. + Bevacizumab i.p. (Gruppe 13) im Vergleich zu der Gruppe 12 mit Ad5/3MDR1E1 i.p. + Novantrone i.p. + Bevacizumab i.p. ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Aus diesen beiden Ergebnissen lässt sich schließen, dass durch eine Novantrone i.p. Therapie die Überlebenszeit eher verkürzt wird, was möglicherweise auf einen toxischen Effekt der Kombination zurückzuführen ist. Diese Bevacizumab i.p. Injektion führt aber im Vergleich der Therapie Ad5/3MDR1E1 i.p. + Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)

zur Therapie Ad5/3MDR1E1 i.p. + Paclitaxel i.p. + Bevacizumab i.p. (Gruppe 13) zu keiner verlängerten Überlebenszeit. Beide Gruppen haben eine mediane Überlebensdauer von 120 Tagen (p-Wert 0,998).



- Ad5MDRluc i.p. (Gruppe 7)
- Paclitaxel i.p. (Gruppe 8)
- Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9)
- Ad5/3MDR1E1 + Novantrone i.p. (Gruppe 10)
- Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)
- Ad5/3MDR1E1 + Novantrone + Bevacizumab i.p. (Gruppe 12)
- Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel + Bevacizumab i.p. (Gruppe 13)

Abbildung 11: Kaplan-Meier Überlebenskurve, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab

4.2.2 Gewicht

Zu Beginn der Versuche wurden auch die Mäuse der Gruppen 7-13 gewogen, und die Gewichtsveränderung während des Beobachtungszeitraumes von 120 Tagen in der Abbildung 12 dokumentiert. Das Ausgangsgewicht der Tiere lag am Tag 1 der Versuche ebenfalls bei jeweils ca. 20 g/Maus.

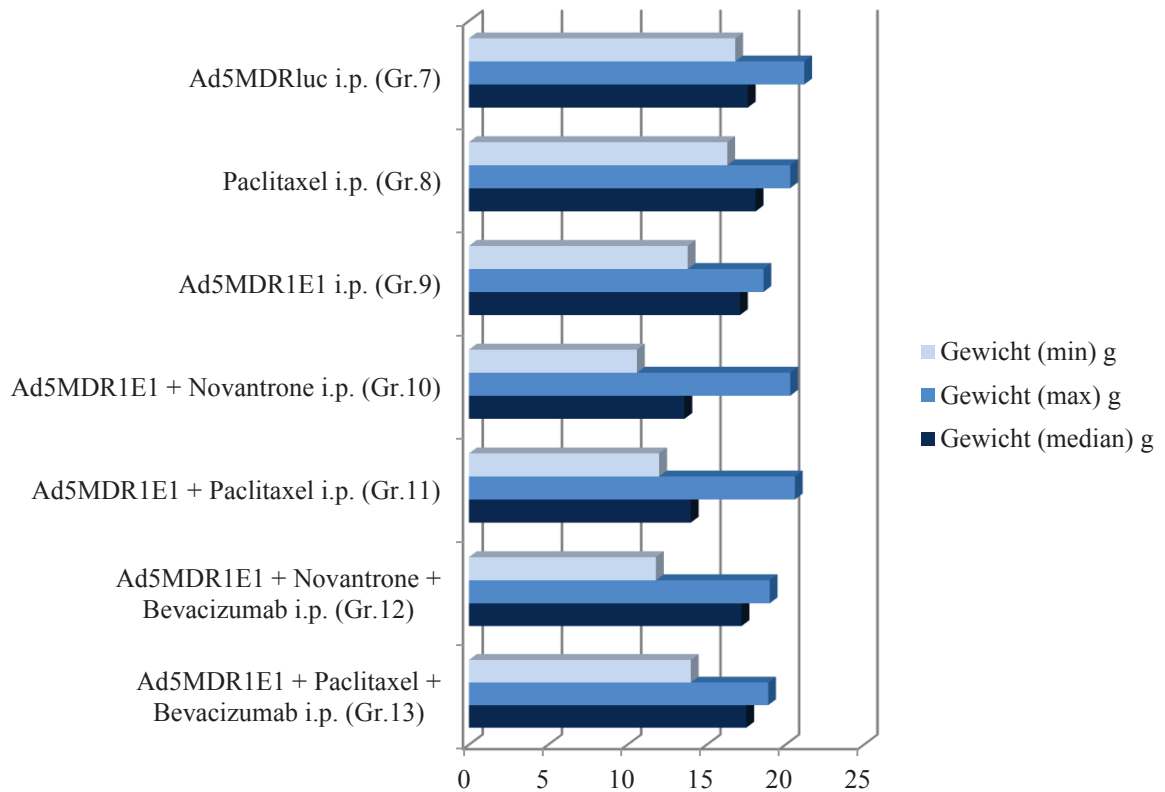


Abbildung 12: Gewicht zum Todeszeitpunkt, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab

4.2.3 Querschnittsfläche Abdomen

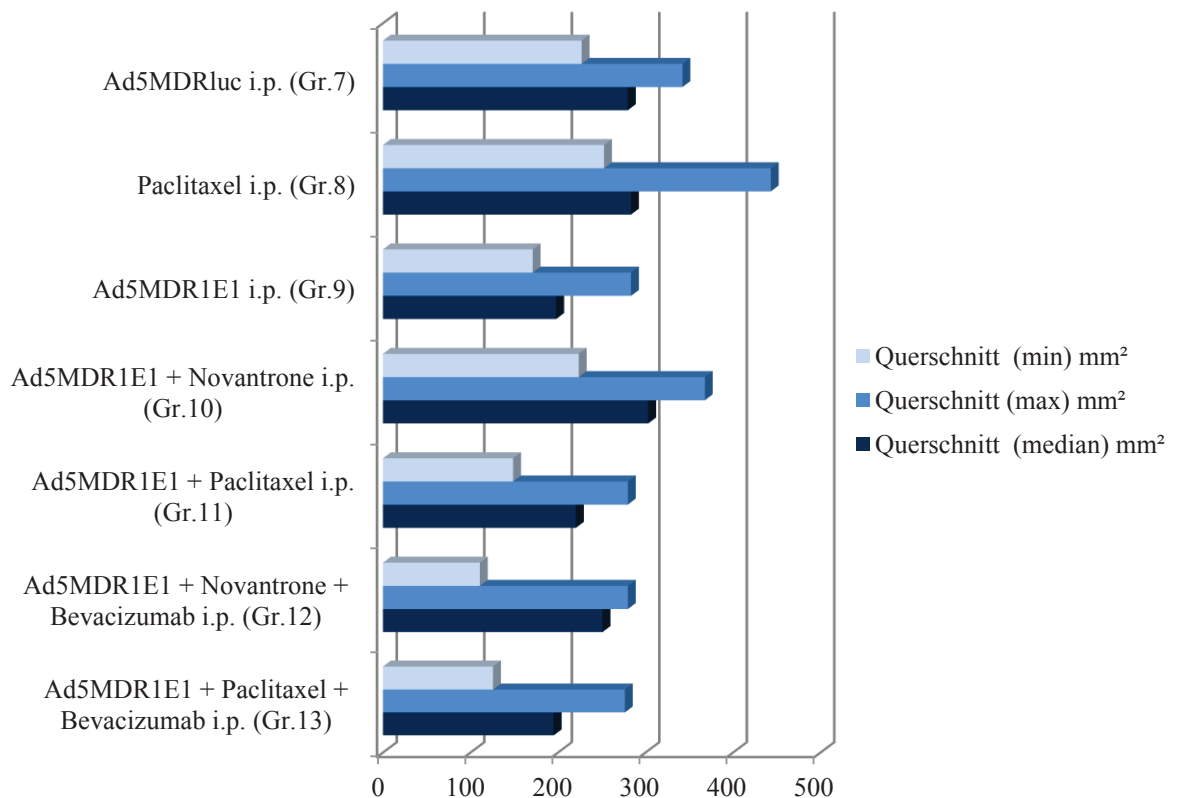


Abbildung 13: Querschnittsfläche Abdomen, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab

In den Abbildungen 12 und 13 zeigt sich in der Gruppe 7 ein medianes Gewicht von 17,6 g zum Todeszeitpunkt mit einer medianen Querschnittsfläche des Abdomens von 279,9 mm². Aufgrund der Kontrolltherapie mit dem Ad5MDRluc-Virus und einem bei der Sektion erkennbaren sehr ausgeprägten Tumorwachstum, kann der Gewichts- und Querschnittsverlust der Mäuse auf eine Tumorkachexie zurückzuführen sein. Die Gruppe, die nur eine alleinige chemotherapeutische Therapie mit Paclitaxel i.p. erhalten hat (Gruppe 8), zeigte ebenfalls einen tumorbedingten Gewichtsverlust. Doch teilweise war in dieser Gruppe auch eine Zunahme des Querschnittes des Abdomens auf bis zu 443,3 mm² festzustellen. Diese lässt sich auch mit dem vermehrten sichtbaren intraperitonealen Karzinomwachstum erklären. Bei der alleinigen Adenoviralen-Therapie mit dem Virus Ad5/3MDR1E1 (Gruppe 9) zeigt sich eine mediane Überlebensdauer von 120 Tagen, ein Gewichtsunterschied von 6 g im Vergleich zu der Kontrollgruppe und eine mediane Querschnittsfläche von nur 198 mm². Das lange Überleben dieser Therapiegruppe

könnte auf das Fehlen chemotherapeutischer Nebenwirkungen hindeuten. Die auffällig kurze Lebensdauer einer Maus in Gruppe 10 beruht auf Komplikationen während der intraperitonealen Injektion der SKOV3ip Zellen, die Maus verstarb direkt nach der Injektion. In dieser Gruppe war besonders das struppige Fell der Mäuse auffällig, ebenso die häufig bei der Sektion sichtbare grünliche Verfärbung der Organe im Abdomen. Vergleicht man die Gruppe, die eine Therapie bestehend aus Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. (Gruppe 11) erhalten hat, mit der Gruppe, der Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. + Bevacizumab i.p. (Gruppe 13) verabreicht wurde, so fällt auf, dass beide Gruppen ein medianes Überleben von 120 Tagen aufweisen. In der Gruppe 13 liegt ein medianes Gewicht von 17,5 g vor, in Gruppe 11 beträgt dies 14 g, doch gleichzeitig zeigt sich in Gruppe 13 mit 195,1 mm² eine verringerte mediane Querschnittsfläche des Abdomens im Vergleich zur Gruppe 11 mit 220,6 mm². Dies lässt auf eine verringerte Aszites-Bildung aufgrund der Bevacizumab Injektion schließen.

4.2.4 Pathologische Untersuchung des Tumorgewebes

In Therapie 2 wurde an einem *in vivo* Mausmodell der synergistische Effekt einer antiangiogenen Therapie mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab, einer Zytostatika Therapie und einem MDR-gesteuerten CRAAd untersucht. In den vorliegenden Nachuntersuchungen wurden mittels Immunhistochemie exemplarisch die Tumore der Mäuse der Gruppen 7, 9, 11 und 13 untersucht.

4.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung des Tumorgewebes

Die zu untersuchenden Tumorschnitte der Gruppen 7, 9, 11 und 13 wurden mittels der Hämatoxylin-Eosin Färbung angefärbt und mikroskopisch untersucht. Alle Abbildungen zeigen ein ausgeprägtes Tumorstromawachstum, so dass weitere Schnitte dieser Tumoren für die Immunhistochemische Färbung und Untersuchung genutzt werden konnten.

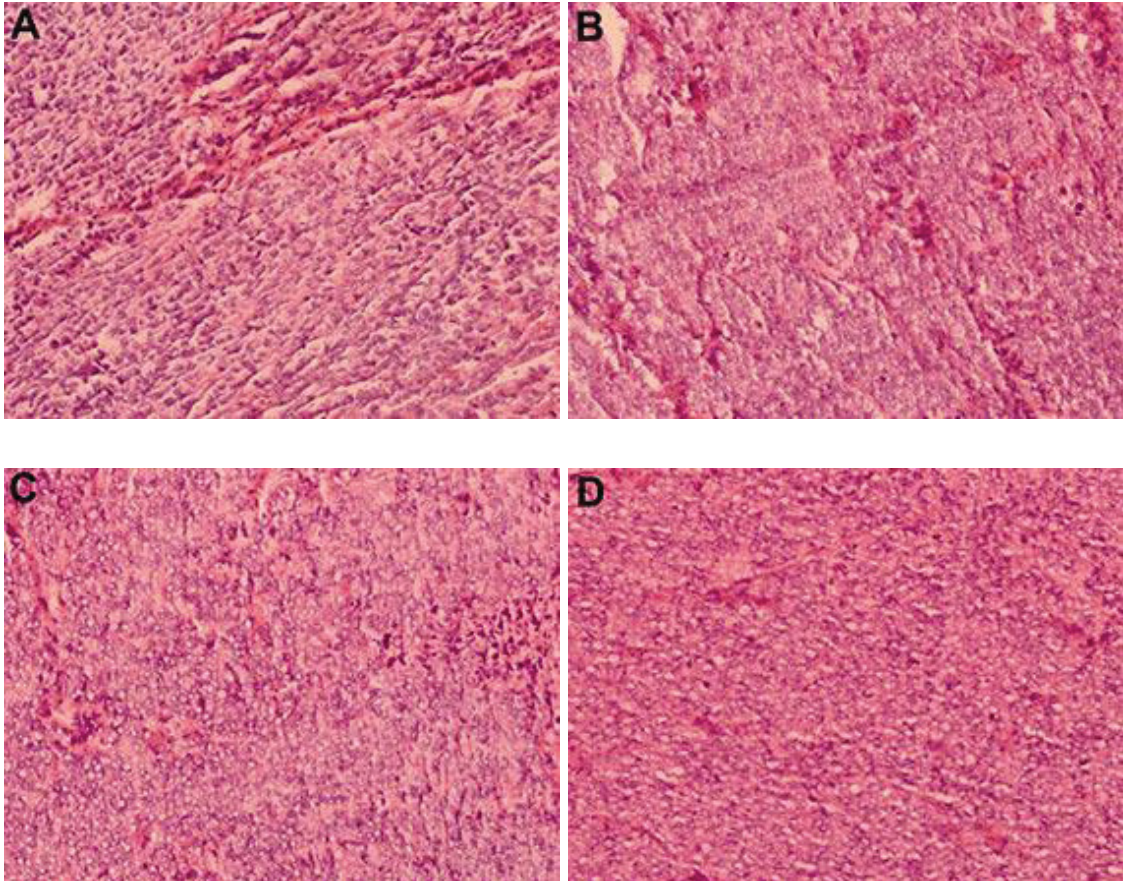


Abbildung 14: Histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) Ad5MDR1uc i.p. (Gruppe 7)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)
Abbildung D (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p.+ Bevacizumab i.p. (Gruppe 13)

Tabelle 7: Zusammenfassung der Histologischen Untersuchung

Gewebe	Färbung	Histologische Untersuchung
Tumor 7 Ad5MDRIuc i.p.	HE	Ausgeprägtes Tumorwachstum
Tumor 9 Ad5/3MDR1E1 i.p.	HE	Ausgeprägtes Tumorwachstum
Tumor 10 Novantrone i.p. + Ad5/3MDR1E1	HE	Ausgeprägtes Tumorwachstum
Tumor 11 Paclitaxel i.p. + Ad5/3MDR1E1	HE	Ausgeprägtes Tumorwachstum
Tumor 13 Paclitaxel + Bevacizumab i.p. + Ad5/3MDR1E1	HE	Ausgeprägtes Tumorwachstum

4.2.4.2 Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes

In den Gruppen 7, 9, 11 und 13 wurde die tumorspezifische Replikation der rekombinanten CRAds nachgewiesen. Es wurde eine immunhistochemische Darstellung des viralen E1A Proteins durchgeführt. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mittels Mikroskop und dem Immunreaktiven Score (IRS Score) nach Remmele und Stegner (1987) ausgewertet (Tabelle 8).

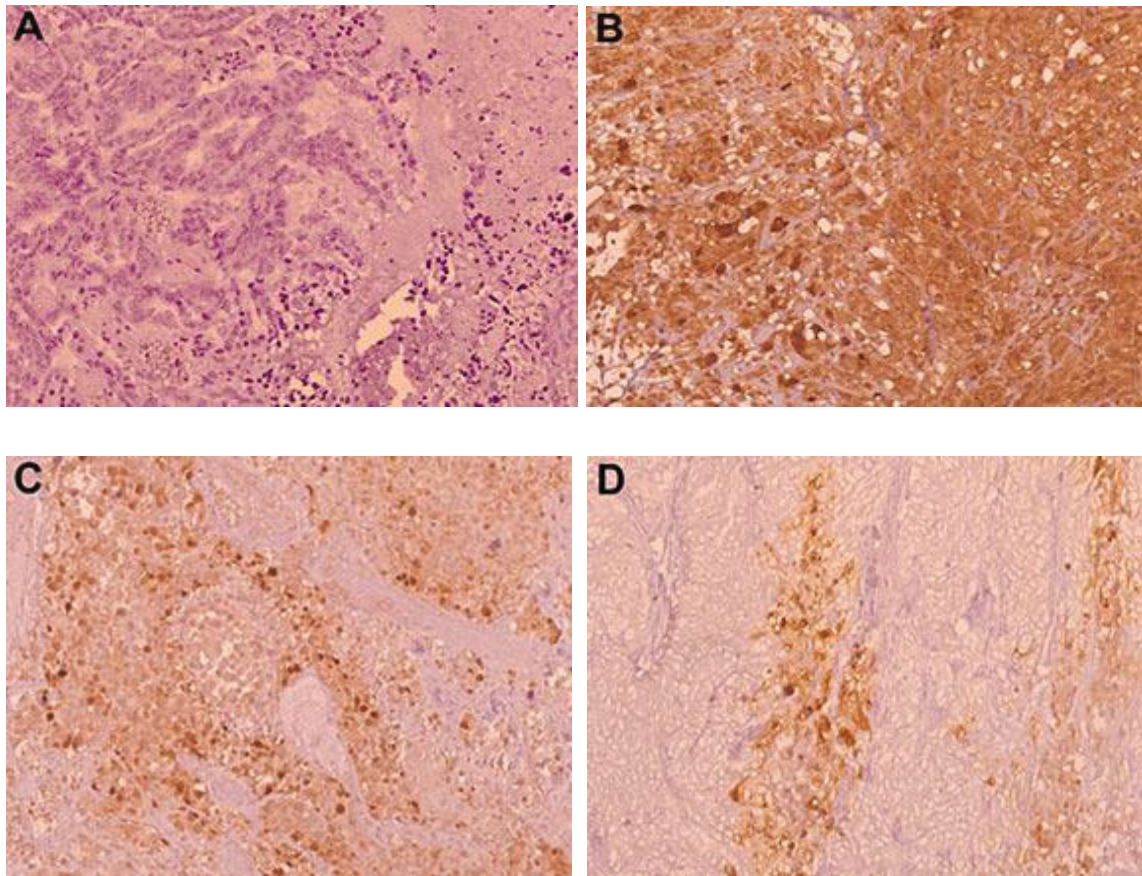


Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) Ad5MDRluc i.p. (Gruppe 7)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach)
Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)
Abbildung D (Vergrößerung 200fach)
Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p.+ Bevacizumab i.p. (Gruppe 13)

In der Abbildung 15 sind exemplarisch immunhistochemische Nachweise des viralen E1A Proteins dargestellt. In Abbildung A zeigt sich der Ovarialkarzinomtumorgewebe nach einer Therapie mit dem replikationsdefizienten Virus Ad5MDRluc mit einem IRS Score von 1 Punkt, d.h. es findet sich kein Nachweis des viralen E1A Proteins.

In Abbildung B zeigt sich Tumorgewebe nach einer intraperitonealen Injektion von Ad5/3MDR1E1 mit einem IRS Score von 12 Punkten. Dies lässt auf eine gute intrazelluläre virale Replikation schließen. In Abbildung C wird Tumorgewebe nach Therapie mit Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. und einem IRS Score von 6 Punkten gezeigt. Auch hier hat eine intrazelluläre Replikation des viralen E1A Proteins stattgefunden, ebenso in Abbildung D nach einer Therapie mit Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. + Bevacizumab i.p. und mit einem IRS Score von 6 Punkten.

4.2.5 Histologische Untersuchung der Leber

Die entnommenen Lebern der Mäuse wurden pathologisch untersucht. Aufgrund hoher Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) Expression auf der Leber, kann es zu einer hepatotoxischen Nebenwirkung der adenoviralen Therapie kommen, da die Leber das Hauptabbauorgan der Adenoviren darstellt (Lieber et al., 1997), (Barnett et al., 2002), (Sharma et al., 2009).

4.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung der Leber

Die zu untersuchenden Leberschnitte der Gruppen 7, 9, 11 und 13 wurden mittels der Hämatoxylin-Eosin Färbung angefärbt und mikroskopisch untersucht (Abbildung 16). Es ließ sich bei keiner der Färbungen eine Hepatotoxizität nachweisen. Lediglich in Abbildung C (Ad5/3MDR1E1 + Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)) waren leichte lobuläre und portale Entzündungen festzustellen.

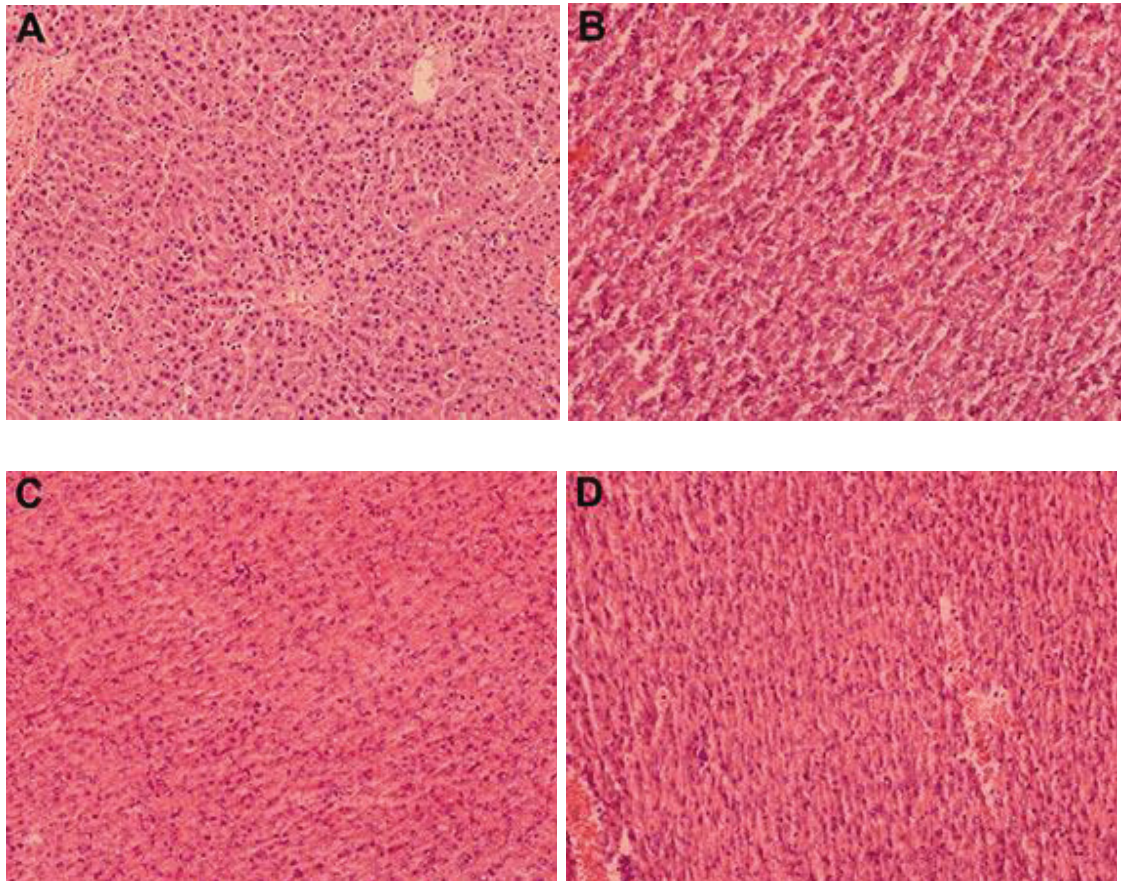


Abbildung 16: Histopathologische Untersuchung der Leber, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) Ad5MDRluc i.p. (Gruppe 7)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)
Abbildung D (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p.+Bevacizumab i.p. (Gruppe 13)

4.2.5.2 Immunhistochemische Färbung der Leber

In den Gruppen 7, 9, 11 und 13 wurde die Therapie mit rekombinanten CRAds auf hepatotoxische Nebenwirkungen überprüft. Dazu diente eine immunhistochemische Darstellung des viralen E1A Proteins. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mittels Mikroskop und dem Immunreaktiven Score (IRS Score) nach Remmele & Stegner (1987) ausgewertet (Tabelle 8).

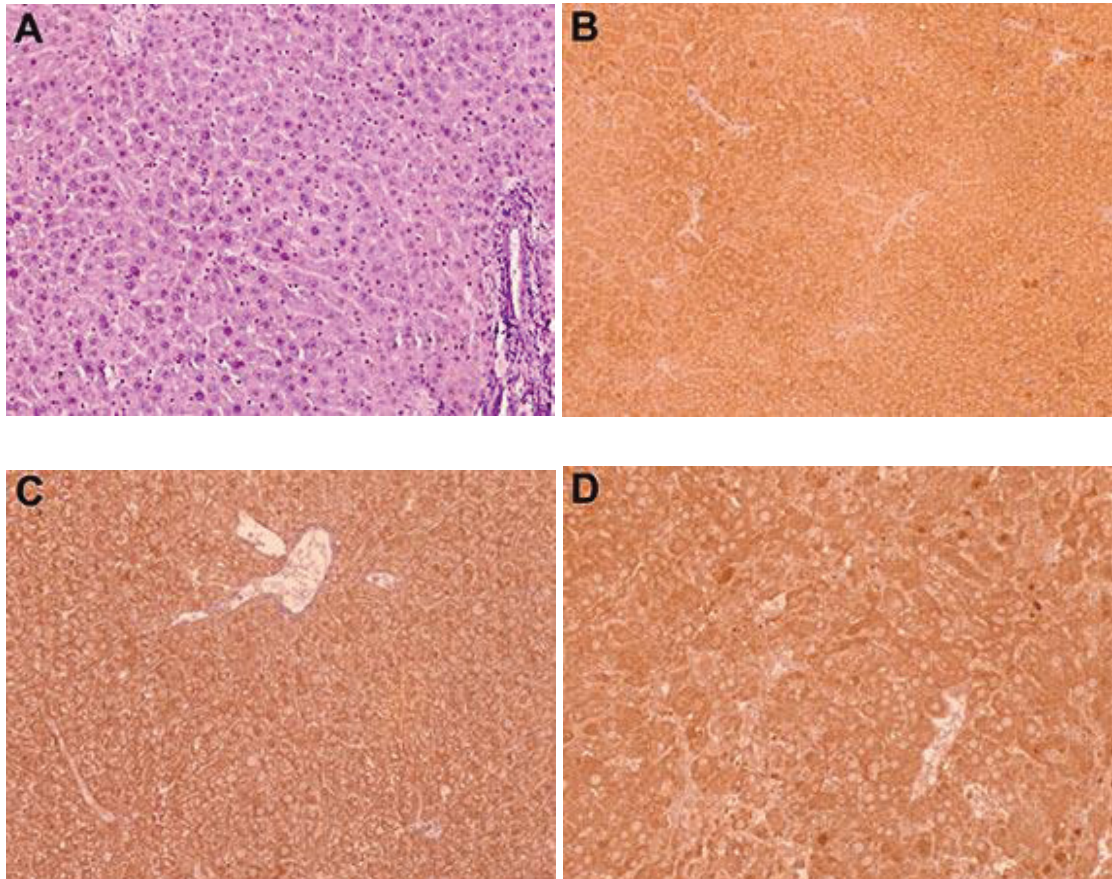


Abbildung 17: Immunhistochemische Untersuchung der Leber, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab
Abbildung A (Vergrößerung 200fach) Ad5MDR1uc i.p. (Gruppe 7)
Abbildung B (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1 i.p. (Gruppe 9)
Abbildung C (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p. (Gruppe 11)
Abbildung D (Vergrößerung 200fach) Ad5/3MDR1E1+Paclitaxel i.p.+ Bevacizumab i.p. (Gruppe 13)

Tabelle 8: Zusammenfassung der IR Score Ergebnisse

Gewebe	Färbung	Immunreaktiver Score
Tumor 1 SKOV3ip	IHC VEGF	> 80% der Zellen haben reagiert 12
Tumor 2 Bevacizumab i.p.	IHC VEGF	> 80% der Zellen haben reagiert 6
Tumor 3 Bevacizumab i.v.	IHC VEGF	50-80% der Zellen haben reagiert 12
Leber 7 Ad5MDRIuc i.p.	IHC E1A	Negativ
Tumor 7 Ad5MDRIuc i.p.	IHC E1A	< 10% der Zellen haben reagiert 1
Leber 9 Ad5/3MDR1E1 i.p.	IHC E1A	> 80% der Zellen haben reagiert 12
Tumor 9 Ad5/3MDR1E1 i.p.	IHC E1A	> 80% der Zellen haben reagiert 12
Leber 10 Novantrone i.p. + Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	> 80% der Zellen haben reagiert 10 Artifizielle Anfärbung
Tumor 10 Novantrone i.p. + Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	50-80% der Zellen haben reagiert 3
Leber 11 Paclitaxel i.p.+ Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	> 80% der Zellen haben reagiert 12
Tumor 11 Paclitaxel i.p.+ Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	50-80% der Zellen haben reagiert 6
Leber 13 Paclitaxel + Bevacizumab i.p. + Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	> 80% der Zellen haben reagiert 6
Tumor 13 Paclitaxel + Bevacizumab i.p. + Ad5/3MDR1E1	IHC E1A	10-50 % der Zellen haben reagiert 6

Die Untersuchung zeigte eine deutliche Reaktion von Ad5/3MDR1E1 in Tumor und Leber. Die Tumorspezifität war durch die E1A Färbung nicht nachweisbar (Tabelle 8).

5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom stellt unter den gynäkologischen Karzinomerkrankungen die häufigste Todesursache dar (du Bois et al., 2009), (Siegel et al., 2013). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt in den meisten Fällen ein weit fortgeschrittenes Tumorstadium vor (FIGO III oder IV), da die Erkrankung oftmals nur unspezifische Frühsymptome aufweist. Trotz verbesserter Operationsverfahren sowie verbesserter chemotherapeutischer Therapieschemata erleiden viele der Patientinnen ein Rezidiv (Ozols, 2002), (Fung-Kee-Fung et al., 2007). Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Zystostatika reduzieren die aktuellen Therapiemöglichkeiten (Schondorf et al., 2002), (Hille et al., 2006). Oftmals kann nur noch die Verbesserung der Lebensqualität der Patientinnen im Vordergrund stehen. Besonders das Vorliegen von Peritoneal- und Pleurakarzinosen bedingt eine schlechtere Prognose (Eitan et al., 2005). Durch eine Aszitespunktion kann oftmals nur ein kurzfristiger Erfolg in der Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden. Bevacizumab, ein *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Antikörper, ist wirksam in der Behandlung des Ovarialkarzinomrezidivs (Aghajanian et al., 2012). In Studien wurden Erfolgsraten der Remission von 16 und 18% bei platinsensiblen und platinresistenten Karzinomen erreicht (Cannistra et al., 2007), (Burger et al., 2007). Durch die Antikörpertherapie konnte der therapeutische Effekt der Zystostatika Behandlung gesteigert werden. Die Lebenserwartung konnte somit signifikant gesteigert werden (Mabuchi et al., 2008). Möglicherweise kann ein Benefit aus der Kombination von Cisplatin vorbehandelten Ovarialkarzinomzellen und der antiangiogenetischen Wirkung des VEGF-Antikörpers für die Behandlung von Patientinnen mit Peritonealkarzinose gezogen werden (Shah et al., 2009). Auch wenn bereits in 2 Studien gezeigt werden konnte, dass eine Kombinationstherapie mit Bevacizumab und Zytostatika zu einer deutlichen Überlebenszeitverlängerung führt, müssen auch immer mögliche Nebenwirkungen und die Lebensqualität beachtet werden (Katsumata et al., 2009), (Stark et al., 2013), (Perren et al., 2011, Monk et al., 2013). Durch die Anwendung von Bevacizumab kann auch eine Reduzierung der Aszitesmenge durch Verringerung der VEGF-Konzentration erreicht werden (Yukita et al., 2000). Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von erhöhter VEGF-Konzentration in malignem Aszites überein (Senger et al., 1983), (Zebrowski et al., 1999), (Hefler et al., 2007), (Ellis and Hicklin, 2008). Für die Prognose und den Therapieverlauf des Ovarialkarzinoms spielt die Angiogenese eine bedeutende Rolle (Bamias et al., 2012). In mehreren Studien konnte der Zusammenhang zwischen der Dichte der neugebildeten Gefäße, der VEGF-Konzentration

und dem Ausmaß einer malignen Tumorerkrankung bewiesen werden (Ferrara, 2004). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die VEGF-Expression signifikant negativ mit dem Überlebenszeitraum von Ovarialkarzinompatientinnen korreliert (Siddiqui et al., 2011). Bevacizumab hat eine hohe therapeutische Potenz, da die VEGF-Konzentration besonders in maligne verändertem Gewebe erhöht ist. In gesundem Gewebe findet sich stattdessen eine sehr geringe VEGF-Konzentration (Rein et al., 2004). Bereits in präklinischen Studien konnte unter Bevacizumab ein verringertes Karzinomwachstum nachgewiesen werden (Gerber and Ferrara, 2005). Der Antikörper bewirkt eine Reduktion der Gefäßdichte, des Gefäßdurchmessers und der Gefäßpermeabilität. Die führt zu einer verringerten Menge an Aszites. Die Beeinflussung von VEGF und der VEGF-Rezeptoren sind wichtiger Bestandteil zahlreicher klinischer Untersuchungen (Jain et al., 2006). Ziel ist die Reduktion der Aszitesmenge und des Tumorwachstums nach Bevacizumabverabreichung an Ovarialkarzinomtiermodellen zu untersuchen (Hu et al., 2002). In einer Studie von Mabuchi *et al.* konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab intraperitoneal (i.p.) eine antitumorale Aktivität sowohl als Single-Therapie als auch in Kombination mit Cisplatin aufweisen kann. Bevacizumab wird in der überwiegenden Zahl der klinischen und präklinischen Untersuchungen intravenös appliziert. Der mögliche Benefit einer verlängerten antiangiogenetischen Behandlung wird aktuell in der AGO-OVAR 17 Studie untersucht. Die Absorptionsrate von Bevacizumab nach i.p. Injektion wurde bereits untersucht. Es zeigte sich eine rasche und nahezu vollständige Absorption des VEGF-Antikörpers. Eine Fragestellung dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit der i.v. und i.p. Applikation von Bevacizumab im Mausmodell. Es konnte bei der Kombinationstherapie von Bevacizumab und Paclitaxel kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Lebenserwartung durch die Unterscheidung der Bevacizumabverabreichung i.v. versus i.p. gezeigt werden. Diese Ergebnisse passen zu den klinischen Untersuchungen von Shah, Veith, Bernacki and Balthasar. Die Überlebenszeit konnte nachweislich durch eine kombinierte Therapie von Bevacizumab mit Carboplatin i.p. oder besonders mit Paclitaxel i.p. verlängert werden. Hierbei kommt der Applikationsart von Bevacizumab (i.v. versus i.p.) keine ausschlaggebende Bedeutung zu (p -Wert $< 0,586$) (Shah et al., 2011). Bei einer Untersuchung von bereits im hohen Maße vortherapierten Ovarialkarzinompatientinnen erhielten diese 15mg/kg Bevacizumab i.v. alle drei Wochen (Numnum et al., 2006), (Gerber and Ferrara, 2005). Bei allen Patientinnen konnte eine verringerte Menge an Aszites nachgewiesen werden. Seit Beginn dieser Therapie benötigte keine Patientin eine Aszitespunktion. Einigen Patientin-

nen wurde Bevacizumab i.p. verabreicht (Kobold et al., 2009). Neun Patientinnen mit Aszites mit den Grunderkrankungen Colon-, Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinom, die zuvor regelmäßig eine Aszitespunktion benötigten, erhielten monatlich 5mg/kg Bevacizumab i.p.. In acht von neuen Fällen (89%) konnte der Zeitraum zwischen den Aszitespunktionen verlängert werden (Shah et al., 2011). Die intraperitoneale Injektion scheint die Methode der Wahl zu sein um den Antikörper genau dort zu injizieren wo sich die Aszitesansammlung, getriggert durch die erhöhte VEGF-Konzentration, befindet. Der Wirkungseffekt von Bevacizumab, egal ob alleine verabreicht oder in Kombination mit Paclitaxel i.p., zeigte keine Abhängigkeit von der Art der Injektion. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich, dass die Behandlung von malignem Aszites mit Bevacizumab i.p. eine sehr effektive Alternative zur i.v. Verabreichung des VEGF-Antikörpers darstellt.

Eine weitere Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer gentherapeutischen Behandlung des Ovarialkarzinoms. Gentherapeutische Behandlungsansätze, in denen virale Vektoren für einen Gentransfer genutzt werden, haben in präklinischen Studien verheißungsvolle Ergebnisse erzielt. Aufgrund von Bedenken hinsichtlich der therapeutischen Sicherheit bauten sich die bisherigen gentherapeutischen Ansätze auf nicht replikationsfähigen Viren auf. Bedauerlicherweise zeigte sich in bisherigen klinischen Versuchen eine ineffiziente Tumortransduktion, besonders bei einer sehr ausgeprägten Tumorerkrankung und einer großen Tumormasse. Dies verhinderte oftmals ein klinisches Benefit in diesen Therapieversuchen (Puumalainen et al., 1998). Durch die Anwendung replikationskompetenter Viren, die sich in der Tumormasse ausbreiten, konnte eine verbesserte Penetration erzielt werden. In Hinblick auf gynäkologische Karzinomkrankungen waren Replikationkompetente Adenoviren schon vor 50 Jahren Bestandteil der medizinischen Forschung (Huebner et al., 1956). Bedauerlicherweise zeigt sich im Ovarialkarzinom, wie in vielen anderen Karzinomen, eine variable und oft schwache Expression des CAR-Rezeptors (Rein et al., 2006). Ein weiterer Faktor, der Grund für das Nichtansprechen einer Therapie mit Ad5 CRAds, könnte das Vorhandensein einer großen Menge an malignem Aszites sein. Denn dort befindet sich oftmals eine hohe Zahl an Ad5 CRAds Antikörpern (Raki et al., 2008). Somit könnten eine verstärkte Infektionsfähigkeit der CRAds, keine spezifische Bindung an CAR-Rezeptoren und eine Verringerung der Antikörper eine hilfreiche Verbesserung in der Effizienz der auf onkolytischen Adenoviren

aufbauenden Therapie gegen das Ovarialkarzinom darstellen. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein gezielter Einsatz von Ad5/3MDR1E1 in der Behandlung von chemotherapeutisch vorbehandelten Ovarialkarzinomzellen eine effektive Option darstellt (Rein et al., 2011). Ausgerechnet auf Ovarialkarzinomzellen wird eine hohe Anzahl von Ad3- Rezeptoren exprimiert. Um eine verbesserte Bindung zwischen der Adenovirus-Bindungsregion, dem Fiber-Knob und den Ovarialkarzinomzellen zu erzeugen wurde ein Fiber-Knob Austausch durchgeführt. Die hier eingesetzten Adenoviren vom Serotyp 5 erhielten somit einen Fiber-Knob vom Serotyp 3 (Kanerva et al., 2002a), (Tsuruta et al., 2007). Einen vielversprechenden Ansatz für eine weitere Effektivitätssteigerung der gentherapeutischen Karzinomtherapie stellt die Kombinationstherapie von CRAds mit Zytostatika dar. Diverse klinische Studien konnten einen synergistischen Effekt von onkolytischen Adenoviren und einem Chemotherapeutikum in der Tumorzelllyse aufweisen (You et al., 2000), (Gomez-Manzano et al., 2006), (Mantwill et al., 2006), (Hoffmann et al., 2006), (Raki et al., 2005), (Raki et al., 2008). Die Sicherheit dieser Kombinationstherapie wurde bereits mehrfach demonstriert (Xia et al., 2004), (Raki et al., 2008), (Lu et al., 2004), (Hecht et al., 2003). Ein wichtiger Aspekt in der Kombinationstherapie aus Zytostatika und CRAds ist die unterschiedliche Toxizität der beiden Therapiebestandteile. Zudem zeigen sich keine Kreuzresistenzen zwischen CRAds und Zytostatika, die eine verringerte Entwicklung von resistenten Karzinomzellen hervorrufen. Mehrere Mechanismen, die einen erhöhten therapeutischen Effekt der Kombinationstherapie verursachen, konnten erforscht werden. Durch eine starke Expression des E1A-Gens in den CRAds kann die Sensitivität der Tumorzellen auf die Chemotherapie erhöht werden (Yu et al., 2001), (Lee et al., 2003). Darüberhinaus kann ein Zytostatikum die Replikationsrate der CRAds erhöhen (Yu et al., 2001). Denn der Rezeptorstatus auf den Karzinomzellen wird zuvor dadurch beeinflusst (Raki et al., 2008). Erleiden Patientinnen ein Ovarialkarzinomrezidiv, so zeigt sich hierbei sehr häufig eine Zytostatikaresistenz bei einer anfänglichen Zytostatikasensibilität. Im malignen Ovarialgewebe liegt eine stark erhöhte Expressionsrate von MDR1 Promotoren vor. Dies verursacht einen verstärkten Efflux der Zytostatika aus der Karzinomzelle und somit zu einer erhöhten Resistenzentwicklung (Miller and Ojima, 2001), (Zhou, 2008), (Li et al., 2010a). Durch die spezielle Behandlung mit Ad5/3MDR1E1 kann somit eine gezielte spezifische Wirkung in resistenten Ovarialkarzinomzellen hervorgerufen werden. Um den neuartigen Ansatz einer Kombinationstherapie von Ad5/3MDR1E1 mit Zytostatikum zu untersuchen, wurde hier in dieser Arbeit die klinische Situation eines vorthera-pierten Ovarialkarzinoms nachgebildet. Verwendet wurden die standardmäßig genutzten Substanzen

wie Paclitaxel und Bevacizumab. Untersucht wurde die Effizienz der Kombinationstherapie an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell. SCID Mäuse eignen sich zur Erforschung der CRAd-Transduktion und der viralen Replikation in den Karzinomzellen. Aufgrund der pathologischen Ausbreitung eines Ovarialkarzinoms entlang des Peritoneums fiel die Wahl bei dem Versuchsaufbau auf eine i.p. Verbareichung. In vorherigen Studien konnte bereits bewiesen werden, dass sich somit eine erhöhte Zytostatikakonzentration herbeiführen lässt (Howell et al., 1982, Markman et al., 1992), (Yen et al., 2001). Schon die Einzeltherapie von Ad5/3MDRE1 i.p. und Paclitaxel i.p. führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu der Behandlung mit einem nichtreplikativen Kontrollvirus. Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte eine Effizienzsteigerung der kombinierten Chemo- und Gentherapie nachweise nachgewiesen werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass die durch Zytostatika induzierte Tumorzellapoptose, der durch Adenovirus induzierte Apoptose, überlegen ist (Ingemarsdotter et al., 2010). Zytostatika führen zu keiner Erhöhung der viralen Ausbreitung oder Infektiosität. Bei der Frage nach klinischer Anwendung stellt sich die Frage nach der möglicherweise erhöhten Lebertoxizität. Um dies herauszufinden, wurde in dieser Arbeit die Lebertoxizität einer kombinierten Chemo- und Gentherapie im Mausmodell untersucht. Es ist bekannt, dass es nach einer systemischen Adenovirus-Applikation zu mikroskopisch nachweisbaren Effekten in den Mäuselebern kommt und sich klinische Zeichen einer Lebertoxizität innerhalb einer Woche zeigen (Wrighton et al., 1995), (Jessen et al., 2003). In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte das virale Protein E1A sowohl in den Tumoren als auch in den Lebern nachgewiesen werden. Dies könnte möglicherweise auf einem Kurzzeiteffekt beruhen. Denn in den histopathologischen Untersuchungen konnten keine Anzeichen einer Lebertoxizität nachgewiesen werden. Schlussfolgernd kann man sagen, dass unter Verwendung von etablierten chemo-resistenten Karzinomzelllinien und einem SCID Mausmodell, sich die Kombination aus konditional replizierenden Adenoviren (CRAds) und gebräuchlichen Zytostatika als eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit aufweist. Jedoch sind klinische Untersuchungen nötig, um die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse zu bestätigen.

6 Schlußfolgerungen

In dieser Dissertation wurde an einem Ovarialkarzinom-Mausmodell die Effizienz einer intravenösen versus einer intraperitonealen Injektion von einem VEGF-Antikörper (Bevacizumab) verglichen. Es konnte demonstriert werden, dass eine intraperitoneale Injektion des Antikörpers eine vielversprechende Alternative zu der bisher intravenösen Injektion darstellt. Der Überlebenszeitraum konnte deutlich verlängert und der Bauchumfang signifikant verringert werden.

Bei weiteren Versuchen in dieser Dissertation konnte bewiesen werden, dass konditional replizierende Adenoviren eine neue sichere Behandlungsmöglichkeit des chemoresistenten Ovarialkarzinoms darstellen. Aufgrund einer Modifikation der adenoviralen Fiber durch Einsatz einer 5/3 Fiber-Chimäre kann eine gezielte Infektion der Ovarialkarzinomzellen herbeigeführt werden. Als weiterer Faktor für eine gezielte Infektion der chemoresistenten Ovarialkarzinomzellen wurde der *Multiple Drug Resistance Gen 1 Promotor* (MDR1-Promotor) verwendet. Durch dieses Gen kommt es zu einer schnellen Zytostatikaresistenz der Zellen. Bei einer alleinigen intraperitonealen viralen Therapie mit CRAbs oder bei einer Kombinationstherapie, bestehend aus CRAb, Zytostatikum und/oder Antikörper, konnten die längsten Überlebenszeiträume nachgewiesen werden. Zum Nachweis der spezifischen Infektion der malignen Tumorzellen wurde mittels Immunhistochemie das virale E1A Protein nachgewiesen. Zum Ausschluss einer Lebertoxizität der CRAbs wurden die Lebern histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Alle Ergebnisse in dieser Dissertation zeigen auf, dass eine Therapie mittels VEGF-Antikörper, Zytostatikum und CRAbs eine vielversprechende Alternative für eine zukünftige Therapie des zytostatikaresistenten Ovarialkarzinoms darstellt.

7 Literatur und Quellenverzeichnis

ABAID, L. N., GOLDSTEIN, B. H., LOPEZ, K. L., MICHA, J. P., BROWN, J. V., 3RD, RETTENMAIER, M. A. & MARKMAN, M. **2010**. The prognostic significance of optimal debulking in the setting of a complete clinical response for advanced ovarian carcinoma patients receiving maintenance chemotherapy. *Arch Gynecol Obstet*.

ABOLHODA, A., WILSON, A. E., ROSS, H., DANENBERG, P. V., BURT, M. & SCOTTO, K. W. **1999**. Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 5, 3352-6.

AGHAJANIAN, C., BLANK, S. V., GOFF, B. A., JUDSON, P. L., TENERIELLO, M. G., HUSAIN, A., SOVAK, M. A., YI, J. & NYCUM, L. R. **2012**. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*, 30, 2039-45.

ALBA, R., BOSCH, A. & CHILLON, M. **2005**. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*, 12 Suppl 1, S18-27.

ALVAREZ, A. A., KRIGMAN, H. R., WHITAKER, R. S., DODGE, R. K. & RODRIGUEZ, G. C. **1999**. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5, 587-91.

ARAO, S., SUWA, H., MANDAI, M., TASHIRO, H., MIYAZAKI, K., OKAMURA, H., NOMURA, H., HIAI, H. & FUKUMOTO, M. **1994**. Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer. *Cancer Res*, 54, 1355-9.

ARNBERG, N. **2009**. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol*, 19, 165-78.

AUNER, V., SEHOULI, J., OSKAY-OEZCELIK, G., HORVAT, R., SPEISER, P. & ZEILLINGER, R. **2010**. ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol Oncol*, 117, 198-201.

AYANTUNDE, A. A. & PARSONS, S. L. **2007**. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol*, 18, 945-9.

BAI, F., FENG, J., CHENG, Y., SHI, J., YANG, R. & CUI, H. **2006**. Analysis of gene expression patterns of ovarian cancer cell lines with different metastatic potentials. *Int J Gynecol Cancer*, 16, 202-9.

BAMIAS, A., PIGNATA, S. & PUJADE-LAURINE, E. **2012**. Angiogenesis: a promising therapeutic target for ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 84, 314-26.

BARNETT, B. G., CREWS, C. J. & DOUGLAS, J. T. **2002**. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta*, 1575, 1-14.

BARTON, K. N., PAIELLI, D., ZHANG, Y., KOUL, S., BROWN, S. L., LU, M., SEELY, J., KIM, J. H. & FREYTAG, S. O. **2006**. Second-generation replication-competent oncolytic adenovirus armed with improved suicide genes and ADP gene demonstrates greater efficacy without increased toxicity. *Mol Ther*, 13, 347-56.

BAUERSCHMITZ, G. J., BARKER, S. D. & HEMMINKI, A. **2002a**. Adenoviral gene therapy for cancer: From vectors to targeted and replication competent agents (Review). *Int J Oncol*, 21, 1161-74.

BAUERSCHMITZ, G. J., GUSE, K., KANERVA, A., MENZEL, A., HERRMANN, I., DESMOND, R. A., YAMAMOTO, M., NETTELBECK, D. M., HAKKARAINEN, T., DALL, P., CURIEL, D. T. & HEMMINKI, A. **2006**. Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the *cox2* promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells. *Mol Ther*, 14, 164-74.

BAUERSCHMITZ, G. J., LAM, J. T., KANERVA, A., SUZUKI, K., NETTELBECK, D. M., DMITRIEV, I., KRASNYKH, V., MIKHEEVA, G. V., BARNES, M. N., ALVAREZ, R. D., DALL, P., ALEMANY, R., CURIEL, D. T. & HEMMINKI, A. **2002b**. Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, 62, 1266-70.

BAUERSCHMITZ, G. J., RANKI, T., KANGASNIEMI, L., RIBACKA, C., ERIKSSON, M., PORTEN, M., HERRMANN, I., RISTIMAKI, A., VIRKKUNEN, P., TARKKANEN, M., HAKKARAINEN, T., KANERVA, A., REIN, D., PESONEN, S. & HEMMINKI, A. **2008**. Tissue-specific promoters active in CD44⁺CD24⁻/low breast cancer cells. *Cancer Res*, 68, 5533-9.

BECKER, G., GALANDI, D. & BLUM, H. E. **2006**. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer*, 42, 589-97.

BERAL, V., DOLL, R., HERMON, C., PETO, R. & REEVES, G. **2008**. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*, 371, 303-14.

BERGELSON, J. M., CUNNINGHAM, J. A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E. A., KRITHIVAS, A., HONG, J. S., HORWITZ, M. S., CROWELL, R. L. & FINBERG, R. W. **1997**. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275, 1320-3.

BETT, A. J., HADDARA, W., PREVEC, L. & GRAHAM, F. L. **1994**. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8802-6.

BILBAO, R., GEROLAMI, R., BRALET, M. P., QIAN, C., TRAN, P. L., TENNANT, B., PRIETO, J. & BRECHOT, C. **2000**. Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: the woodchuck animal model. *Cancer Gene Ther*, 7, 657-62.

BREIDENBACH, M., REIN, D. T., EVERTS, M., GLASGOW, J. N., WANG, M., PASSINEAU, M. J., ALVAREZ, R. D., KOROKHOV, N. & CURIEL, D. T. **2005**. Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther*, 12, 187-93.

BREIDENBACH, M., REIN, D. T., MALLMANN, P. & KURBACHER, C. M. **2002**. Individualized long-term chemotherapy for recurrent ovarian cancer after failing high-dose treatment. *Anticancer Drugs*, 13, 173-6.

BREIDENBACH, M., REIN, D. T., WANG, M., NETTELBECK, D. M., HEMMINKI, A., ULASOV, I., RIVERA, A. R., EVERTS, M., ALVAREZ, R. D., DOUGLAS, J. T. & CURIEL, D. T. **2004**. Genetic replacement of the adenovirus shaft fiber reduces liver tropism in ovarian cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*, 15, 509-18.

BRISTOW, R. E., TOMACRUZ, R. S., ARMSTRONG, D. K., TRIMBLE, E. L. & MONTZ, F. J. **2002**. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 20, 1248-59.

BRODY, S. L. & CRYSTAL, R. G. **1994**. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci*, 716, 90-101; discussion 101-3.

BRODY, S. L., JAFFE, H. A., HAN, S. K., WERSTO, R. P. & CRYSTAL, R. G. **1994**. Direct in vivo gene transfer and expression in malignant cells using adenovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 5, 437-47.

BURGER, R. A., SILL, M. W., MONK, B. J., GREER, B. E. & SOROSKY, J. I. **2007**. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 25, 5165-71.

CANNISTRA, S. A., MATULONIS, U. A., PENSON, R. T., HAMBLETON, J., DUPONT, J., MACKAY, H., DOUGLAS, J., BURGER, R. A., ARMSTRONG, D., WENHAM, R. & MCGUIRE, W. **2007**. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol*, 25, 5180-6.

CHEN, H., HAO, J., WANG, L. & LI, Y. **2009**. Coexpression of invasive markers (uPA, CD44) and multiple drug-resistance proteins (MDR1, MRP2) is correlated with epithelial ovarian cancer progression. *Br J Cancer*, 101, 432-40.

CHENG, G., ZHU, H. & SUN, L. **2000**. [The expression of multiple drug resistance associated genes in ovarian cancer]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 35, 87-90.

CHUNG, M. & KOZUCH, P. **2008**. Treatment of malignant ascites. *Curr Treat Options Oncol*, 9, 215-33.

CLAYMAN, G. L., FRANK, D. K., BRUSO, P. A. & GOEPFERT, H. **1999**. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers. *Clin Cancer Res*, 5, 1715-22.

CODY, J. J. & DOUGLAS, J. T. **2009**. Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther*, 16, 473-88.

COLDMAN, A. J. & GOLDIE, J. H. **1987**. Impact of dose-intense chemotherapy on the development of permanent drug resistance. *Semin Oncol*, 14, 29-33.

CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J. P., BOCCIA, J., CASALS, D., BERTINO, J. R. & MELAMED, M. R. **1990**. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem*, 38, 1277-87.

D'ANDRILLI, G., KUMAR, C., SCAMBIA, G. & GIORDANO, A. **2004**. Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res*, 10, 8132-41.

DANTHINNE, X. & IMPERIALE, M. J. **2000**. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther*, 7, 1707-14.

DE VRIES, C., ESCOBEDO, J. A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N. & WILLIAMS, L. T. **1992**. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255, 989-91.

DEUTSCHE KREBSHILFE E.V. **2010**. Bonn. [Accessed].

DIAS, J. D., LIIKANEN, I., GUSE, K., FOLOPPE, J., SLONIECKA, M., DIACONU, I., RANTANEN, V., ERIKSSON, M., HAKKARAINEN, T., LUSKY, M., ERBS, P., ESCUTENAIRE, S., KANERVA, A., PESONEN, S., CERULLO, V. & HEMMINKI, A. **2010**. Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1. *Clin Cancer Res*, 16, 2540-9.

DORER, D. E. & NETTELBECK, D. M. **2009**. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 554-71.

DORMOND, E., PERRIER, M. & KAMEN, A. **2009**. From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? *Biotechnol Adv*, 27, 133-44.

DOUGLAS, J. T., KIM, M., SUMEREL, L. A., CAREY, D. E. & CURIEL, D. T. **2001**. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors. *Cancer Res*, 61, 813-7.

DU BOIS, A., LUCK, H. J., MEIER, W., ADAMS, H. P., MOBUS, V., COSTA, S., BAUKNECHT, T., RICHTER, B., WARM, M., SCHRODER, W., OLBRICHT, S., NITZ, U., JACKISCH, C., EMONS, G., WAGNER, U., KUHN, W. & PFISTERER, J. **2003**. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1320-9.

DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURAIN, E., HARTE, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. **2009**. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115, 1234-44.

EISENKOP, S. M., FRIEDMAN, R. L. & WANG, H. J. **1995**. Secondary cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. A prospective study. *Cancer*, 76, 1606-14.

EITAN, R., LEVINE, D. A., ABU-RUSTUM, N., SONODA, Y., HUH, J. N., FRANKLIN, C. C., STEVENS, T. A., BARAKAT, R. R. & CHI, D. S. **2005**. The clinical significance of malignant pleural effusions in patients with optimally debulked ovarian carcinoma. *Cancer*, 103, 1397-401.

ELLIS, L. M. & HICKLIN, D. J. **2008**. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, 8, 579-91.

ENDTER, C. & DOBNER, T. **2004**. Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, 163-214.

EVOY, D., HIRSCHOWITZ, E. A., NAAMA, H. A., LI, X. K., CRYSTAL, R. G., DALY, J. M. & LIEBERMAN, M. D. **1997**. In vivo adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*, 69, 226-31.

FATHALLA, M. F. **1971**. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, 2, 163.

FERRARA, N. **1999**. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*, 77, 527-43.

FERRARA, N. **2004**. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25, 581-611.

FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. **1997**. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.

FERRARA, N. & HENZEL, W. J. **1989**. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 851-8.

FESSLER, S. P. & YOUNG, C. S. **1998**. Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J Virol*, 72, 4049-56.

FRANCESCHI, S., PARAZZINI, F., NEGRI, E., BOOTH, M., LA VECCHIA, C., BERAL, V., TZONOU, A. & TRICHOPOULOS, D. **1991**. Pooled analysis of 3 European case-control studies of epithelial ovarian cancer: III. Oral contraceptive use. *Int J Cancer*, 49, 61-5.

FUEYO, J., GOMEZ-MANZANO, C., ALEMANY, R., LEE, P. S., MCDONNELL, T. J., MITLIANGA, P., SHI, Y. X., LEVIN, V. A., YUNG, W. K. & KYRITSIS, A. P. **2000**. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19, 2-12.

FUNG-KEE-FUNG, M., OLIVER, T., ELIT, L., OZA, A., HIRTE, H. W. & BRYSON, P. **2007**. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol*, 14, 195-208.

FURMAN, P. A., MCGUIRT, P. V., KELLER, P. M., FYFE, J. A. & ELION, G. B. **1980**. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Virology*, 102, 420-30.

GERBER, H. P. & FERRARA, N. **2005**. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-80.

GLASGOW, J. N., EVERTS, M. & CURIEL, D. T. **2006**. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 13, 830-44.

GOLDSTEIN, L. J., GALSKI, H., FOJO, A., WILLINGHAM, M., LAI, S. L., GAZDAR, A., PIRKER, R., GREEN, A., CRIST, W., BRODEUR, G. M. & ET AL. **1989**. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 81, 116-24.

GOMEZ-MANZANO, C., ALONSO, M. M., YUNG, W. K., MCCORMICK, F., CURIEL, D. T., LANG, F. F., JIANG, H., BEKELE, B. N., ZHOU, X., ALEMANY, R. & FUEYO, J. **2006**. Delta-24 increases the expression and activity of topoisomerase I and enhances the antiglioma effect of irinotecan. *Clin Cancer Res*, 12, 556-62.

GORZIGLIA, M. I., KADAN, M. J., YEI, S., LIM, J., LEE, G. M., LUTHRA, R. & TRAPNELL, B. C. **1996**. Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. *J Virol*, 70, 4173-8.

GOSPODAROWICZ, D., ABRAHAM, J. A. & SCHILLING, J. **1989**. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7311-5.

HALL, K., BLAIR ZAJDEL, M. E. & BLAIR, G. E. **2009**. Defining the role of CD46, CD80 and CD86 in mediating adenovirus type 3 fiber interactions with host cells. *Virology*, 392, 222-9.

HANKINSON, S. E., COLDITZ, G. A., HUNTER, D. J., WILLETT, W. C., STAMPFER, M. J., ROSNER, B., HENNEKENS, C. H. & SPEIZER, F. E. **1995**. A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 76, 284-90.

HARTER, P., DU BOIS, A., HAHMANN, M., HASENBURG, A., BURGESS, A., LOIBL, S., GROPP, M., HUOBER, J., FINK, D., SCHRODER, W., MUENSTEDT, K., SCHMALFELDT, B., EMONS, G., PFISTERER, J., WOLLSCHLAEGER, K., MEERPOHL, H. G., BREITBACH, G. P., TANNER, B. & SEHOULI, J. **2006**. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol*, 13, 1702-10.

HARTGE, P., WHITTEMORE, A. S., ITNYRE, J., MCGOWAN, L. & CRAMER, D. **1994**. Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet Gynecol*, 84, 760-4.

HARUI, A., SUZUKI, S., KOCHANNEK, S. & MITANI, K. **1999**. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol*, 73, 6141-6.

HAVIV, Y. S. & CUIEL, D. T. **2003**. Engineering regulatory elements for conditionally-replicative adeno-viruses. *Curr Gene Ther*, 3, 357-85.

HECHT, J. R., BEDFORD, R., ABBRUZZESE, J. L., LAHOTI, S., REID, T. R., SOETIKNO, R. M., KIRN, D. H. & FREEMAN, S. M. **2003**. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9, 555-61.

HEFLER, L. A., MUSTEA, A., KONGSEN, D., CONCIN, N., TANNER, B., STRICK, R., HEINZE, G., GRIMM, C., SCHUSTER, E., TEMPFER, C., REINTHALLER, A. & ZEILLINGER, R. **2007**. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 898-901.

HEITZ, F., HARTER, P., BARINOFF, J., BEUTEL, B., KANNISTO, P., GRABOWSKI, J. P., HEITZ, J., KURZEDER, C. & DU BOIS, A. **2012**. Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Adv Ther*, 29, 723-35.

HEMMINKI, A. & ALVAREZ, R. D. **2002**. Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs*, 16, 77-87.

HILLE, S., REIN, D. T., RIFFELMANN, M., NEUMANN, R., SARTORIUS, J., PFUTZNER, A., KURBACHER, C. M., SCHONDORF, T. & BREIDENBACH, M. **2006**. Anti-cancer drugs induce *mdr1* gene expression in recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs*, 17, 1041-4.

HOFFMANN, D., BANGEN, J. M., BAYER, W. & WILDNER, O. **2006**. Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer. *Gene Ther*, 13, 1534-44.

HOUGH, C. D., CHO, K. R., ZONDERMAN, A. B., SCHWARTZ, D. R. & MORIN, P. J. **2001**. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res*, 61, 3869-76.

HOUGH, C. D., SHERMAN-BAUST, C. A., PIZER, E. S., MONTZ, F. J., IM, D. D., ROSENSHEIN, N. B., CHO, K. R., RIGGINS, G. J. & MORIN, P. J. **2000**. Large-scale

serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res*, 60, 6281-7.

HOWARTH, J. L., LEE, Y. B. & UNEY, J. B. **2010**. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol Toxicol*, 26, 1-20.

HOWE, J. A., DEMERS, G. W., JOHNSON, D. E., NEUGEBAUER, S. E., PERRY, S. T., VAILLANCOURT, M. T. & FAHA, B. **2000**. Evaluation of E1-mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy [In Process Citation]. *Mol Ther*, 2, 485-95.

HOWELL, S. B., PFEIFLE, C. L., WUNG, W. E., OLSHEN, R. A., LUCAS, W. E., YON, J. L. & GREEN, M. **1982**. Intraperitoneal cisplatin with systemic thiosulfate protection. *Ann Intern Med*, 97, 845-51.

HU, L., HOFMANN, J., ZALOUDEK, C., FERRARA, N., HAMILTON, T. & JAFFE, R. B. **2002**. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol*, 161, 1917-24.

HUARD, J., LOCHMULLER, H., ACSADI, G., JANI, A., MASSIE, B. & KARPATI, G. **1995**. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*, 2, 107-15.

HUEBNER, R. J., ROWE, W. P., SCHATTEN, W. E., SMITH, R. R. & THOMAS, L. B. **1956**. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, 9, 1211-8.

IMPERIALE, M. J. & KOCHANNEK, S. **2004**. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, 335-57.

INGEMARSDOTTER, C. K., BAIRD, S. K., CONNELL, C. M., OBERG, D., HALLDEN, G. & MCNEISH, I. A. **2010**. Low-dose paclitaxel synergizes with oncolytic adenoviruses via mitotic slippage and apoptosis in ovarian cancer. *Oncogene*, 29, 6051-63.

INGRAM, N., MACCORMAC, L. P., OXLEY, N. T., BURNS, P. A. & HALL, G. D. **2010**. Role of cell surface molecules and autologous ascitic fluid in determining efficiency of adenoviral transduction of ovarian cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 17, 684-93.

IRWIN, K. L., WEISS, N. S., LEE, N. C. & PETERSON, H. B. **1991**. Tubal sterilization, hysterectomy, and the subsequent occurrence of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol*, 134, 362-9.

ISRAELI, D., ZIAEI, S., GONIN, P. & GARCIA, L. **2005**. A proposal for the physiological significance of *mdr1* and *Bcrp1/Abcg2* gene expression in normal tissue regeneration and after cancer therapy. *J Theor Biol*, 232, 41-5.

JAIN, R. K. **2001**. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*, 7, 987-9.

JAIN, R. K., DUDA, D. G., CLARK, J. W. & LOEFFLER, J. S. **2006**. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 24-40.

JANICKE, F., HOLSCHER, M., KUHN, W., VON HUGO, R., PACHE, L., SIEWERT, J. R. & GRAEFF, H. **1992**. Radical surgical procedure improves survival time in patients with recurrent ovarian cancer. *Cancer*, 70, 2129-36.

JEE, Y. S., LEE, S. G., LEE, J. C., KIM, M. J., LEE, J. J., KIM, D. Y., PARK, S. W., SUNG, M. W. & HEO, D. S. **2002**. Reduced expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in tumor tissue compared to normal epithelium in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res*, 22, 2629-34.

JESSEN, B. A., MULLINS, J. S., DE PEYSTER, A. & STEVENS, G. J. **2003**. Assessment of hepatocytes and liver slices as in vitro test systems to predict in vivo gene expression. *Toxicol Sci*, 75, 208-22.

JONES, S., WANG, T. L., SHIH IE, M., MAO, T. L., NAKAYAMA, K., RODEN, R., GLAS, R., SLAMON, D., DIAZ, L. A., JR., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K. W., VENCULESCU, V. E. & PAPADOPOULOS, N. **2010**. Frequent mutations of chromatin remodeling gene *ARID1A* in ovarian clear cell carcinoma. *Science*, 330, 228-31.

KANERVA, A. & HEMMINKI, A. **2004**. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer*, 110, 475-80.

KANERVA, A., MIKHEEVA, G. V., KRASNYKH, V., COOLIDGE, C. J., LAM, J. T., MAHASRESHTI, P. J., BARKER, S. D., STRAUGHN, M., BARNES, M. N., ALVAREZ, R. D., HEMMINKI, A. & CURIEL, D. T. **2002a**. Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 8, 275-80.

KANERVA, A., RAKI, M. & HEMMINKI, A. **2007**. Gene therapy of gynaecological diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 1347-61.

KANERVA, A., WANG, M., BAUERSCHMITZ, G. J., LAM, J. T., DESMOND, R. A., BHOOLA, S. M., BARNES, M. N., ALVAREZ, R. D., SIEGAL, G. P., CURIEL, D. T. & HEMMINKI, A. **2002b**. Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther*, 5, 695-704.

KATSUMATA, N., YASUDA, M., TAKAHASHI, F., ISONISHI, S., JOBO, T., AOKI, D., TSUDA, H., SUGIYAMA, T., KODAMA, S., KIMURA, E., OCHIAI, K. & NODA, K. **2009**. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 374, 1331-8.

KAUFF, N. D., DOMCHEK, S. M., FRIEBEL, T. M., ROBSON, M. E., LEE, J., GARBER, J. E., ISAACS, C., EVANS, D. G., LYNCH, H., EELES, R. A., NEUHAUSEN, S. L., DALY, M. B., MATLOFF, E., BLUM, J. L., SABBATINI, P., BARAKAT, R. R., HUDIS, C., NORTON, L., OFFIT, K. & REBBECK, T. R. **2008**. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol*, 26, 1331-7.

KAWASHIMA, H., OGOSE, A., YOSHIZAWA, T., KUWANO, R., HOTTA, Y., HOTTA, T., HATANO, H. & ENDO, N. **2003**. Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in musculoskeletal tumors and mesenchymal tissues: efficacy of adenoviral gene therapy for osteosarcoma. *Cancer Sci*, 94, 70-5.

KELEMEN, L. E. & KOBEL, M. **2011**. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. *Lancet Oncol*, 12, 1071-80.

KERB, R., HOFFMEYER, S. & BRINKMANN, U. **2001**. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*, 2, 51-64.

KOBEL, M., KALLOGER, S. E., BOYD, N., MCKINNEY, S., MEHL, E., PALMER, C., LEUNG, S., BOWEN, N. J., IONESCU, D. N., RAJPUT, A., PRENTICE, L. M., MILLER, D., SANTOS, J., SWENERTON, K., GILKS, C. B. & HUNTSMAN, D. **2008**. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*, 5, e232.

KOBEL, M., KALLOGER, S. E., CARRICK, J., HUNTSMAN, D., ASAD, H., OLIVA, E., EWANOWICH, C. A., SOSLOW, R. A. & GILKS, C. B. **2009**. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol*, 33, 14-21.

KOBOLD, S., HEGEWISCH-BECKER, S., OECHSLE, K., JORDAN, K., BOKEMEYER, C. & ATANACKOVIC, D. **2009**. Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist*, 14, 1242-51.

KRASNYKH, V., DMITRIEV, I., NAVARRO, J. G., BELOUSOVA, N., KASHENTSEVA, E., XIANG, J., DOUGLAS, J. T. & CUIEL, D. T. **2000**. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer Res*, 60, 6784-7.

KUO, K. T., MAO, T. L., JONES, S., VERAS, E., AYHAN, A., WANG, T. L., GLAS, R., SLAMON, D., VELCULESCU, V. E., KUMAN, R. J. & SHIH IE, M. **2009**. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*, 174, 1597-601.

KUO, M. T. **2009**. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 11, 99-133.

KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. **2010**. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, 34, 433-43.

LEE, K. R. & YOUNG, R. H. **2003**. The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: gross and histologic findings in 50 cases. *Am J Surg Pathol*, 27, 281-92.

LEE, W. P., TAI, D. I., TSAI, S. L., YEH, C. T., CHAO, Y., LEE, S. D. & HUNG, M. C. **2003**. Adenovirus type 5 E1A sensitizes hepatocellular carcinoma cells to gemcitabine. *Cancer Res*, 63, 6229-36.

LEE, Y., MIRON, A., DRAPKIN, R., NUCCI, M. R., MEDEIROS, F., SALEEMUDDIN, A., GARBER, J., BIRCH, C., MOU, H., GORDON, R. W., CRAMER, D. W., MCKEON, F. D. & CRUM, C. P. **2007**. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol*, 211, 26-35.

LESLIE, E. M., DEELEY, R. G. & COLE, S. P. **2005**. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204, 216-37.

LEVANON, K., NG, V., PIAO, H. Y., ZHANG, Y., CHANG, M. C., ROH, M. H., KINDELBERGER, D. W., HIRSCH, M. S., CRUM, C. P., MARTO, J. A. & DRAPKIN, R. **2010**. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene*, 29, 1103-13.

LI, S. L., YE, F., CAI, W. J., HU, H. D., HU, P., REN, H., ZHU, F. F. & ZHANG, D. Z. **2010a**. Quantitative proteome analysis of multidrug resistance in human ovarian cancer cell line. *J Cell Biochem*, 109, 625-33.

LI, X., LIU, Y., WEN, Z., LI, C., LU, H., TIAN, M., JIN, K., SUN, L., GAO, P., YANG, E., XU, X., KAN, S., WANG, Z., WANG, Y. & JIN, N. **2010b**. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin in vitro and in vivo. *Mol Cancer*, 9, 10.

LICHTENEGGER, W., SEHOULI, J., BUCHMANN, E., KARAJANEV, C. & WEIDEMANN, H. **1998**. Operative results after primary and secondary debulking-operations in advanced ovarian cancer (AOC). *J Obstet Gynaecol Res*, 24, 447-51.

LICHTENSTEIN, D. L. & WOLD, W. S. **2004**. Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication-competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission. *Cancer Gene Ther*, 11, 819-29.

LIEBER, A., HE, C. Y., MEUSE, L., SCHOWALTER, D., KIRILLOVA, I., WINTHER, B. & KAY, M. A. **1997**. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*, 71, 8798-807.

LIU, Y. H., DI, Y. M., ZHOU, Z. W., MO, S. L. & ZHOU, S. F. **2010**. Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, 115-20.

LU, L., KATSAROS, D., WILEY, A., RIGAULT DE LA LONGRAIS, I. A., PUOPOLO, M. & YU, H. **2007**. Expression of MDR1 in epithelial ovarian cancer and its association with disease progression. *Oncol Res*, 16, 395-403.

LU, W., ZHENG, S., LI, X. F., HUANG, J. J., ZHENG, X. & LI, Z. **2004**. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. *World J Gastroenterol*, 10, 3634-8.

MABUCHI, S., TERAJ, Y., MORISHIGE, K., TANABE-KIMURA, A., SASAKI, H., KANEMURA, M., TSUNETOH, S., TANAKA, Y., SAKATA, M., BURGER, R. A., KIMURA, T. & OHMICH, M. **2008**. Maintenance treatment with bevacizumab prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. *Clin Cancer Res*, 14, 7781-9.

MADORE, J., REN, F., FILALI-MOUHIM, A., SANCHEZ, L., KOBEL, M., TONIN, P. N., HUNTSMAN, D., PROVENCHER, D. M. & MES-MASSON, A. M. **2010**. Characterization of the molecular differences between ovarian endometrioid carcinoma and ovarian serous carcinoma. *J Pathol*, 220, 392-400.

MANTWILL, K., KOHLER-VARGAS, N., BERNSHAUSEN, A., BIELER, A., LAGE, H., KASZUBIAK, A., SUROWIAK, P., DRAVITS, T., TREIBER, U., HARTUNG, R., GANSBACHER, B. & HOLM, P. S. **2006**. Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus: implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 66, 7195-202.

MARKMAN, M., ROWINSKY, E., HAKES, T., REICHMAN, B., JONES, W., LEWIS, J. L., JR., RUBIN, S., CURTIN, J., BARAKAT, R., PHILLIPS, M. & ET AL. **1992**. Phase I trial of intraperitoneal taxol: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 10, 1485-91.

MARTIROSYAN, A., CLENDENING, J. W., GOARD, C. A. & PENN, L. Z. **2010**. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer*, 10, 103.

MATERNA, V., PLEGER, J., HOFFMANN, U. & LAGE, H. **2004**. RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response. *Gynecol Oncol*, 94, 152-60.

MATSUO, K., ENO, M. L., AHN, E. H., SHAHZAD, M. M., IM, D. D., ROSENSHEIN, N. B. & SOOD, A. K. **2010**. Multidrug Resistance Gene (MDR-1) and Risk of Brain Metastasis in Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancer. *Am J Clin Oncol*.

MCCORMICK, F. **2001**. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer*, 1, 130-41.

MCDONALD, D., STOCKWIN, L., MATZOW, T., BLAIR ZAJDEL, M. E. & BLAIR, G. E. **1999**. Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Ther*, 6, 1512-9.

MCMAHON, G. **2000**. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*, 5 Suppl 1, 3-10.

MEINHOLD-HEERLEIN, I. & HAUPTMANN, S. **2014**. The heterogeneity of ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 289, 237-9.

MILLER, M. L. & OJIMA, I. **2001**. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Rec*, 1, 195-211.

MONK, B. J., HUANG, H. Q., BURGER, R. A., MANNEL, R. S., HOMESLEY, H. D., FOWLER, J., GREER, B. E., BOENTE, M., LIANG, S. X. & WENZEL, L. **2013**. Patient reported outcomes of a randomized, placebo-controlled trial of bevacizumab in the front-

line treatment of ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*, 128, 573-8.

MOOLTEN, F. L. **1986**. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*, 46, 5276-81.

MOUNTAIN, A. **2000**. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*, 18, 119-28.

NEMEROW, G. R. & STEWART, P. L. **1999**. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 725-34.

NETTELBECK, D. M. **2008**. Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer. *J Mol Med*, 86, 363-77.

NETTELBECK, D. M., RIVERA, A. A., BALAGUE, C., ALEMANY, R. & CURIEL, D. T. **2002**. Novel Oncolytic Adenoviruses Targeted to Melanoma: Specific Viral Replication and Cytolysis by Expression of E1A Mutants from the Tyrosinase Enhancer/Promoter. *Cancer Res*, 62, 4663-70.

NIELSEN, L. L. & MANEVAL, D. C. **1998**. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther*, 5, 52-63.

NOOTER, K. & HERWEIJER, H. **1991**. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer*, 63, 663-9.

NUMNUM, T. M., ROCCONI, R. P., WHITWORTH, J. & BARNES, M. N. **2006**. The use of bevacizumab to palliate symptomatic ascites in patients with refractory ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 102, 425-8.

ODENING, K. E., LI, W., RUTZ, R., LAUFS, S., FRUEHAUF, S., FISHELSON, Z. & KIRSCHFINK, M. **2009**. Enhanced complement resistance in drug-selected P-glycoprotein expressing multi-drug-resistant ovarian carcinoma cells. *Clin Exp Immunol*, 155, 239-48.

OZOLS, R. F. **2002**. Update on the management of ovarian cancer. *Cancer J*, 8 Suppl 1, S22-30.

PARK, J. Y., EOM, J. M., KIM, D. Y., KIM, J. H., KIM, Y. M., KIM, Y. T. & NAM, J. H. **2010**. Secondary cytoreductive surgery in the management of platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian cancer. *J Surg Oncol*, 101, 418-24.

PEREZ-TOMAS, R. **2006**. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem*, 13, 1859-76.

PERREN, T. J., SWART, A. M., PFISTERER, J., LEDERMANN, J. A., PUJADE-LAURINE, E., KRISTENSEN, G., CAREY, M. S., BEALE, P., CERVANTES, A., KURZEDER, C., DU BOIS, A., SEHOULI, J., KIMMIG, R., STAHL, A., COLLINSON, F., ESSAPEN, S., GOURLEY, C., LORTHOLARY, A., SELLE, F., MIRZA, M. R., LEMINEN, A., PLANTE, M., STARK, D., QIAN, W., PARMAR, M. K. & OZA, A. M. **2011**. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365, 2484-96.

PFISTERER, J., DU BOIS A. **2002**. *Das Ovarialkarzinom*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

PFISTERER, J., HILPERT, F., DU BOIS, A., MEIER, W. & WAGNER, U. **2003**. State-of-the-art first-line treatment of ovarian cancer. *Onkologie*, 26, 446-50.

PHILIPSON, L. & PETTERSSON, R. F. **2004**. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, 87-111.

PIEK, J. M., VAN DIEST, P. J., ZWEEMER, R. P., JANSEN, J. W., POORT-KEESOM, R. J., MENKO, F. H., GILLE, J. J., JONGSMA, A. P., PALS, G., KENEMANS, P. & VERHEIJEN, R. H. **2001**. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol*, 195, 451-6.

PUUMALAINEN, A. M., VAPALAHTI, M., AGRAWAL, R. S., KOSSILA, M., LAUKKANEN, J., LEHTOLAINEN, P., VIITA, H., PALJARVI, L., VANNINEN, R. & YLAHERTTUALA, S. **1998**. Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 9, 1769-74.

QUIRK, J. T. & NATARAJAN, N. **2005**. Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. *Gynecol Oncol*, 97, 519-23.

RAKI, M., KANERVA, A., RISTIMAKI, A., DESMOND, R. A., CHEN, D. T., RANKI, T., SARKIOJA, M., KANGASNIEMI, L. & HEMMINKI, A. **2005**. Combination of gemcitabine and Ad5/3-Delta24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus, for the treatment of ovarian cancer. *Gene Ther*, 12, 1198-205.

RAKI, M., REIN, D. T., KANERVA, A. & HEMMINKI, A. **2006**. Gene transfer approaches for gynecological diseases. *Mol Ther*, 14, 154-63.

RAKI, M., SARKIOJA, M., DESMOND, R. A., CHEN, D. T., BUTZOW, R., HEMMINKI, A. & KANERVA, A. **2008**. Oncolytic adenovirus Ad5/3-delta24 and chemotherapy for treatment of orthotopic ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 108, 166-72.

RASPOLINI, M. R., AMUNNI, G., VILLANUCCI, A., BODDI, V. & TADDEI, G. L. **2005**. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170 (MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival. *Int J Gynecol Cancer*, 15, 255-60.

REBBECK, T. R., KAUFF, N. D. & DOMCHEK, S. M. **2009**. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 101, 80-7.

REIN, D. T., BREIDENBACH, M. & CURIEL, D. T. **2006**. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol*, 2, 137-43.

REIN, D. T., BREIDENBACH, M., KIRBY, T. O., HAN, T., SIEGAL, G. P., BAUERSCHMITZ, G. J., WANG, M., NETTELBECK, D. M., TSURUTA, Y., YAMAMOTO, M., DALL, P., HEMMINKI, A. & CURIEL, D. T. **2005**. A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 1327-35.

REIN, D. T., BREIDENBACH, M., NETTELBECK, D. M., KAWAKAMI, Y., SIEGAL, G. P., HUH, W. K., WANG, M., HEMMINKI, A., BAUERSCHMITZ, G. J., YAMAMOTO, M., ADACHI, Y., TAKAYAMA, K., DALL, P. & CURIEL, D. T. **2004**. Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J Gene Med*, 6, 1281-9.

REIN, D. T., VOLKMER, A., BEYER, I. M., CURIEL, D. T., JANNI, W., DRAGOI, A., HESS, A. P., MAASS, N., BALDUS, S. E., BAUERSCHMITZ, G. & BREIDENBACH, M. **2011**. Treatment of chemotherapy resistant ovarian cancer with a MDR1 targeted oncolytic adenovirus. *Gynecol Oncol*, 123, 138-46.

RELPH, K. L., HARRINGTON, K. J. & PANDHA, H. **2005**. Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol*, 32, 573-82.

REYNOLDS, P., DMITRIEV, I. & CURIEL, D. **1999**. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther*, 6, 1336-9.

ROBERT KOCH INSTITUT. **2010**. Berlin. [Accessed].

ROCCONI, R. P., ZHU, Z. B., STOFF-KHALILI, M., RIVERA, A. A., LU, B., WANG, M., ALVAREZ, R. D., CURIEL, D. T. & MAKHIJA, S. K. **2007**. Treatment of ovarian cancer with a novel dual targeted conditionally replicative adenovirus (CRAd). *Gynecol Oncol*, 105, 113-21.

RODER, G., KEIL, O., PRISACK, H. B., BAUERSCHMITZ, G., HANSTEIN, B., NESTLE-KRAMLING, C., HEMMINKI, A., BENDER, H. G., NIEDERACHER, D. & DALL, P. **2003**. Novel cGMP liposomal vectors mediate efficient gene transfer. *Cancer Gene Ther*, 10, 312-7.

ROTH, J. A. **2006**. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 6, 55-61.

ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., GILMORE, L. K., PARROTT, R. H. & WARD, T. G. **1953**. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84, 570-3.

RUSSELL, I. A., ROYDS, J. A. & BRAITHWAITE, A. W. **2004**. Exploitation of cell cycle and cell death controls by adenoviruses: the road to a productive infection. *Prog Mol Subcell Biol*, 36, 207-43.

SAKAI, R., KAGAWA, S., YAMASAKI, Y., KOJIMA, T., UNO, F., HASHIMOTO, Y., WATANABE, Y., URATA, Y., TANAKA, N. & FUJIWARA, T. **2010**. Preclinical evaluation of differentially targeting dual virotherapy for human solid cancer. *Mol Cancer Ther*, 9, 1884-93.

SAKURAI, F., KAWABATA, K. & MIZUGUCHI, H. **2007**. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr Gene Ther*, 7, 229-38.

SCHONDORF, T., KURBACHER, C. M., GOHRING, U. J., BENZ, C., BECKER, M., SARTORIUS, J., KOLHAGEN, H., MALLMAN, P. & NEUMANN, R. **2002**. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res*, 22, 2199-203.

SCHONDORF, T., NEUMANN, R., BENZ, C., BECKER, M., RIFFELMANN, M., GOHRING, U. J., SARTORIUS, J., VON KONIG, C. H., BREIDENBACH, M., VALTER, M. M., HOOPMANN, M., DI NICOLANTONIO, F. & KURBACHER, C. M. **2003**. Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce *mdr1* gene transcription in ovarian cancer cell lines. *Recent Results Cancer Res*, 161, 111-6.

SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. **1983**. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.

SHAH, D. K., SHIN, B. S., VEITH, J., TOTH, K., BERNACKI, R. J. & BALTHASAR, J. P. **2009**. Use of an anti-vascular endothelial growth factor antibody in a pharmacokinetic strategy to increase the efficacy of intraperitoneal chemotherapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, 580-91.

SHAH, D. K., VEITH, J., BERNACKI, R. J. & BALTHASAR, J. P. **2011**. Evaluation of combined bevacizumab and intraperitoneal carboplatin or paclitaxel therapy in a mouse model of ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*.

SHARMA, A., TANDON, M., BANGARI, D. S. & MITTAL, S. K. **2009**. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Curr Drug ther*, 4, 117-138.

SHORT, J. J., PEREBOEV, A. V., KAWAKAMI, Y., VASU, C., HOLTERMAN, M. J. & CURIEL, D. T. **2004**. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology*, 322, 349-59.

SIDDIQUI, G. K., MACLEAN, A. B., ELMASRY, K., WONG TE FONG, A., MORRIS, R. W., RASHID, M., BEGENT, R. H. & BOXER, G. M. **2011**. Immunohistochemical expression of VEGF predicts response to platinum based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Angiogenesis*.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. 2013. Cancer statistics, **2013**. *CA Cancer J Clin*, 63, 11-30.

STARK, D., NANKIVELL, M., PUJADE-LAURAIN, E., KRISTENSEN, G., ELIT, L., STOCKLER, M., HILPERT, F., CERVANTES, A., BROWN, J., LANCELEY, A., VELIKOVA, G., SABATE, E., PFISTERER, J., CAREY, M. S., BEALE, P., QIAN, W., SWART, A. M., OZA, A. & PERREN, T. **2013**. Standard chemotherapy with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer: quality-of-life outcomes from the International Collaboration on Ovarian Neoplasms (ICON7) phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*, 14, 236-43.

STOFF-KHALILI, M. A., RIVERA, A. A., NEDELJKOVIC-KUREPA, A., DEBENEDETTI, A., LI, X. L., ODAKA, Y., PODDUTURI, J., SIBLEY, D. A., SIEGAL, G. P., STOFF, A., YOUNG, S., ZHU, Z. B., CURIEL, D. T. & MATHIS, J. M. **2008**. Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control. *Breast Cancer Res Treat*, 108, 43-55.

SUGAWARA, I., AKIYAMA, S., SCHEPER, R. J. & ITOYAMA, S. **1997**. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett*, 112, 23-31.

TAKAFUJI, E. T., GAYDOS, J. C., ALLEN, R. G. & TOP, F. H., JR. **1979**. Simultaneous administration of live, enteric-coated adenovirus types 4, 7 and 21 vaccines: safety and immunogenicity. *J Infect Dis*, 140, 48-53.

TANAKA, T., KUROKI, M., HAMADA, H., KATO, K., KINUGASA, T., SHIBAGUCHI, H. & ZHAO, J. **2007**. Cancer-targeting gene therapy using tropism-modified adenovirus. *Anticancer Res*, 27, 3679-84.

TENTES, A. A., KORAKIANITIS, O. S., KAKOLYRIS, S., KYZIRIDIS, D., VELIOVITS, D., KARAGIOZOGLOU, C., SGOURIDOU, E. & MOUSTAKAS, K. **2010**. Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy in recurrent ovarian cancer. *Tumori*, 96, 411-6.

TERMAN, B. I., DOUGHER-VERMAZEN, M., CARRION, M. E., DIMITROV, D., ARMELLINO, D. C., GOSPODAROWICZ, D. & BOHLEN, P. **1992**. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 187, 1579-86.

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE. **2015**. Available: www.wiley.co.uk/gen-med/clinical [Accessed].

TISCHER, E., GOSPODAROWICZ, D., MITCHELL, R., SILVA, M., SCHILLING, J., LAU, K., CRISP, T., FIDDES, J. C. & ABRAHAM, J. A. **1989**. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun*, 165, 1198-206.

TOMKO, R. P., XU, R. & PHILIPSON, L. **1997**. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3352-6.

TSURUTA, Y., PEREBOEVA, L., GLASGOW, J. N., REIN, D. T., KAWAKAMI, Y., ALVAREZ, R. D., ROCCONI, R. P., SIEGAL, G. P., DENT, P., FISHER, P. B. & CURIEL, D. T. **2007**. A mosaic fiber adenovirus serotype 5 vector containing reovirus sigma 1 and adenovirus serotype 3 knob fibers increases transduction in an ovarian cancer ex vivo system via a coxsackie and adenovirus receptor-independent pathway. *Clin Cancer Res*, 13, 2777-83.

VAN DER EB, M. M., CRAMER, S. J., VERGOUWE, Y., SCHAGEN, F. H., VAN KRIEKEN, J. H., VAN DER EB, A. J., RINKES, I. H., VAN DE VELDE, C. J. & HOEBEN, R. C. **1998**. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther*, 5, 451-8.

VAN DER KOLK, D. M., DE BOCK, G. H., LEEGTE, B. K., SCHAAPVELD, M., MOURITS, M. J., DE VRIES, J., VAN DER HOUT, A. H. & OOSTERWIJK, J. C. **2010**. Penetration of breast cancer, ovarian cancer and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 families: high cancer incidence at older age. *Breast Cancer Res Treat.*

VAN GEER, M. A., BREVOORD, D., KUHLMANN, K. F., BAKKER, C. T., MIZUGUCHI, H., WESSELING, J. G., TEN KATE, F. J., GOUMA, D. J., OUDE ELFERINK, R. P. & BOSMA, P. J. **2010**. A fiber modified adenovirus vector that targets to the EphrinA2 receptor reveals enhanced gene transfer to ex vivo pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 36, 233-44.

VARGA, M. J., WEIBULL, C. & EVERITT, E. **1991**. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol*, 65, 6061-70.

VOLPERS, C. & KOCHANNEK, S. **2004**. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 6 Suppl 1, S164-71.

VORBURGER, S. A. & HUNT, K. K. **2002**. Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, 7, 46-59.

WANG, H. G., MORAN, E. & YACIUK, P. **1995**. E1A promotes association between p300 and pRB in multimeric complexes required for normal biological activity. *J Virol*, 69, 7917-24.

WHITTEMORE, A. S., HARRIS, R. & ITNYRE, J. **1992**. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol*, 136, 1184-203.

WICKHAM, T. J., MATHIAS, P., CHERESH, D. A. & NEMEROW, G. R. **1993**. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73, 309-19.

WIEGAND, K. C., SHAH, S. P., AL-AGHA, O. M., ZHAO, Y., TSE, K., ZENG, T., SENZ, J., MCCONECHY, M. K., ANGLÉSIO, M. S., KALLOGER, S. E., YANG, W., HERAVI-MOUSSAVI, A., GIULIANI, R., CHOW, C., FEE, J., ZAYED, A., PRENTICE, L., MELNYK, N., TURASHVILI, G., DELANEY, A. D., MADORE, J., YIP, S.,

MCPHERSON, A. W., HA, G., BELL, L., FEREDAY, S., TAM, A., GALLETTA, L., TONIN, P. N., PROVENCHER, D., MILLER, D., JONES, S. J., MOORE, R. A., MORIN, G. B., OLOUMI, A., BOYD, N., APARICIO, S. A., SHIH IE, M., MES-MASSON, A. M., BOWTELL, D. D., HIRST, M., GILKS, B., MARRA, M. A. & HUNTSMAN, D. G. **2010**. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*, 363, 1532-43.

WIMBERGER, P., LEHMANN, N., KIMMIG, R., BURGESS, A., MEIER, W. & DU BOIS, A. **2007**. Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR). *Gynecol Oncol*, 106, 69-74.

WONG, H. H., LEMOINE, N. R. & WANG, Y. **2010**. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses*, 2, 78-106.

WOOD, M., PERROTTE, P., ONISHI, E., HARPER, M. E., DINNEY, C., PAGLIARO, L. & WILSON, D. R. **1999**. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther*, 6, 367-72.

WRIGHTON, S. A., RING, B. J. & VANDENBRANDEN, M. **1995**. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicol Pathol*, 23, 199-208.

XIA, Z. J., CHANG, J. H., ZHANG, L., JIANG, W. Q., GUAN, Z. Z., LIU, J. W., ZHANG, Y., HU, X. H., WU, G. H., WANG, H. Q., CHEN, Z. C., CHEN, J. C., ZHOU, Q. H., LU, J. W., FAN, Q. X., HUANG, J. J. & ZHENG, X. **2004**. [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, 1666-70.

YEN, M. S., JUANG, C. M., LAI, C. R., CHAO, G. C., NG, H. T. & YUAN, C. C. **2001**. Intraperitoneal cisplatin-based chemotherapy vs. intravenous cisplatin-based chemotherapy for stage III optimally cytoreduced epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 72, 55-60.

YOSHIKAWA, M., ITO, A., ISHIKAWA, T. & IKEGAMI, Y. **2004**. [Drug resistance mediated by ABC transporters]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 31, 1-6.

YOU, L., YANG, C. T. & JABLONS, D. M. **2000**. ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients. *Cancer Res*, 60, 1009-13.

YU, D. C., CHEN, Y., DILLEY, J., LI, Y., EMBRY, M., ZHANG, H., NGUYEN, N., AMIN, P., OH, J. & HENDERSON, D. R. **2001**. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res*, 61, 517-25.

YUKITA, A., ASANO, M., OKAMOTO, T., MIZUTANI, S. & SUZUKI, H. **2000**. Suppression of ascites formation and re-accumulation associated with human ovarian cancer by an anti-VPF monoclonal antibody in vivo. *Anticancer Res*, 20, 155-60.

ZAINO, R. J., BRADY, M. F., LELE, S. M., MICHAEL, H., GREER, B. & BOOKMAN, M. A. **2011**. Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*, 117, 554-62.

ZEBROWSKI, B. K., LIU, W., RAMIREZ, K., AKAGI, Y., MILLS, G. B. & ELLIS, L. M. **1999**. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol*, 6, 373-8.

ZHANG, J. F., WEI, F., WANG, H. P., LI, H. M., QIU, W., REN, P. K., CHEN, X. F. & HUANG, Q. **2010**. Potent anti-tumor activity of telomerase-dependent and HSV-TK armed oncolytic adenovirus for non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 52.

ZHOU, S. F. **2008**. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*, 38, 802-32.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer CRAd Replikationszyklus	12
Abbildung 2:	Formel zur Berechnung der Zellzahl	21
Abbildung 3:	Maus aus der Kontrollgruppe K, kein Tumorwachstum, kein Aszites	27
Abbildung 4:	Maus mit blutigem Aszites und intraperitonealem Tumor (Gruppe 1)	27
Abbildung 5:	Maus mit intraperitonealem Tumorwachstum und blutigem Aszites (Gruppe 3)	28
Abbildung 6:	Kaplan-Meier Überlebenskurve nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie	40
Abbildung 7:	Gewicht der Mäuse nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie	41
Abbildung 8:	Querschnittsfläche Abdomen nach Behandlung mit Bevacizumab, Paclitaxel oder einer Kombinationstherapie	42
Abbildung 9:	Histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes, Therapie mit Bevacizumab	44
Abbildung 10:	Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes, Therapie mit Bevacizumab	46
Abbildung 11:	Kaplan-Meier Überlebenskurve, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	49
Abbildung 12:	Gewicht zum Todeszeitpunkt, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	50
Abbildung 13:	Querschnittsfläche Abdomen, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	51
Abbildung 14:	Histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	53
Abbildung 15:	Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	55
Abbildung 16:	Histopathologische Untersuchung der Leber, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	57
Abbildung 17:	Immunhistochemische Untersuchung der Leber, Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	58

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Untersuchung der Effizienz einer intravenösen versus intraperitonealer Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab	24
Tabelle 2:	Untersuchung einer Kombinationstherapie mit onkolytischem Adenovirus, Paclitaxel und Bevacizumab	25
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien	29
Tabelle 4:	Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner 1987	35
Tabelle 5:	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien	36
Tabelle 6:	Zusammenfassung der Histologischen Untersuchung	45
Tabelle 7:	Zusammenfassung der Histologischen Untersuchung	54
Tabelle 8:	Zusammenfassung der IR Score Ergebnisse	59

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Daniel Rein für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas und die stetige Betreuung während meiner Erarbeitung des Themas.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anne Kathrin Volkmer bedanken, die mir immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft haben mich stets motiviert.

Herrn PD Dr. Dr. med. Gerd Bauerschmitz danke ich für die wissenschaftliche und technische Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Für die Unterstützung im Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik danke ich ganz herzlich Herrn Dr. rer. nat. Dieter Niederacher; er war immer bereit, mir mit Ratschlägen im Labor zur Seite zu stehen.

Für die tatkräftige Unterstützung im Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik möchte ich mich bei Frau Dagmar Hohmann und Frau Ursula Grolik bedanken. Sie haben viel Zeit und Mühe investiert, mich bei meinen Versuchen im Labor zu unterstützen und anzulernen.

Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Daniela Ziegler, die sich mir und meinen Versuchen im UniKid Labor der Universitätsklinik Düsseldorf mit viel Engagement und Geduld gewidmet hat.

Von ganzem Herzen danke ich auch meinen Eltern; sie haben mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich stets beim Studium und bei dieser Arbeit unterstützt.

Meinem Bruder Philipp danke ich für die Anfertigung und Korrekturen der Abbildungen in dieser Arbeit.

Ebenso geht ein ganz besonderer Dank an meinen Freund Sebastian, der mich stets seelisch und moralisch bei der Anfertigung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, 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.

15.10.2015 Anne-Kathrin Belz geb. Welter