

**Charakterisierung konditional replizierender Adenoviren
zur tumorspezifischen onkolytischen Gentherapie bei
gynäkologischen Malignomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von

Artur Menzel

aus Breslau

März 2008

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik
Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. med. H.G. Bender
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gynäkologische Krebserkrankungen	1
1.2 Klassische Therapieoptionen	4
1.3 Innovative Therapien.....	5
1.4 Gentherapie	6
1.5 Adenovirale Gentherapie	9
1.5.1 Morphologie des Adenovirus	9
1.5.2 Infektion und adenoviraler Replikationszyklus.....	11
1.5.3 Adenovirale Vektoren in gentherapeutischen Anwendungen.....	12
1.5.4 Strategien adenoviraler Gentherapieansätze in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen	15
1.5.5 Targeting adenoviraler Vektoren in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen	17
• 1.5.5.1 Transkriptionelles Targeting.....	17
• 1.5.5.2 Transduktionelles Targeting.....	20
1.5.6 Onkolytische Virotherapie mittels konditional replizierender Adenoviren (CRAds)	23
1.5.7 Cox2-Promotor gesteuerte, tropismusmodifizierte CRAds für die onkolytische Virotherapie gynäkologischer Malignome.....	26
• 1.5.7.1 Der tumorspezifische Cox2-Promotor	26
• 1.5.7.2 Die tumorspezifische 5/3-Fiberchimerisierung	29
• 1.5.7.3 Tumorspezifische E1A-Deletionen.....	30
1.6 Zielsetzung der Arbeit	32
 2. Material und Methoden.....	 33
2.1 Reagenzien und Lösungen	33
2.1.1 Reagenzien-Kits	34
2.2 Zellkultur.....	34

2.2.1 Verwendete Zelllinien	35
2.2.2. Kultivierung der Zellen.....	36
2.2.4. Subkultivierung	36
2.2.5. Kryokonservierung.....	37
2.2.6 Isolierung humaner Mammaepithelzellen (HMEC) aus Reduktionsplastiken.....	37
2.2.7 Isolierung humaner Blut-Monozyten (PBMC) aus Frischblut.....	38
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	39
2.3.1. RNA-Isolation	39
2.3.2. cDNA-Synthese	39
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	40
• 2.3.3.1. Qualitätskontrolle der cDNA durch β -Aktin-PCR.....	41
• 2.3.3.3. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression.....	42
• 2.3.3.4. Real-Time PCR zur Quantifizierung adenoviraler Partikel	43
2.3.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	45
2.3.5 Elektrophoretische Auftrennungsmethoden	46
• 2.3.5.1. Elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F.	46
• 2.3.5.2. Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen.....	47
2.4 Virologische Methoden.....	48
2.4.1 Verwendete Adenoviren	48
2.4.2 Virusproduktion mittels Large Scale Virus Preparation	49
2.4.3 Freisetzung der Adenoviren	50
2.4.4 Aufreinigung und Dialyse.....	50
2.4.5 Titerbestimmung.....	51
• 2.4.5.1 OD-Messung zur Bestimmung der gesamten Viruspartikelzahl.....	51
• 2.4.5.2 Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID ₅₀)	51
• 2.4.5.3 Qualität der Viruspräparation	53
2.5 Sonstige in vitro Methoden.....	53
2.5.1 Immunhistochemie	53

• 2.5.1.1 Anzucht von Zellen auf Objektträgern	53
• 2.5.1.2 Immunhistochemische Färbung	53
2.5.2 Luziferase-Reportergen-Assay	54
2.5.3 Kristall-Violett-Assay	56
2.5.4 Zytotoxizitäts-Assays	56
2.6 In vivo Untersuchung: Tierversuche	58
2.6.1 Subkutanes Ovarialkarzinom-Mausmodell	58
2.6.2 Intraperitoneales Ovarialkarzinom-Mausmodell	59
2.7 Statistik	59
3. Ergebnisse	60
3.1 Charakterisierung des Cox2-Promotors im Hinblick auf die Steuerung von CRAds (Transkriptionelles Targeting)	60
3.1.1 Analyse der Cox2-Genexpression in Zervix- und Mammakarzinomen	60
• 3.1.1.1 Cox2-Genexpression auf Proteinebene	61
• 3.1.1.2 Cox2-Genexpression auf mRNA-Ebene	61
3.1.2 Analyse der Cox2-Promotoraktivität im Luziferase-Reportergen-Assay	67
3.2 Verbesserung der adenoviralen Infektionsrate durch Fibermodifikation (Transduktionelles Targeting)	69
3.3 Charakterisierung Cox2-gesteuerter, fibermodifizierter CRAds in vitro und in vivo	71
3.3.1 Zytotoxizitätsprofile der sechs Cox2-CRAds in Zervix-, Mamma- und Ovarialkarzinomen	72
• 3.3.1.1 Onkolytisches Potential der Cox2-CRAds in CeCa, MaCa und OvCa	74
• 3.3.1.2 Die Promotorvarianten Cox2L und Cox2M im Vergleich	83
• 3.3.1.3 Die Deletionsvarianten E1A Δ 24 und E1A Δ 2 Δ 24 im Vergleich	84
3.3.2 Replikation von Ad5/3cox2L Δ 24 in Abhängigkeit vom Cox2-Status	87
• 3.3.2.1 Quantitative Real-Time PCR	87
• 3.3.2.2 Biologischer Titertest (TCID ₅₀)	95

3.3.3 Anti-Tumor Effekt der Cox2-CRAbs in vivo	97
• 3.3.3.1 Hemmung des Tumorwachstums durch Cox2-CRAbs in vivo	97
• 3.3.3.2 Erhöhung der Überlebenszeit durch Cox2-CRAbs in vivo	99
4. Diskussion.....	101
4.1 Kontrolle der viralen Replikation durch den Einsatz eines heterologen Promotors (transkriptionelles Targeting)	105
4.2 E1A-Mutationen erhöhen die Sicherheit der onkolytischen Virotherapie	111
4.3 Gezielte Infektion durch transduktionelles Targeting	113
4.4 Tiermodelle und ihre Limitierung.....	117
5. Zusammenfassung	120
6. Summary	121
7. Literatur	122
8. Abkürzungsverzeichnis	135
9. Danksagung	137
10. Erklärung	138

1. Einleitung

1.1 Gynäkologische Krebserkrankungen

Maligne Tumorerkrankungen sind nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und generell in Ländern der industrialisierten Welt. Die Zahl der jährlich auftretenden Krebsneuerkrankungen in Deutschland wird auf ca. 218.250 Erkrankungen bei Männern und ca. 206.000 bei Frauen geschätzt (Schätzung für 2002 nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister und des Robert-Koch-Instituts von 2006).

Gynäkologische Tumorerkrankungen bilden in der weiblichen Bevölkerung der westlichen Industrienationen die größte Gruppe maligner Erkrankungen und stellen in Deutschland rund 40% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen dar (2002: 82.950 Fälle). Überdies sind gynäkologische Malignome in den Industrienationen die häufigste Todesursache bei Frauen unter 50 Jahren, sie sind in Deutschland für ca. 28% aller Krebssterbefälle bei Frauen verantwortlich (2002: 28.100 Fälle).

Die häufigste Krebserkrankung bei Frauen ist Brustkrebs mit 55.150 Fällen pro Jahr bzw. rund einem Viertel aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland (Tab. 1.1). Die Inzidenz ist in Europa in den letzten 20 Jahren deutlich angestiegen, so dass nunmehr eine Erkrankung jeder 7. Frau am Mammakarzinom im Laufe ihres Lebens angenommen wird (Deutsche Krebsgesellschaft, 2005). Männer sind wesentlich seltener von Brustkrebs betroffen (ca. 400 Fälle p.a. in Deutschland).

Im Gegensatz zur Häufigkeit ist die Mortalität beim Mammakarzinom seit Mitte der 1990er Jahre leicht gesunken (2002: 17.780 Krebssterbefälle). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt aufgrund intensiver Vorsorgeuntersuchungen und verbesserten Früherkennungsangeboten mittlerweile 79%.

Da Mammakarzinome im Frühstadium keine Symptome oder Beschwerden verursachen, ist es zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufig schon zur Metastasierung gekommen. Aus diesem Grund wird der operative Eingriff in der Regel mit anderen Therapien (Bestrahlung, Chemotherapie, Hormontherapie) kombiniert.

Krebserkrankungen der Eierstöcke (Ovarialkarzinom) treten jährlich bei ca. 9.950 Frauen in Deutschland auf. Damit entfallen auf diese Erkrankung 4,8% aller bösartigen

Neubildungen bei Frauen. Das Ovarialkarzinom wird in der Regel in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, hat die schlechteste Prognose aller gynäkologischen Malignome und führt zu ca. 5900 Krebssterbefällen pro Jahr.

In den letzten 20 Jahren sind die Erkrankungsraten in Deutschland nahezu konstant geblieben, dagegen hat die Sterblichkeit seit den 1980er Jahren leicht abgenommen. Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane ist die Prognose für Eierstockkrebs sehr schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur etwa 41 %.

Problematisch bleibt trotz deutlich verbesserter Therapieregime die oftmals sehr späte Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms. Die Erkrankung verläuft zu Beginn in der Regel ohne das Auftreten von Frühsymptomen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose besteht dann häufig (in ca. 2 von 3 Fällen) bereits ein fortgeschrittener Tumor, der intraperitoneal in der Bauchhöhle oder systemisch Metastasen gebildet hat. Auch treten nach erfolgreicher Erstbehandlung häufig Rezidive auf, so dass die langfristige Überlebensrate kaum 15-30% überschreitet.

Rund 10 % aller Ovarialkrebserkrankungen, zumeist vom Typ des Keimzelltumors, treten bereits unter 45 Jahren auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren.

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in der operativen Entfernung des Tumors in Kombination mit einer Chemotherapie. Im Schnitt kommt es jedoch bei jeder zweiten Patientin zum Wiederauftreten der Erkrankung (Tumorzentrum München, 2004).

Jährlich erkranken derzeit schätzungsweise 6.500 Frauen in Deutschland an Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom). Der Anteil des Zervixkarzinoms an allen Krebsneuerkrankungen der Frau liegt damit bei 3,2%.

In den 1970er Jahren war das Zervixkarzinom noch die häufigste Krebserkrankung der Frau. Gebärmutterhalskrebs entwickelt sich über einen längeren Zeitraum und über klar definierte Vorstufen (Dysplasie), die in abgestufter Form der Vorsorgeuntersuchung zugänglich sind. Seit der Einführung des gesetzlichen Früherkennungsprogramms 1971 ist für Frauen ab 20 Jahren der Abstrich von Zellen am Gebärmutterhals Teil des Angebots der gesetzlichen Krebsfrüherkennung (PAP-Abstrich). Seit dieser Zeit ist eine Abnahme der Zervixkarzinom-Inzidenz und -Mortalität zu beobachten. Mittlerweile ist es durch die regelmäßigen Früherkennungsuntersuchungen auf Platz zehn der Krebserkrankungen bei Frauen zurückgefallen.

Im Jahre 2002 starben in Deutschland 1763 Patientinnen an Gebärmutterhalskrebs.

Die Überlebensaussichten bei einer fortgeschrittenen Erkrankung (invasives Karzinom) blieben während der letzten Jahrzehnte nahezu unverändert bei einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 67%.

Seit Herbst 2006 ist in Deutschland der erste Impfstoff gegen die vier häufigsten humanen Papillomvirustypen erhältlich, die in 70% aller Fälle an der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs beteiligt sind. Der Impfstoff Gardasil® schützt vor der Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs und dessen Vorstufen (HPV 16 und 18), sowie vor der Entstehung von Genitalwarzen (HPV 6 und 11). In drei von zehn Tumorproben finden sich jedoch andere, seltenere HPV-Typen, vor denen die Impfung keinen Schutz bietet. Der HPV-Impfstoff wirkt nur vorbeugend gegen die Infektion mit den HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 und ist nicht zur Behandlung von bereits bestehenden Zellveränderungen am Gebärmutterhals oder zur Therapie des Zervixkarzinoms geeignet. Ende 2007 wurde in der Europäischen Union außerdem ein weiterer Impfstoff zugelassen (Cervarix®), der sich ausschließlich gegen die HPV-Typen 16 und 18 richtet.

Frühe Erkrankungsstadien sind in der Regel gut durch Operation und Strahlentherapie behandelbar. Im Gegensatz dazu sind die Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Zervixkarzinomen bislang weiterhin unzureichend, da die meisten Tumore Chemotherapie-resistent sind (Lea et al., 2002).

Aufgrund der hohen Inzidenz von Brustkrebsfällen und den unzureichenden Therapieoptionen für späte Erkrankungsstadien des Ovarial- und Zervixkarzinoms gehört die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung dieser bösartigen Erkrankungen zu den wichtigsten Forschungsgebieten der gynäkologischen Onkologie.

Tab. 1.1: Epidemiologie des Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinoms in Deutschland (Schätzung für 2002 nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister und des Robert-Koch-Instituts von 2006)

	Mamma	Ovar	Zervix
Krebsneuerkrankungen p.a.	55.150	9.950	6.500
Anteil an Krebsneuerkrankungen	26,8%	4,8%	3,2%
Sterbefälle p.a.	17.780	5.910	1.763
Anteil an Krebssterbefällen	17,8%	5,9%	1,8%
5-Jahres-Überlebensrate	79%	41%	67%

1.2 Klassische Therapieoptionen

Die klassischen Behandlungsmethoden bei Krebserkrankungen sind Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Dabei ist die Wahl der Therapieform abhängig von Art und Stadium des Primärtumors. In der Regel werden verschiedene Therapien kombiniert, um synergistische Effekte zu erzielen.

Die primäre Maßnahme besteht aus der möglichst vollständigen operativen Entfernung des Tumors. Hierbei werden auch die Umgebung des Tumors und häufig betroffene Organe (beispielsweise benachbarte Lymphknoten) auf Tumorherde untersucht bzw. entfernt. Ein operativer Eingriff reduziert zwar die Tumorlast, ist jedoch bei fortgeschrittener Erkrankung zumeist nicht ausreichend, um eine Heilung zu erzielen, da unerkannte Tumorreste zu einer Rezidivierung (Wiederauftreten der Tumorerkrankung) führen können. Aus diesem Grund werden in der Regel anschließend Bestrahlungen mit ionisierender Strahlung oder eine Chemotherapie mit Zytostatika durchgeführt, um eventuell zurückgebliebene minimale Tumorreste bzw. systemische Mikrometastasen, die in größerer Entfernung des Primärtumors vorliegen können, zu zerstören.

Eine Ergänzung der genannten Therapieoptionen stellt die Hormontherapie dar. Dabei wird die Wirkung bestimmter Hormone wie Östrogen oder Progesteron, die das Tumorwachstum fördern, minimiert. Zu diesem Zweck werden Substanzen eingesetzt, die entweder die zellulären Hormonrezeptoren blockieren oder direkt die Produktion des jeweiligen Hormons inhibieren.

Trotz stetiger Entwicklung neuer Substanzen für die Chemo- und Hormontherapie und der synergistischen Wirkeffekte durch Kombination unterschiedlicher Strategien ist die Prognose bislang in vielen Fällen weiterhin unzureichend.

Nicht nur, dass Rezidivbildung weiterhin ein großes Problem darstellt, es treten bei einer großen Anzahl von Patienten Resistenzen gegenüber den eingesetzten zytostatischen Wirkstoffen auf. Zudem wäre eine höhere Selektivität wünschenswert, um die teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen zu reduzieren ein höheres Therapieansprechen zu erreichen.

1.3 Innovative Therapien

Klassische Therapieansätze mit Operation und anschließender Bestrahlung und Chemotherapie führen zwar zu einer Reduzierung der Tumorlast, können allerdings geringe Tumorreste und Mikrometastasen oft nicht erreichen. Die minimal-residuale Tumorerkrankung bedarf also ergänzender, alternativer Behandlungsmethoden, um die Gefahr eines Rezidivs möglichst effizient zu verringern und die Prognose betroffener Patientinnen zu verbessern.

Ein wertvolles Instrument in diesem Zusammenhang ist die immunologische Krebstherapie, die eine Steigerung der Immunantwort auf Tumorzellen bezweckt. Maligne Zellen entkommen durch unterschiedliche Strategien der Immunabwehr des Körpers. Ein Verlust der Immunogenität von Tumorzellen wird beispielsweise durch Abspaltung immunogener Antigene und der daraus resultierenden Blockade der Antikörper und Effektor-T-Zellen verursacht (Antigen-Shedding). Es können auch Defekte im MHC-Komplex auftreten. Problematisch ist auch die Sekretion immunsupprimierender Faktoren durch Tumorzellen, die die Funktion der T-Zellen blockiert.

Im Rahmen einer Immuntherapie werden Expression und Ausschüttung bestimmter Botenstoffe (Immunmodulatoren) wie Zytokine oder Interferone induziert, um eine Aktivierung des Immunsystems gegen die Tumorzellen zu erreichen. Für die Therapie des Ovarialkarzinoms wurde Interferon- γ erfolgreich getestet, das in Kombination mit Cisplatin einen Therapievorteil gegenüber der Platin-Monotherapie zeigte (Windbichler et al., 2000).

Darüber hinaus können monoklonale Antikörper eingesetzt werden, um die Signaltransduktion im Tumorgewebe zu inhibieren. Avastin[®] gehört zu den Angiogenese-Inhibitoren, die das Wachstum von Blutgefäßen zum Tumorgewebe hemmen. Dieser monoklonale Anti-VEGF-Antikörper (*vascular endothelial growth factor*) blockiert einen Rezeptor, über den entsprechende Wachstumssignale übermittelt werden, und wird mit Erfolg klinisch eingesetzt. Für die Immuntherapie des Mammakarzinoms steht der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) zur Verfügung, der an den Wachstumsrezeptor HER2/neu (*human epidermal growth receptor 2*, auch erbB-2) bindet und zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation führt. Andere Behandlungsstrategien zielen durch eine Hemmung der Wachstumsfaktoren direkt auf die Signaltransduktion der Tumorzellen ab.

1.4 Gentherapie

Das wachsende Verständnis der molekularen Tumorbilogie ermöglicht die neueste Entwicklung auf dem Gebiet innovativer Behandlungsmöglichkeiten, die Gentherapie. Dabei wird ein so genanntes therapeutisches Gen, dessen Genprodukt sich positiv auf den Verlauf der jeweiligen Erkrankung auswirken soll, in die Zielzelle eingeschleust. So können beispielsweise Gendefekte, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind, kompensiert werden. Der große Vorteil gentherapeutischer Ansätze besteht in der gezielten Wirkung am Ursprungsort der Erkrankung.

Die größte Herausforderung für gentherapeutische Behandlungsansätze besteht in der Entwicklung sicherer, nicht-toxischer Vektorsysteme und der Gewährleistung einer ausreichend hohen Gentransfereffizienz. Darüber hinaus ist es von entscheidender Bedeutung, eine spezifische Transgenexpression zu erzielen, um Nebenwirkungen zu vermeiden.

Zur Einbringung des Gens in die Zellen stehen verschiedene Methoden wie z.B. die virale Infektion, Lipofektion oder Elektroporation zur Verfügung. Die biologischen, chemischen und physikalischen Systeme zur Transfektion unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Effizienz und Zelltoxizität.

Nicht-virale Vektoren wie Plasmide oder synthetisch hergestellte Liposomen haben den Vorteil, dass sie relativ einfach in hoher Menge und Qualität herzustellen sind, fast unbegrenzte DNA-Kapazität und keine Immunogenität aufweisen (Roder et al., 2003). Dennoch verfügen nicht-virale Vektoren zur Zeit immer noch über eine geringe Zellspezifität.

Die derzeit effektivsten Vektorsysteme sind Viren, die sich aufgrund ihrer guten Gentransfereffizienz und vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten hinsichtlich Genexpression und zellspezifischer Virusreplikation etabliert haben. Virale Vektorsysteme sind in rund 70% aller momentan durchgeführten klinischen Gentherapiestudien vertreten. Die Wahl des Virus hängt sowohl von der Zielzelle bzw. dem Zielgewebe als auch von der Frage ab, ob eine transiente (Adenovirus, Vakzinevirus) oder eine langfristige (Retrovirus, Adeno-assoziiertes Virus) Transgenexpression angestrebt wird. Die häufigsten eingesetzten Vektorsysteme sind

vor allem Adenoviren und Retroviren, die jeweils rund ein Viertel aller klinischen Studien auf diesem Gebiet repräsentieren (The Journal of Gene Medicine 2007, Abb. 1.1).

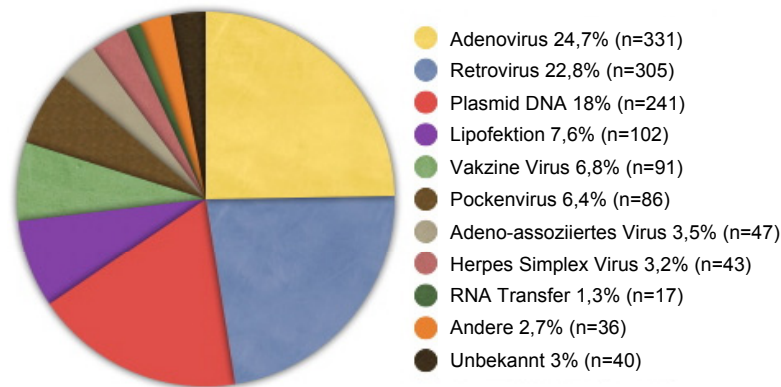


Abb. 1.1: Vektoren in klinischen Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2007)

Zwei Drittel aller aktuell laufenden klinischen Gentherapiestudien zielen auf die Bekämpfung von Krebserkrankungen ab (Abb. 1.2), was sowohl auf den Bedarf neuer Behandlungsoptionen als auch auf das zunehmende Verständnis molekularer Zusammenhänge zurückzuführen ist. Andere Indikationen in diesem Zusammenhang sind vor allem monogenetische Erkrankungen (Zystische Fibrose, erbliche Muskeldystrophie, X-SCID), kardiovaskuläre Erkrankungen und unterschiedliche Infektionskrankheiten.

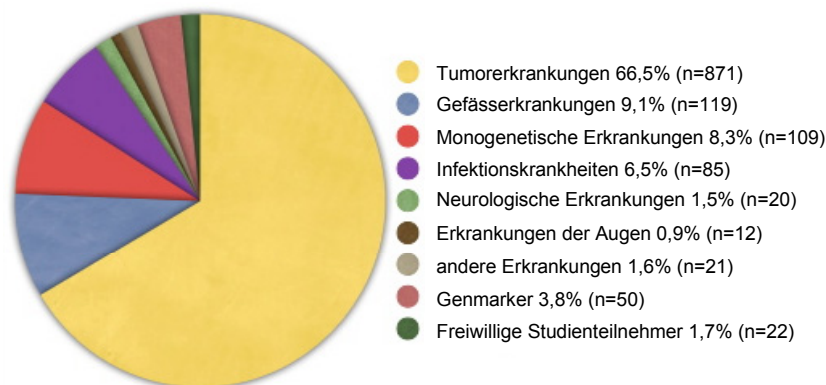


Abb. 1.2: Indikationen klinischer Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2007)

In China wurde 2004 die erste Gentherapie zugelassen (SiBiono, Shenzhen), die nun, in Kombination mit einer konventionellen Strahlentherapie, routinemäßig für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt wird (Garber, 2006; Peng, 2005). Dabei wird eine wildtypische intakte Kopie des humanen p53 Tumorsuppressorgens, das in über 50% aller Malignome mutiert ist, durch direkte Injektion von replikationsdefizienten Ad-p53 Adenoviren in die Tumorzellen eingebracht, um den Defekt zu kompensieren (Peng, 2005). Gendicine® stellt hinsichtlich der Sicherheit und der klinischen Anwendbarkeit einen bedeutenden Fortschritt im Bereich der Gentherapie dar. Ad-p53 wird unter anderem auch in Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom klinisch getestet (Wolf et al., 2004).

Der überwiegende Teil der klinischen Studien zur Gentherapie befindet sich momentan jedoch noch in Phase I, I/II oder II (Abb. 1.3).

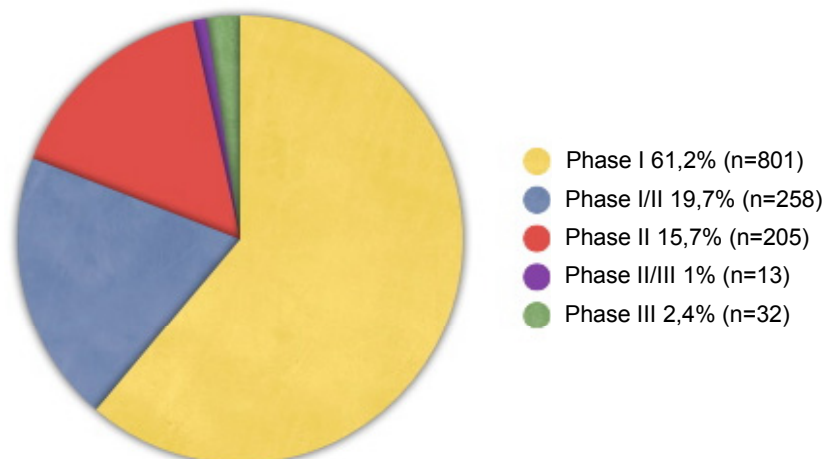


Abb. 1.3: Verteilung der Phasen klinischer Gentherapiestudien (The Journal of Gene Medicine, 2007)

1.5 Adenovirale Gentherapie

Adenoviren sind die gängigsten Vektorsysteme in Zusammenhang mit klinischen Gentherapiestudien. Ihre Attraktivität resultiert aus ihrer hohen DNA-Kapazität, der Stabilität in vivo und der Möglichkeit, sie für die klinische Testung in hoher Menge und Qualität (*good-manufacturing-practice*, GMP) zu gewinnen. Überdies ist die Biologie der Adenoviren seit ihrer Erstbeschreibung in den 1950er Jahren gut untersucht (Rowe et al., 1953). Das adenovirale Genom wird nicht in das Wirtszellgenom integriert, so dass das Risiko einer Mutagenese sehr gering ist. Überhaupt ist ihre Pathogenität für Menschen gering (Takafuji et al., 1979), was ursprünglich der Hauptgrund für die Wahl von Adenoviren für gentherapeutische Anwendungen war. Die über 50 bekannten humanen Serotypen (Subgruppen A-F) sind verantwortlich für Erkrankungen des Respirationstraktes (grippaler Infekt, Bronchitis), Bindehautentzündungen und Entzündungen des Magen-Darm-Traktes. Der häufigste gentherapeutische adenovirale Vektor geht auf den Serotyp 5 (Ad5) zurück.

Ein weiterer Vorteil der Adenoviren ist das breite Wirtszellspektrum und die Infektion sowohl ruhender als auch teilungsaktiver Zellen (Wickham et al., 1993).

Der natürliche Tropismus intravaskulärer Adenoviren führt zu einer Akkumulation insbesondere in der Leber, der Milz, dem Herzen, der Lunge und den Nieren (Bilbao et al., 2000; Reynolds et al., 1999; Wood et al., 1999; van der Eb et al., 1998; Huard et al., 1995).

1.5.1 Morphologie des Adenovirus

Das Adenovirus ist mit einem Durchmesser von etwa 90 nm das größte Virus ohne Hülle und gehört zu den doppelsträngigen DNA-Viren (Abb. 1.4 und 1.5). Das Kapsid bildet eine ikosaedrische Form und verfügt über dornähnliche Fortsätze (Fiber).

Das lineare Genom hat eine Größe von 26-45 KB (35 KB bei Ad5) und umfasst je nach Serotyp etwa 30 bis 40 Gene, die nach *immediate early gene* (E1A), *early genes* (E1B-E4) und *intermediate and late genes* (L1-L5) unterteilt werden. Invertierte terminale Sequenzen (ITR) dienen als Primer für die Replikation der adenoviralen DNA.

Das virale Genom wird durch kovalente Bindung des so genannten terminalen Proteins (TP) an die 5'DNA-Enden in einer pseudo-zirkulären Form gehalten.

Die frühen Genprodukte interagieren mit einer Vielzahl zellulärer Faktoren und aktivieren die Transkription der späten viralen Gene. Unter diesen sind in Zusammenhang mit der Bindung an die Wirtszelle bzw. dem Gentransfer die Strukturproteine des Kapsids zu nennen, zu dessen Hauptkomponenten das Hexon-, das Pentonbasen- und das Fiberknob-Protein zählen (Russell, 2000).

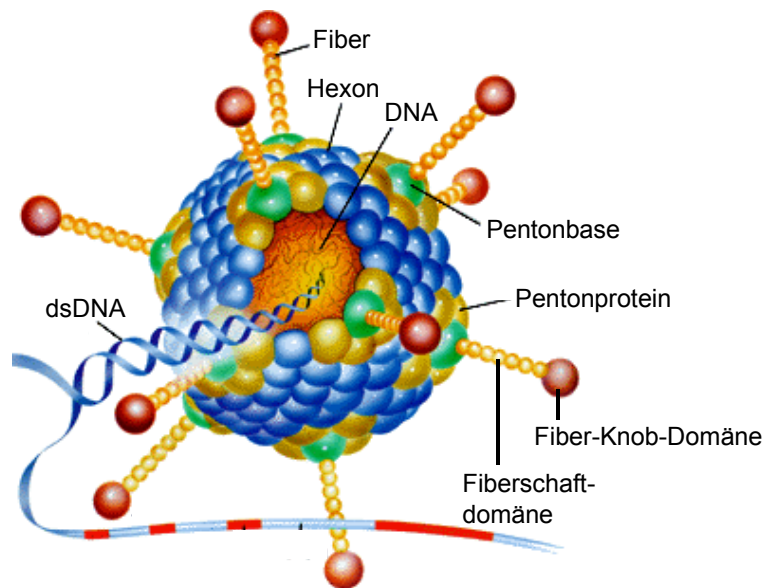


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines Adenovirus
(Modifiziert nach *Physiology or Medicine Nobel Poster*, 1993)

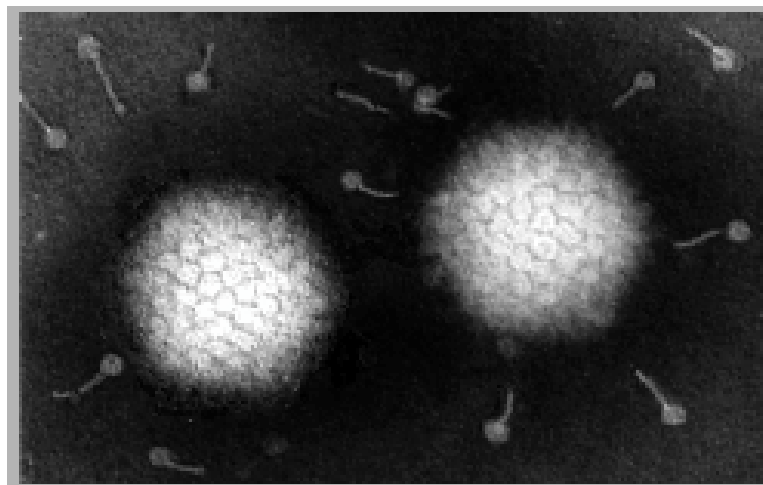


Abb. 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier Adenoviren
Um die beiden Viruspartikel sind Fibern zu erkennen, die während der Präparation von den Viruspartikeln abgetrennt wurden.
(Quelle: Linda Stannard, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town)

1.5.2 Infektion und adenoviraler Replikationszyklus

Die adenovirale Infektion einer Zelle erfolgt in zwei Schritten. Sie beginnt im ersten Schritt mit der initialen Bindung des Viruspartikels, genauer gesagt der am carboxy-terminalen Ende der viralen Fiber lokalisierten Knob-Region, an den korrespondierenden Primärrezeptor der Zelloberfläche (Abb. 1.6). Dies ist im Falle des Adenovirus Serotyp 5 und der meisten anderen Serotypen der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor CAR (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997). Im zweiten Schritt kommt es zu einer Interaktion des RGD-Motivs (Arginin-Glycin-Aspartat) des adenoviralen Penton-Proteins mit zellulären $\alpha_v\beta$ Integrinen (Wickham et al., 1993). Anschließend wird das Virion durch Endozytose internalisiert. Im Endosom führt eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Konformationsänderung der viralen Kapsidproteine und damit zum Verlust der Fiber-Struktur. Durch eine Interaktion der Kapsidproteine mit der Endosomenmembran wird das Vesikel lysiert. Daraufhin erfolgt der Mikrotubuli-vermittelte Transport des Virus zum Zellkern. Durch den nukleären Porenkomplex wird die virale DNA in den Zellkern importiert, wo dann die viralen Gene transkribiert werden.

Das erste virale Gen, das nach der Infektion der Wirtszelle transkribiert wird, ist E1A, dessen Genprodukt nachfolgend die Transkription weiterer früher Gene (E1B-E4) induziert. Die Funktion der frühen adenoviralen Genprodukte besteht vor allem in der Manipulation des Zellzyklus und in der Modulation des zellulären Metabolismus zugunsten der viralen Replikation. So wird beispielsweise in Zellen, die ansonsten teilungsinaktiv sind, der Übergang aus der G0/G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus induziert und die Apoptose blockiert (Endter et al., 2004). Dies geschieht durch direkte und indirekte Interaktion von E1A und E1B-Proteinen (E1B 55K und E1B 19K) mit einer Vielzahl von zellulären Faktoren wie z.B. Rb, p53 und p300.

Die Replikation der viralen DNA wird durch die E2 und E4 Genprodukte initiiert und erfolgt mittels der DNA-Replikationsmaschinerie der Wirtszelle. Die zuletzt exprimierten späten Gene L1 bis L5 kodieren für strukturelle Virusproteine.

Nach Replikation der adenoviralen DNA und der Synthese der Kapsidproteine werden in der Wirtszelle neue Viruspartikel assembliert. Im letzten Schritt des adenoviralen Zyklus wird die Lyse der Wirtszelle induziert und die neuen Virionen freigesetzt, die dann wiederum benachbarte Zellen infizieren können.

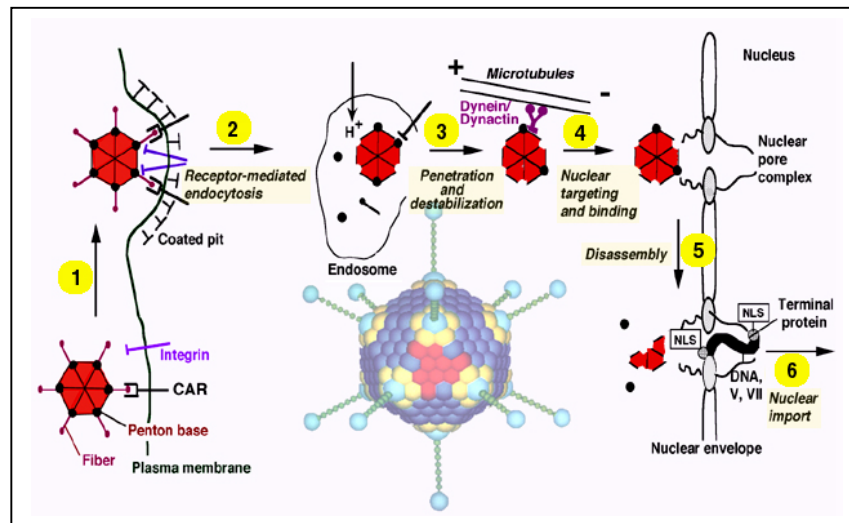


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der adenoviralen Infektion einer Wirtszelle
 (Quelle: http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAadeno.html)

1.5.3 Adenovirale Vektoren in gentherapeutischen Anwendungen

Die Ad5-basierten Vektoren der ersten Generation waren E1- und E3-deletiert (Bett et al., 1994). Die Deletion des E1-Gens führt zu einer Replikationsdefizienz des Virus. Das E3-Gen ist für die Virusreplikation nicht essentiell, seine Deletion diente lediglich der Erhöhung der DNA-Aufnahmekapazität. Die Produktion replikationsdefizienter Viren erfolgt in speziellen Zelllinien wie HEK-293 (*human embryonic kidney cells*; Graham et al., 1977), die die Deletionen durch stabile E1A- und E1B-Expression transkomplementieren. In der Regel wird das therapeutische Gen zusammen mit einem geeigneten Promotor und eventuellen Regulationselementen an die Stelle des deletierten viralen E1-Gens inseriert.

Klinische Studien mit replikationsdefizienten Adenoviren wurden für eine Vielzahl von Erkrankungen durchgeführt mit einem Schwerpunkt für Tumorerkrankungen, aber auch in Zusammenhang mit kardiovaskulären und hereditären monogenetischen Erkrankungen. Die ersten Gentherapiestudien mit Adenoviren zielten auf die Behandlung der Mukoviszidose (Zystische Fibrose) ab. Die Mukoviszidose ist ein angeborenes, autosomal-rezessiv vererbtes Multiorgansyndrom und gehört zu den

häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Die Erkrankung wird durch den Mangel eines Regulatorproteins des Chlorid-Transports durch die Zellmembran (*cystic fibrosis transmembrane regulator*, CFTR) hervorgerufen und sollte durch adenovirale Expression des intakten CFTR-Gens behandelt werden. Die Patienten entwickelten jedoch nach Infektion des Nasal- oder Bronchialepithels dosis-limitierende pulmonäre Entzündungen. Darüber hinaus war die Effizienz des Gentransfers sehr gering, die auch durch den Einsatz von Ad-Vektoren der zweiten Generation mit wieder eingeführtem E3 oder E4-Deletion nicht signifikant verbessert werden konnte (Lee et al., 2005).

Im Jahr 1999 wurde der Versuch der Korrektur einer Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz durch Gabe E1/E4-modifizierter Adenoviren, die eine Wildtypversion des korrespondierenden defekten Gens trugen, durch den Tod eines Patienten überschattet (Raper et al., 2003). Der 18-jährige Jesse Gelsinger war nach Erhalt der höchsten eingesetzten Dosis über die Leberpfortader an einem septischen Schock mit einhergehendem Multiorganversagen verstorben. Die hierfür ursächliche vorbestehende Lebererkrankung war zum Zeitpunkt der Therapie nicht bekannt gewesen. Bei allen 11 Patienten, die an der Studie teilgenommen hatten, waren deutliche Immunantworten auf den Vektor, aber kein therapeutischer Nutzen festzustellen (Raper et al., 2002).

Nach eingehender Prüfung der adenoviralen Gentherapie in den letzten Jahren wurde klar, dass die teilweise starke Immunantwort, ausgelöst durch die intravenöse Administration großer Dosen von Adenoviren der ersten Generation, zu einer hohen Toxizität des Vektors führen kann. Dies ist ein Hinweis darauf, dass gerade für die Behandlung von hereditären Erkrankungen und Stoffwechselkrankheiten, wo die Erhaltung der Vitalität der Zielzellen und ein effektives *Gene Replacement* oft entscheidend sind, andere Vektoren geeigneter sein könnten (Hemminki et al., 2002).

Im Gegensatz dazu hat eine Vielzahl gentherapeutischer Studien in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gezeigt, dass Adenoviren in der Onkologie sehr nützlich sein können (vergl. 1.5.4 und 1.5.5). Dabei ist das Ziel ein effektives Abtöten der Tumorzellen und nicht eine dauerhafte Transgenexpression.

Insgesamt zeigten replikationsdefiziente Adenoviren im Kontext mit Krebserkrankungen trotz viel versprechender in vitro Daten nur mäßige Erfolge in klinischen Studien aufgrund geringer Gentransferraten und mangelnder Zellspezifität (Vorburger et al.,

2002). So wurden in Abhängigkeit von der Applikationsart nur wenige Millimeter Tumorgewebe infiltriert und lysiert, insbesondere bei größeren Tumoren. Dies führte zu der Idee einer selbstlimitierenden Virusreplikation in Zielzellen mit sukzessiver Infizierung benachbarter Zielzellen. Zu diesem Zweck wurden selektiv replikationskompetente Adenoviren entwickelt. Die so genannten onkolytischen Adenoviren oder konditional replizierende Adenoviren (*conditionally replicating adenovirus*, CRAbs, s. 1.5.6) erzielen höhere Transduktionsraten, eine bessere Tumorpenetration und konnten in zahlreichen Studien als sicher eingestuft werden (Kanerva et al., 2007; Lichtenstein et al., 2004; Hemminki et al., 2002). Zusätzlich zu dieser so genannten onkolytischen Virotherapie gibt es im Zusammenhang mit bösartigen Erkrankungen weitere Strategien, die sich adenoviraler Vektoren bedienen (s. 1.5.4).

Für Adenoviren, sowie auch für andere Vektoren, bleibt die Verbesserung der Zell- bzw. Gewebespezifität weiterhin die größte und wichtigste Herausforderung, die trotz einiger Rückschläge Ende der 1990er Jahre Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist (s. 1.5.5).

1.5.4 Strategien adenoviraler Gentherapieansätze in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen

Adenovirale Strategien zur Krebsbehandlung lassen sich in mehrere Kategorien unterteilen: Mutationskompensation (Substitution defekter Gene), immunotherapeutische Ansätze, Suizidgentherapie (molekulare Chemotherapie) und onkolytische Virotherapie. Darüber hinaus gibt es Versuche, die Neoangiogenese im Tumorgewebe durch Einbringung natürlicher Faktoren wie Angiostatin und Endostatin gentherapeutisch zu hemmen.

Das Ziel der Mutationskompensation ist die Korrektur eines genetischen Defekts in der Tumorzelle. Beispielsweise können Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie p53 oder BRCA1 oder die Überexpression von Onkogenen wie erbB-2 kompensiert werden (Casado et al., 2001b; Nieto et al., 2000). Die Substitution von p53 ist intensiv in Phase I, II und III Studien untersucht worden. Die meist versprechendsten Daten wurden bislang mit intratumoral injizierten Adenoviren in Kombination mit Chemotherapie erzielt (Schuler et al., 2001).

Das Potential des Immunsystems, Tumorzellen zu erkennen und zu entfernen, hat eine Reihe immunotherapeutischer Ansätze in der Gentherapieforschung angeregt. Die Strategien umfassen beispielsweise den zielgerichteten Transport von Zytokinen oder tumorassoziierter Antigene zu Antigen-präsentierenden Zellen (Pardoll, 2002; Banchereau et al., 2005). Klinische Studien, in denen Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Verdauungstrakts mit rekombinantem Adenovirus, das Interleukin-12 exprimiert, behandelt wurden, haben die Sicherheit dieser Methode demonstriert und Hinweise auf einen Anti-Tumor-Effekt geliefert (Sangro et al., 2004).

Bei der Suizidgentherapie wird ein nicht-humanes Gen in Tumorzellen eingeschleust. Das therapeutische Gen kodiert in diesem Fall für ein Enzym, dass eine nicht-toxische Substanz intrazellulär in ein Zytotoxin umwandelt und auf diese Weise die maligne Zielzelle abtötet. Ein zusätzlicher Effekt ergibt sich aus der lateralen Diffusion der aktivierten Substanz in nicht-transduzierte Nachbarzellen (Bystander-Effekt), so dass deutlich mehr Tumorzellen abgetötet werden als ursprünglich infiziert wurden (Culver et al., 1992).

Das bekannteste Suizidgen kodiert für die Thymidin-Kinase des Herpes Simplex Virus (HSV-TK), die beispielsweise das Nukleosid-Analog Ganciclovir (GCV) als Substrat nutzen kann. Das resultierende GCV-Monophosphat führt durch Inhibition der DNA-Synthese und Blockade der RNA-Polymerase zum Zelltod.

Ein anderes, gut untersuchtes Suizidgen kodiert für die Cytosindeaminase aus *Escherichia coli*, die 5-Fluorocytosin in das potente Toxin und Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil umwandelt.

Im Rahmen der Suizidgentherapie wurden Phase I Studien z.B. für die Behandlung des Ovarialkarzinoms (Alvarez et al., 2000; Alvarez et al., 1997; Hasenburger et al., 2000), des Prostatakarzinoms (Koenen et al., 2000; Herman et al., 1999) und von Gliomen (Trask et al., 2000; Sandmair et al., 2000; Eck et al., 1996) durchgeführt. Einige Studien kombinieren Suizidgentherapie mit konventionellen Behandlungsmethoden und zeigten in Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom (Hasenburger et al., 2001) und Prostatakrebs (Teh et al., 2001) gute Erfolge.

In den letzten Jahren wuchs nach zahlreichen klinischen Studien die Überzeugung, dass die Ausbreitung der therapeutischen Viren im Tumor entscheidend für eine zufrieden stellende klinische Effizienz viraler Gentherapieansätze ist und dass daher onkolytische, replikationskompetente Viren (CRAds, s. 1.5.6) die besten Aussichten für die Krebsbehandlung bieten (Bell et al., 2003). Die so genannte onkolytische Virotherapie, zu deren Weiterentwicklung auch die vorliegende Arbeit einen Beitrag leistet, wird in Kapitel 1.5.6 erläutert.

1.5.5 Targeting adenoviraler Vektoren in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen

Der Schlüssel zu einer erfolgreichen Gentherapie besteht in der Herstellung einer Tumorselektivität der viralen Vektoren. Bei der onkolytischen Virotherapie gilt es, die virale Replikation und die Zellyse auf maligne Zielzellen zu beschränken und in Normalzellen zu verhindern, um lebenswichtige Organe zu schonen. Dies kann zum einen durch den Einsatz von Viren erreicht werden, die über eine inhärente Fähigkeit zur selektiven Replikation in Tumorzellen verfügen, wie z.B. humane Reoviren (Hashiro et al., 1977), bestimmte Parvoviren (Maxwell et al., 2002; Rommelaere et al., 1991) oder auch das Newcastle Disease Virus (Lorence et al., 1988). Im Falle von Adenoviren hingegen sind zu diesem Zweck unterschiedliche Strategien der genetischen Manipulation des Virusgenoms entwickelt worden. So sind bei den ersten so genannten konditional replizierenden Adenoviren (CRAds) wichtige Gene oder Genbereiche deletiert worden, die für die Virusvermehrung in (gesunden) ruhenden Zellen essentiell sind. Auf diese Weise wurde die Virusreplikation an bestimmte tumorspezifische Gendefekte geknüpft, die in der Lage sind, den Verlust funktioneller Virusproteine zu kompensieren (vergl. 1.5.6).

1.5.5.1 Transkriptionelles Targeting

Ein anderer Ansatz zur Herstellung einer Tumorselektivität ist das so genannte transkriptionelle Targeting. Das transkriptionelle Targeting nutzt genetische Steuerelemente (Promotoren), um die virale Replikation auf Tumorzellen zu beschränken. In Tumorzellen sind viele Gene in besonderem Ausmaß hochreguliert. Die Promotoren dieser Gene können als tumorspezifische Promotoren (TSP) für die Steuerung adenoviraler Vektoren bzw. onkolytischer Adenoviren eingesetzt werden. Hierbei wird ein tumorspezifischer Promotor vor frühe virale Gene geschaltet (E1A, E1B), deren Expression essentiell für den viralen Vermehrungszyklus sind. Die Virusreplikation wird dadurch abhängig von der Aktivität des Promotors in der infizierten Wirtszelle.

Dies wurde beispielsweise beim Prostatakarzinom durch die Verwendung des PSA-Promotors (*prostate-specific antigen*), des Probasin-Promotors und einer Kombination von beiden erreicht (Chen et al., 2001; Yu et al., 1999). Eine Phase I Studie, in der nach

Bestrahlung der Patienten PSA-Promotor gesteuerte Adenoviren in die Prostata injiziert wurden, zeigte ermutigende Virus-Dosis abhängige Reduktionen der PSA-Level im Serum und in Gewebe-Biopsien eine virale Replikation in der Prostata (Small et al., 2006; DeWeese et al., 2001).

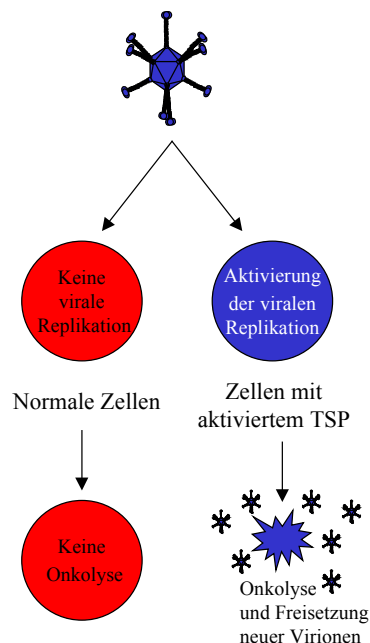


Abb. 1.7: Prinzip des transkriptionellen Targetings durch tumorspezifische Promotoren (TSP)
(modifiziert nach Bauerschmitz et al., 2002a)

Selektive Expression von E1A wurde außerdem durch den Einsatz anderer Promotoren erzielt, die in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen dereguliert sind, wie dem Telomerase-Promotor (Huang et al., 2003) und Hypoxie-induzierten Regulationselementen (*hypoxia-inducible factor responsive elements*, (Post et al., 2003), oder Promotoren, die spezifisch in bestimmten Tumorentitäten hochreguliert sind, wie der α -Fetoprotein Promoter beim Leberkarzinom (Li et al., 2001) oder der MUC1 Promoter im Mammakarzinom (Kurihara et al., 2000).

Darüber hinaus wurden synthetische Promotoren mit verbesserter Tumorselektivität entwickelt. So wurde ein bispezifischer Promotor, der auf Östrogen und Hypoxie anspricht, im Kontext von Brustkrebs evaluiert (Hernandez-Alcoceba et al., 2002).

Zur Therapie des Ovarialkarzinoms wurde aus Ovarialkarzinomzellen der Promotor des humanen IAI.3B Gens isoliert und damit ein replikationskompetentes Adenovirus, AdE3-IAI.3B, kreiert. Die Aktivität des IAI.3B Promoters war in Ovarialkarzinomzellen fast so

hoch wie die Aktivität des Cytomegalovirus-Promoters, eines der stärksten Promotoren im adenoviralen Kontext (Hitt et al., 1997; Addison et al., 1997). Die Replikation von AdE3-IA1.3B war so effizient wie die des Wildtyp-Virus und führte in vitro zu ausgeprägter Onkolyse (=Lyse von Tumorzellen) bei unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien. Im Gegensatz dazu waren Normalzellen nicht permissiv für die Replikation von AdE3-IA1.3B. Ein starker therapeutischer Effekt konnte außerdem in murinen Ovarialkarzinom -Modellen demonstriert werden (Hamada et al., 2003).

In Zusammenhang mit gynäkologischen Krebserkrankungen sind außerdem der Heparanase-Promotor für Brustkrebs (Breidenbach et al., 2006) und der SLPI- (Rein et al., 2005), der L-Plastin (Peng et al., 2001; Chung et al., 1999) und der Mesothelin-Promotor (Breidenbach et al., 2005) für das Ovarialkarzinom als viel versprechende Kandidaten identifiziert worden.

Ein eleganter Ansatz, um auch chemoresistente Karzinome zu erreichen, ist der Einsatz des Zytostatika-induzierbaren MDR-Promotors (*multiple drug resistance*). MDR-Promotor gesteuerte CRAds erzielten bei Primärtumoren mit Polychemoresistenz hohe Zytotoxizitäten und werden derzeit im Mausmodell getestet (nicht publizierte Daten). Die Kombination von MDR-CRAds mit herkömmlichen Chemotherapien könnte in Zukunft eine Eliminierung polychemoresistenter Tumore ermöglichen, die durch heutige Therapieoptionen nicht erreicht werden können.

Weitergehende Ansätze zur Steuerung der adenoviralen Replikation kombinieren den Einsatz tumorspezifischer Promotoren mit einer tumorspezifischen Kontrolle der mRNA-Translation (Translationales Targeting). Zu diesem Zweck wurden CRAds konstruiert, die den CXCR4 Promotor und das 5'-UTR-Element (*untranslated region*) der FGF-2 mRNA (*fibroblast growth factor-2*) tragen (Stoff-Khalili et al., 2007). Die so gesteuerten Vektoren demonstrierten sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen eine gute Anti-Tumor-Effizienz und eine deutliche Verbesserung der Tumorselektivität durch den neuen Targetingansatz.

1.5.5.2 Transduktionelles Targeting

Zusätzlich zur Restriktion der viralen Replikation mittels transkriptionellem Targeting und Deletionen im viralen Genom besteht die Möglichkeit, bereits die adenovirale Infektion (Transduktion) auf Tumorzellen zu fokussieren.

Der weite Ad-Tropismus, der auf eine breite Verteilung des CAR als primärem Rezeptor und zellulären Integrinen als sekundären Rezeptoren zurückgeht, birgt zwar das Potential, adenovirale Vektoren in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben einzusetzen. Gleichzeitig stellt er jedoch im Hinblick auf die selektive Infektion bzw. Transgenexpression oder Zelllyse ein Problem dar. Da Adenoviren in der Leber akkumulieren (Hepatotropismus), um dort von den Kupfferschen Zellen abgebaut zu werden (Lieber et al., 1997), müssen insbesondere bei systemischer Gabe eine hohe Virusaufnahme in die Leber und eine daraus resultierende Toxizität verhindert werden. Durch Tropismusmodifikation konnte tatsächlich eine Reduktion der Hepatotoxizität erzielt werden (Rein et al., 2005).

Des weiteren ist bei adenoviralen Therapieansätzen zu beachten, dass die CAR-Expression insgesamt sehr variabel und gerade in Tumoren häufig stark reduziert ist (Jee et al., 2002; vergl. 1.5.7.2). Um trotzdem ausreichende Infektionsraten zu erreichen, ist eine Änderung des Tropismus unabdingbar.

Daher versucht man beim transduktionellen Targeting, die veränderte Rezeptorexpression, wie sie häufig bei Tumorzellen anzutreffen ist, für eine spezifische Infektion dieser Zellen auszunutzen. Die Modifikation des viralen Bindungsmechanismus an die Zelle kann beispielsweise direkt durch die genetische Veränderung des Viruskapsids oder auch durch zwischengeschaltete Linker (bisppezifische Adaptermoleküle) erreicht werden.

Die Modifikation des Viruskapsids besteht in der Regel in der Entfernung der CAR-Bindung und der Insertion neuer Peptide in die Fiber-Knob-Domäne. Beispielsweise ermöglicht eine Insertion von Poly(L)-Lysin in den C-Terminus die Bindung an Heparanhaltige Rezeptoren und die Internalisierung des Viruspartikels (Wickham et al., 1996a). Das Integrin-Bindemotiv RGD, das essentiell für die Pentonbasen-vermittelte Internalisierung ist, erlaubt bei Insertion in den C-terminalen Bereich des Fiber-Knob Proteins eine Bindung an Integrine und die Aufnahme des Virus durch die Zelle

(Dmitriev et al., 1998). Da $\alpha_v\beta$ -Integrine häufig in Tumoren überexprimiert werden, erhöht die RGD-Inkorporation die Tumorselektivität (Bauerschmitz et al., 2002b). Die Kombination von Polylysin- und RGD-Motiv führte sogar zu einer weiteren Erhöhung der Gentransfereffizienz der doppelt fibermodifizierten Ad-Vektoren (Breidenbach et al., 2004).

Es können auch Bindemotive anderer Ad-Serotypen als die der Subgruppe B verwendet werden (Fiberchimerisierung, Fiber-Pseudotypisierung; Stevenson et al., 1997; Krasnykh et al., 1996; Gall et al., 1996; Stevenson et al., 1995), die nicht über CAR sondern über andere Rezeptoren an die Zelle binden. Auf diesem Weg ist es möglich, bestimmte Gewebetypen bzw. Organe zu adressieren. So führt der Einsatz der Ad17-Fiber zu einer verbesserten Transduktion epithelialen Gewebes der Luftwege (Zabner et al., 1999), die Ad35-Fiber ist für die Infektion hematopoetischer Zellen (Saban et al., 2005; Shayakhmetov et al., 2000) und die Ad16-Fiber für das Targeting von kardiovaskulärem Gewebe (Havenga et al., 2002) gut geeignet.

Über Veränderungen der Fiber-Shaft-Domäne hinsichtlich ihrer Länge und Flexibilität kann die Interaktion zwischen Virus und Zelle ebenfalls beeinflusst werden. Es konnte beispielsweise in Zusammenhang mit der Gentherapie des Ovarialkarzinoms demonstriert werden, dass eine modifizierte Shaft-Domäne den Lebertropismus adenoviraler Vektoren reduziert (Breidenbach et al., 2004).

Eine weitere Determinante der Zellspezifität scheint außerdem ein Heparansulfat-Proteoglykan-Motiv im Ad5-Schaft zu sein (Nicklin et al., 2005).

Alternative Rezeptor-Liganden können auch in andere Kapsidproteine als das Fiber-Knob Protein inseriert werden. So wurde bereits RGD in das Hexonprotein inkorporiert (Vigne et al., 1999) und Poly(L)-Lysin in das Polypeptid IX (Dmitriev et al., 2002).

Komplexere Strategien, die Fiber-vermittelte Zellspezifität zu modifizieren, umfassen die Identifikation von Zellerkennungspeptiden mittels Phage-Display (Fontana et al., 2003; Pereboev et al., 2001; Nicklin et al., 2000; Xia et al., 2000) und das Ersetzen der Fiber-Knob-Domäne durch andere Liganden (Hong et al., 2003; Krasnykh et al., 2001).

Nicht-genetische Targeting-Strategien schließen die chemische Modifizierung des Virions oder die Verwendung so genannter bispezifischer Adaptermoleküle ein.

Das erste derartige Adaptermolekül war ein bispezifischer Antikörper, der einerseits an ein in die Pentonbase inseriertes FLAG-Epitop und andererseits an zelluläres α_v Integrin bindet (Wickham et al., 1996b). Seitdem ist eine Vielzahl solcher „Linker“

entwickelt worden, die zum einen durch ihre virusseitige Bindung die Interaktion mit CAR blockieren und durch ihre zweite Funktion ein spezifisches Retargeting erlauben.

Ein anderes bispezifisches Molekül ist mit FGF (*fibroblast growth factor*) konjugiert und führt zu einer Bindung des Ad-Vektors an den FGF-Rezeptor (Kleeff et al., 2002), der in hohem Maße in Tumorzellen exprimiert wird.

Die Konjugation natürlicher Liganden (Rancourt et al., 1998; Douglas et al., 1996) oder von Antikörpern gegen bestimmte Rezeptoren (Haisma et al., 1999; Miller et al., 1998b) mit einem Anti-Fiber-Fab Fragment zeigte ebenfalls gute Erfolge.

Für replizierende, onkolytische Viren ist der Einsatz von Adaptermolekülen jedoch aufgrund der Problematik des Targetings von Virusnachkommen ungeeignet.

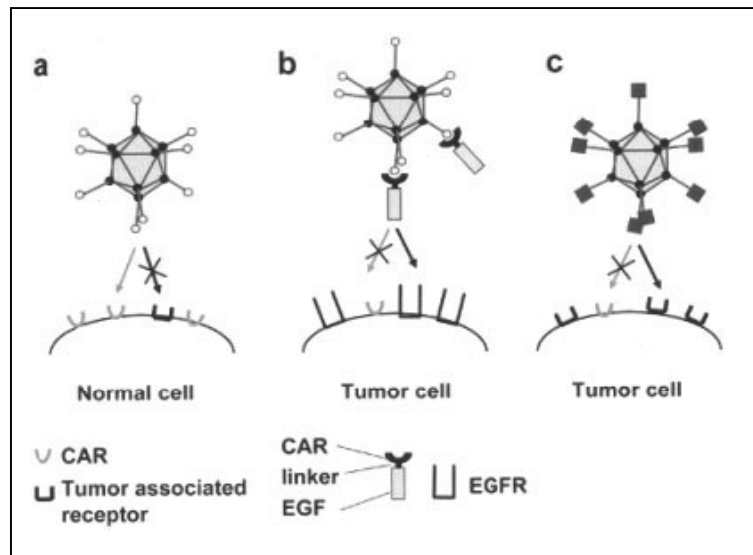


Abb. 1.8: Prinzip des transduktionellen Targetings

A: Ad5 bindet an CAR einer Normalzelle.

B: Das bispezifische Adaptermolekül sCAR-EGF leitet die Bindung des Ad5-Viruspartikel zum tumorassoziierten EGFR.

C: Die Rezeptor-bindende Knob-Domäne der Virusfiber ist genetisch modifiziert worden, um eine CAR-unabhängige Bindung an einen tumorassoziierten Zellrezeptor zu erzielen.

(Quelle: Kanerva et al., 2004b)

1.5.6 Onkolytische Virotherapie mittels konditional replizierender Adenoviren (CRAds)

Die onkolytische Virotherapie nutzt die natürliche Fähigkeit bestimmter Viren, Zellen zu infizieren, die Wirtszellen nach erfolgter Virusreplikation zu zerstören, sich auszubreiten und wiederum benachbarte Zellen zu infizieren. Die Herstellung einer Selektivität von Infektion und Replikation für Tumorzellen eröffnet Möglichkeiten zur Anti-Tumor-Behandlung unter Schonung von Normalzellen. Zu den Viren, die in diesem Zusammenhang untersucht werden, zählen Retroviren, Parvoviren, Newcastle Disease Viren oder auch Masernviren. Der weitaus größte Teil der Studien befasst sich jedoch mit Adenoviren.

Die lokale Amplifizierung der Input-Dosis bzw. des therapeutischen Effekts macht die onkolytische Virotherapie zu einem attraktiven Behandlungsansatz und kann zu einer effizienten Penetration des Tumorgewebes führen. Die größte Herausforderung aber auch Chance in der Entwicklung onkolytischer Viren ist die Gewährleistung einer ausreichenden Tumorselektivität. Die Tumorselektivität und die Tatsache, dass so gut wie keine Resistenzen auftreten können, sind die größten Vorteile der Virotherapie im Vergleich zur konventionellen chemotherapeutischen Behandlung.

ONYX-015 (dl1520) war das erste CRAd und wurde bislang in vielen Tumorentitäten klinisch getestet, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapie (Ries et al., 2004; Heise et al., 2000; Bischoff et al., 1996). Ursprünglich wurde aufgrund der E1B 55K-Defizienz von ONYX-015 eine selektive Replikation des Virus in Tumorzellen mit p53-Defekt postuliert, da dieses virale Protein in Normalzellen durch Bindung und Inaktivierung des zellulären p53 den Zellzyklusarrest und die Apoptose inhibiert und damit erst eine Virusreplikation ermöglicht. Das Fehlen von E1B 55K können deshalb nur Tumorzellen mit einem Defekt im p53-Pathway kompensieren, was wiederum zur Replikation des Virus führt. Spätere Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass eher der Verlust des E1B 55K-vermittelten Exports später viraler RNA als die p53-Inaktivierung für die Restriktion der Virusvermehrung von ONYX-015 in gesunden Zellen verantwortlich ist (O'Shea et al., 2004).

Beeindruckende Erfolge mit ONYX-015 wurden in Phase II Studien bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren erzielt, wo die intratumorale Injektion des Virus in Kombination mit

Cisplatin und 5-Fluorouracil in einer 63%igen Ansprechrate resultierte (Khuri et al., 2000). Dieser Erfolg führte zu einer Vielzahl klinischer Studien (Phase I-III) mit ONYX-015 in Zusammenhang mit rezidivem Ovarialkarzinom (Vasey et al., 2002), dem Pankreaskarzinom (Hecht et al., 2003; Mulvihill et al., 2001) und Lebertumoren (Reid et al., 2005; Reid et al., 2002; Reid et al., 2001). Auch die systemische Gabe von ONYX-015 durch intravenöse Administration in Patienten mit Metastasen konnte als sicher und gut verträglich demonstriert werden (Hamid et al., 2003; Nemunaitis et al., 2001).

Nach zahlreichen klinischen Studien scheint die antitumorale Effizienz von ONYX-015 jedoch trotz nachgewiesener Sicherheit limitiert zu sein, auch wenn sie sich durch Kombination mit Chemotherapie erhöhen lässt.

Zweifel an der onkolytischen Potenz von ONYX-015 führten zur Entwicklung weiterer CRAbs, in denen andere Gene deletiert sind. Das Entfernen der Rb-Binderegion CR2 des E1A-Proteins bindet die Virusreplikation an einen defekten Rb-Pathway in der infizierten Zelle, wie er häufig in Tumorzellen auftritt (vergl. 1.5.7.3). Das so modifizierte Adenovirus dl922-947 demonstrierte in vitro höhere Anti-Tumor Effizienz als Wildtyp Ad oder ONYX-015 (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000).

Die Weiterentwicklung der onkolytischen Virotherapie führte zu den so genannten Typ II CRAbs. Dabei wird der virale Vermehrungszyklus durch heterologe Promotoren gesteuert, die vor essentielle virale Gene inseriert wurden (s. 1.5.5.1: Transkriptionelles Targeting).

Typ III CRAbs stellen eine Kombination aus Typ I und Typ II CRAbs dar. Somit wird die Replikation von Typ III CRAbs sowohl durch transkriptionelles Targeting als auch durch tumorselektive Deletionen in essentiellen viralen Genen gesteuert. Auf diese Weise wird eine besonders hohe Tumorselektivität erreicht (Nettelbeck et al., 2002), wobei diese Strategie aufgrund der mit jeder genetischen Virusmodifikation abnehmenden Replikationskompetenz limitiert ist (Bauerschmitz et al., 2002a).

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl neuer Targeting-Strategien entwickelt worden und zahlreiche Ansätze zur onkolytischen Virotherapie auch in klinischen Studien evaluiert worden. Untersucht wurde die intratumorale, intraarterielle, intraperitoneale und intravenöse Administration adenoviraler Vektoren. Dabei zeigte sich insgesamt, dass

CRAds sicher sind, d.h. nur moderate Nebenwirkungen, aber keine schwere oder letale Toxizität verursachen (Kanerva et al., 2007; Aghi et al., 2005; Hemminki et al., 2002).

In den meisten Studien wurden Adenoviren intratumoral injiziert, um die Wirksamkeit für lokal begrenztes Tumorgewebe zu untersuchen. Im Falle des Ovarialkarzinoms eignet sich anscheinend die intraperitoneale Administration des Vektors (Buller et al., 2002), wird jedoch durch neutralisierende Antikörper im Aszites erschwert (Stallwood et al., 2000).

Die Wirksamkeit onkolytischer Adenoviren bei systemischer Gabe (als Monotherapie) konnte bisher nicht in klinischen Studien nachgewiesen werden (Liu et al., 2007).

1.5.7 Cox2-Promotor gesteuerte, tropismusmodifizierte CRAds für die onkolytische Virotherapie gynäkologischer Malignome

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Targeting-Strategien kombiniert (transkriptionelles Targeting, transduktionelles Targeting, E1A-Deletionen), um eine möglichst selektive und wirksame Abtötung von Tumorzellen des Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinoms zu erzielen. Zu diesem Zweck standen sechs unterschiedliche Ad5/3cox2-CRAbs zur Verfügung (Abb. 1.9).

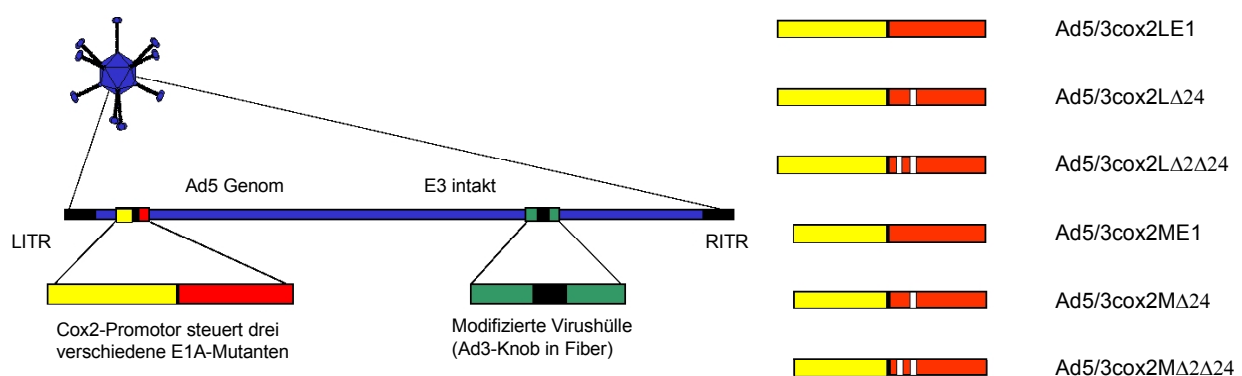


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der fibermodifizierten Cox2-Promotor gesteuerten CRAds
Links: CRAd-Genom. Gelb: Cox2-Promotor, rot: E1-Gen, grün/schwarz: modifiziertes Fiber-Knob-Gen.
Rechts: Durch Kombination zweier Promotorvarianten (Cox2L, Cox2M) und dreier E1A-Varianten (E1Wt, E1 Δ 24, E1 Δ 2 Δ 24) wurden sechs Cox2-CRAds konstruiert. Die 5/3-Fibermodifikation wurden in allen Fällen eingesetzt. (modifiziert nach Bauerschmitz et al., 2006)

1.5.7.1 Der tumorspezifische Cox2-Promotor

Cox2 ist die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase (im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1). Die biologische Funktion der Cyclooxygenase besteht in der Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen (z.B.: PGH_2 , PGI_2 = Prostacyclin, $\text{PGF}_{2\alpha}$). Diese Gruppe von Lokalhormonen hat je nach Art und Syntheseort unterschiedliche, zelltypspezifische Funktionen, zu denen die Kontrolle inflammatorischer Reaktionen, die Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Schmerzreizen, die Wundheilung (Reparatur von Gewebsschädigungen) oder beispielsweise die Protektion durch Aggregationshemmung und Vasodilatation im Endothel (durch Prostacyclin) zählen. In Zusammenhang mit gynäkologischen

Malignomen ist festgestellt worden, dass Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen (seröse Flüssigkeit in der Bauchhöhle) oft erhöhte Werte von PGE₂ aufweist.

Die Cox2-Expression ist in den meisten Geweben unter physiologischen Bedingungen sehr gering (Dubois et al., 1998; Tippetts et al., 1988). Eine Induktion erfolgt in bestimmten (patho-) physiologischen Situationen über Wachstumsfaktoren, Zytokine wie Interleukin-1 oder TNF α oder tumorspezifische Faktoren (Kutchera et al., 1996). Induktion der Cox2-Expression resultiert in Steigerung der Proliferation (Abb. 1.10 links), Inhibierung der Apoptose (Abb. 1.10 rechts) sowie Steigerung der Motilität und Adhäsion, wobei die genauen Mechanismen nach wie vor größtenteils unbekannt sind (Cao et al., 2002). Cox2 ist außerdem in der Tumorangiogenese involviert (Costa et al., 2002).

Eine erhöhte Cox2-Expression konnte in vielen Tumorentitäten epithelialen Ursprungs festgestellt werden, wie dem Prostatakarzinom (Yoshimura et al., 2000), dem Lungenkarzinom (Wolff et al., 1998), dem Pankreaskarzinom (Molina et al., 1999), dem Ösophaguskarzinom (Shirvani et al., 2000; Zimmermann et al., 1999), dem Dickdarmkarzinom (Kargman et al., 1995) und dem Magenkarzinom (Ristimäki et al., 1997).

Hinsichtlich gynäkologischer Krebserkrankungen wurde eine erhöhte Cox2-Expression im Ovarialkarzinom (Denkert et al., 2002), im Mammakarzinom (Ristimäki et al., 2002; Half et al., 2002; Soslow et al., 2000) und im Zervixkarzinom (Ferrandina et al., 2002) nachgewiesen.

Dagegen ist die Cox2-Expression in Hepatozyten gering (Yamamoto et al., 2001), was für die Sicherheit adenoviraler Gentherapieansätze hinsichtlich der Akkumulation des Vektors in der Leber von großer Bedeutung ist.

Genetische und klinische Studien weisen darauf hin, dass eine erhöhte Cox2-Expression sogar eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese spielt und an Tumorprogression und -angiogenese beteiligt ist (Cao et al., 2002). So war eine Cox2 Überexpression im Tiermodell ausreichend für eine Tumorgenese. Darüber hinaus ist bekannt, dass es nach einer viralen Infektion zu erhöhter Cox2-Expression kommt (Steer et al., 2003; Hirschowitz et al., 2002; Huang et al., 2001).

Durch den Einsatz Cox2-Promotor gesteuerter Adenoviren konnte bereits eine spezifische Transgenexpression erzielt werden, während die Expression in der Leber und in Zellen des Mesothels gering war (Barker et al., 2003; Yamamoto et al., 2001; Casado et al., 2001a).

Der Cox2-Promotor wurde auch schon in Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom untersucht (Casado et al., 2001a) und zeigte sowohl in Zelllinien als auch in primären Tumorzellen eine hohe Aktivität.

Somit ist der Cox2-Promotor ein viel versprechender Kandidat für den Einsatz als tumorspezifischer Promotor in der Kontrolle des viralen Vermehrungszyklus.

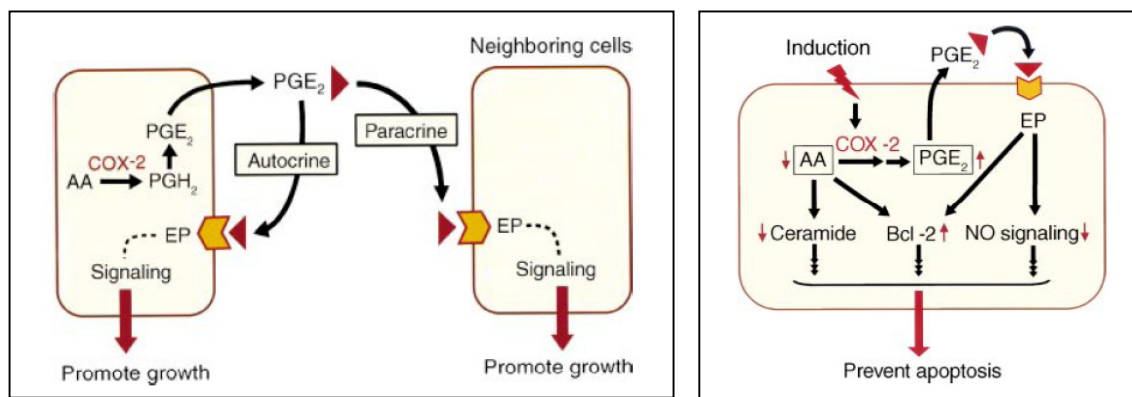


Abb. 1.10: Cox2 vermittelt eine Steigerung der Proliferation und die Inhibition der Apoptose

Links: Cox2 katalysiert die Umsetzung von Arachidonsäure (AA) zum Prostaglandin PGH₂. Aus PGH₂ wird unter anderem PGE₂ synthetisiert, das autokrin und parakrin zu einer Steigerung der Proliferation führt.

Rechts: Cox2 vermittelt durch unterschiedliche Mechanismen die Inhibition der Apoptose.

(Quelle: Cao und Prescott, 2002)

In der vorliegenden Arbeit wurde der tumorspezifische Cox2-Promotor in zwei Längenvarianten eingesetzt (Cox2L: -1432 bis +59; Cox2M: -883 bis +59; Yamamoto et al., 2001), um die optimale Promotorstärke für die Steuerung der adenoviralen Replikation zu ermitteln (s. 3.3.1.2). Beide Varianten weisen drei Haupt-Regulationssequenzen (Bindestellen für NF- κ B, NFIL-6 und CRE) innerhalb von 300 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt auf (vergl. Diskussion 4.1 und Abb. 4.1). Der längere Promotor Cox2L gilt aufgrund weiterer upstream gelegener regulatorischer Sequenzen als spezifischer in seiner Regulation, jedoch geringer in seiner Aktivität (Yamamoto et al., 2001).

1.5.7.2 Die tumorspezifische 5/3-Fiberchimerisierung

Es konnte bereits demonstriert werden, dass die onkolytische Potenz replikationskompetenter Adenoviren maßgeblich durch die Infektionsrate determiniert wird (Douglas et al., 2001). Der primäre Rezeptor des Adenovirus Serotyp 5, der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), wird jedoch höchst unterschiedlich in verschiedenen Gewebetypen exprimiert. Bei der Untersuchung der Rezeptorexpression in fortgeschrittenen klinischen Tumoren (Mamma-, Ovarial-, Lungen-, Prostatakarzinom) hat sich herausgestellt, dass Tumorzellen CAR oft nur geringfügig oder gar nicht exprimieren (Bauerschmitz et al., 2002a). Es gibt Hinweise auf eine inverse Korrelation von CAR-Expression und Tumorgrad (Okegawa et al., 2001), wohingegen eine Vielzahl normaler Gewebe, wie auch Zellen der Leber (Hepatozyten, Kuppfer-Zellen), eine hohe CAR-Dichte aufweisen. Dies kann zu Resistenzen von Tumorzellen gegenüber der adenoviralen Infektion bei gleichzeitigem Risiko einer unerwünschten Viruswirkung im Normalgewebe führen. Eine reduzierte adenovirale Gentransferrate vermindert deutlich die Effizienz adenoviraler Gentherapieansätze.

Um trotzdem eine effiziente Adhäsion und Infektion von Tumorzellen mit Ad5-basierten CRAbs zu erreichen, wurde durch genetische Fibermodifikation eine Chimäre konstruiert, die die Knob-Domäne (eigentliches Bindungselement) des Adenovirus Serotyp 3 trägt (Kanerva et al., 2002a). Auf diese Weise erfolgt ein Retargeting der tropismusmodifizierten CRAbs zum Ad3-Rezeptor und eine nunmehr CAR-unabhängige Transduktion (Abb 1.11). Mit Ad5/3-fibermodifizierten Adenoviren konnte der Gentransfer in Ovarialkarzinomzellen und primären Tumorzellen um den Faktor 300 erhöht werden (Kanerva et al., 2002a). Dabei waren Biodistribution der tropismusmodifizierten Viren und ihre Toxizität (murines Tiermodell) vergleichbar mit Ad5-basierten Vektoren, die wiederum in klinischen Studien als sicher eingestuft werden konnten.

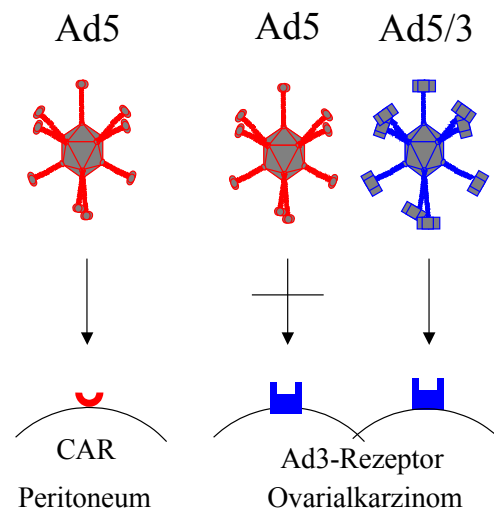


Abb. 1.11: Prinzip des transduktionellen Targetings durch den Einsatz fiber-modifizierter Adenoviren (Fiberchimäre Serotyp 5 und 3).
 Die Grafik zeigt rechts die Bindung eines fibermodifizierten Ad5/3-Viruspartikels (blau) an den Ad3-Rezeptor (blau) einer CAR-defizienten Ovarialkarzinomzelle. (modifiziert nach Bauerschmitz et al., 2002a)

1.5.7.3 Tumorspezifische E1A-Deletionen

Eine weitere Möglichkeit, um die Tumorspezifität der CRAds zusätzlich zur transkriptionellen und transduktionellen Steuerung zu erhöhen, ist die genetische Veränderung der essentiellen Virusgene selbst. Diese Strategie stellt einen zusätzlichen Sicherheitsmechanismus dar, um die virale Replikation und die damit verbundene Zerstörung der Wirtszelle möglichst auf Tumorzellen zu beschränken.

Ein Beispiel für eine derartige Attenuierung ist die $\Delta 24$ -Deletion in der CR2-Region des E1A-Gens, durch die acht Aminosäuren innerhalb des E1A-Genproduktes entfernt werden (Fueyo et al., 2000). Bei dieser Region handelt es sich um die Bindestelle von Rb/p16 (Abb. 1.12). Das mutierte E1A-Protein ist dadurch nicht länger in der Lage, Rb zu binden und dadurch den Übergang der Wirtszelle in die S-Phase zu induzieren. Die Zellzyklusprogression ist jedoch essentiell für die Virusvermehrung. Damit wird die Virusreplikation in benignen Wirtszellen verhindert. In Tumorzellen hingegen ist der Rb-Pathway oft defekt, so dass die Zellen, unabhängig von der Rb-vermittelten Zellzykluskontrolle, den G1/S-Checkpoint passieren und proliferieren können. Infolgedessen können auch die $\Delta 24$ -deletierten CRAds in diesen Zellen replizieren.

Somit kann durch die $\Delta 24$ -Deletion die Abhängigkeit der Virusreplikation von einem mutierten Rb/p16-Pathway der Wirtszelle erreicht werden.

Ein ähnlicher Mechanismus, um die CRA Δ Produktion auf Tumorzellen zu beschränken ist die Verwendung der $\Delta 2$ -Deletion des E1A-Gens (Nettelbeck et al., 2002). Dabei handelt es sich um die Entfernung der Bindestelle für das zelluläre p300-Protein. Die E1A-Interaktion mit p300 ist ein weiterer Mechanismus, der die Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase ermöglicht. p300 aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die an der Differenzierung und der Inhibierung des Zellzyklus beteiligt sind. E1A-Proteine bilden Komplexe mit p300/CBP, inhibieren die intrinsische Histon-Acetylierungsaktivität und reprimieren die Aktivierung der Transkription (Chan et al., 2001a). Die Replikation $\Delta 2$ -deletierter CRA Δ s ist somit an Zellen gebunden, die durch einen genetischen Defekt keine Inhibierung des Zellzyklus über den p300-Pathway erfahren. Da Mutationen des p300-Gens häufig in Tumorzellen auftreten, wird damit eine weitere Erhöhung der Tumorzellspezifität erreicht.

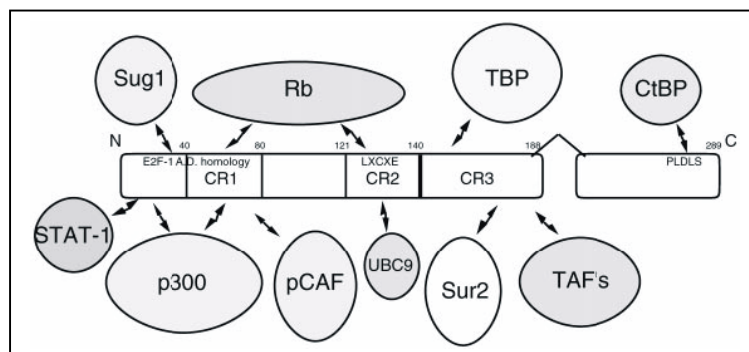


Abb. 1.12: Das adenvirale E1A-Protein und seine Interaktion mit zellulären Faktoren

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die Interaktion von E1A mit Rb und p300. Die Bindestellen für diese zellulären Faktoren wurden durch die $\Delta 24$ -Deletion (Rb) bzw. $\Delta 2\Delta 24$ (Rb und p300) entfernt. (Quelle: Russell et al., 2000)

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Trotz erster klinischer Erfolge in der onkolytischen Virotherapie bleiben Zielzellspezifität für maligne Tumorzellen und Effizienz der Infektion und Replikation konditional replizierender Adenoviren (CRAds) weiterhin problematisch. Als Folge dessen können sich eine nicht ausreichende Wirksamkeit und unerwünschte Nebenwirkungen ergeben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung neuer, innovativer CRAds, die speziell für die Behandlung gynäkologischer Malignome, insbesondere des Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinoms entwickelt wurden. Die Cyclooxygenase-2 (Cox2) Promotor gesteuerten und tropismusmodifizierten CRAd-Vektoren sollten sowohl in vitro als auch in vivo im Mausmodell getestet werden.

Dabei sollte zunächst die Cox2-Expression in gynäkologischen Zelllinien untersucht werden. Der Einfluss der Fibermodifikation auf die Infektionsrate sollte mittels Reporter-gen-Analyse überprüft werden.

Darüber hinaus umfasste die Charakterisierung der CRAds die Untersuchung des onkolytischen Potentials, das durch die unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Targeting-Strategien bedingt wird. Überdies erstreckte sich die Fragestellung darauf, ob auch die mehrfach-modifizierten Viren noch in der Lage sind, in Tumorzellen zu replizieren und zu einer ausreichenden Zelllyse zu führen. Fragen zur optimalen Promotorstärke für die Steuerung onkolytischer Adenoviren sollten durch den Einsatz zweier Cox2-Promotorvarianten geklärt werden.

Um die direkte Korrelation zwischen Zelllyse und Virusreplikation in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle zu demonstrieren, sollten neue Nachweismethoden entwickelt werden.

Um schließlich die Wirksamkeit auch in vivo zu evaluieren, sollten entsprechende Tierversuche durchgeführt werden.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit dienen der Vorbereitung einer klinischen Studie und langfristig als Beitrag zur Behandlung von Patientinnen mit gynäkologischen Krebserkrankungen. Möglicherweise ließe sich für den Einzelfall in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp, den Eigenschaften der malignen Zielzellen (z.B. Virus-Rezeptor-Expression, Expressionsprofil) und dem Immunstatus der Patientin eine individuell maßgeschneiderte Virotherapie entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

A.L.F.-Auftragspuffer

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

Aufbewahrungsmedium für Zellen

250 ml PBS
42.8 g Sucrose
0.33 g MgCl_2
250 ml Glycerin

Dialysepuffer

10 mM Tris pH 8,0
2 mM MgCl_2
5% Sucrose

Formalin

10% Formaldehyd (37%) in PBS

Gellösung für A.L.F.-Gele

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

Monomerenlösung (29:1)

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

Probenpuffer für A.L.F. Gele

7 M Harnstoff
40% (v/v) Glycerin
50 mM EDTA
10 mM Tris
0,1% (w/v) Bromphenolblau

1 x TBE

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

1 x TE

10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

Viruslysepuffer

0,1% SDS (w/v)
10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA

Virusverdünnungspuffer

8 g NaCl
0,2 g KCl
3 g Tris
ad 800 ml H_2O ; autoklavieren,
Zugabe 10 % Glycerin (steril)

2.1.1 Reagenzien-Kits

Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega)

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)

Gene Releaser[®] (Bioventures)

OmniScript RT-Kit (Qiagen)

qPCRTM Mastermix Plus (Eurogentec)

TRIzolTM (Gibco)

Vectastain[®]-ABC-Peroxidase-Kit (Vector Laboratories)

2.2 Zellkultur

Alle Zelllinien werden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete, sterile Plastikmaterial wurde von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Gibco (Karlsruhe) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Allen Medien wurde L-Glutamin (2mM) sowie das Antibiotikum Gentamicin (50 µg/ml) zugesetzt. Kulturmedien enthielten 10% (v/v), Wachstumsmedien 5% (v/v) und Infektionsmedien 2% (v/v) fötales Kälberserum.

Für die Kultivierung der Normalgewebszelllinie MCF-12A wurde im Kulturmedium Pferdeserum (HS) anstelle von fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Weitere zelllinienspezifische Zusätze zu den Kulturmedien sind der Tabelle 2.2.1. zu entnehmen.

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Zusätze	Bezugsquelle
CaSki	Zervix-karzinom	RPMI1640	/	ATCC (CRL-1550)
SiHa	Zervix-karzinom	Eagle's Minimum Essential Medium	/	ATCC (HTB-35)
HeLa	Zervix-karzinom	Eagle's Minimum Essential Medium	/	ATCC (CCL-2)
C33A	Zervix-karzinom	Eagle's Minimum Essential Medium	/	ATCC (HTB-31)
SKOV3.ip	Ovarial-karzinom	RPMI1640	/	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
ES-2	Ovarial-karzinom	McCoy's 5A	/	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
OV-4	Ovarial-karzinom	DMEM/NutMix-F12	/	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
Hey	Ovarial-karzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	Prof. Pfeleiderer, Universität Freiburg, Deutschland
MDA-MB 231	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-26)
MDA-MB 123	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
MDA-MB 963	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
MDA-MB 463	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
MCF-7	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% (v/v)	ATCC (HTB-22)
BT-20	Mamma-karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-19)
SK-BR-3	Mamma-karzinom	McCoy's 5A	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-30)
BT-474	Mamma-karzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	Prof. Curiel, University of Alabama, USA

MCF-12A	Mamma-Gewebe, immortalisiert	DMEM:DMEM/NutMix-F12 (1:1)	Cholera-Toxin(100 ng/ml) EGF (20 ng/ml) Insulin (0,01 mg/ml) Hydrocortison (500 ng/ml)	ATCC (CRL-10782)
HMEC	Mamma-epithel	isoliert aus Reduktionsplasiken, Medium und Zusätze siehe 2.2.6		
A549	Lungenkarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	/	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
293A	Nierenkarzinom	Minimum Essential Medium	/	Qbiogene, Heidelberg
HT29	Dickdarmkarzinom	McCoy's 5A	/	ATCC (HTB-38)
PBMC	Blut-Monozyten	RPMI1640	/	frisch isoliert (siehe 2.2.7)
nHEP	Hepatozyten	DMEM (1 g/l Glukose)	/	Prof. Curiel, University of Alabama, USA

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien, Kulturmedien und Bezugsquellen

2.2.2. Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturflaschen kultiviert und bis zu konfluentem Wachstum im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde mittels steriler Einmalpipetten das Medium gewechselt.

2.2.4. Subkultivierung

Die Passagierung konfluenter Kulturen adhärent wachsender Zellen erfolgte durch Inkubation mit einer 0,05% (w/v) Trypsin / 0,02% (w/v) EDTA-Lösung, durch die die Zellen vom Untergrund abgelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet, durch Zentrifugation (5 min, 1000 Upm) sedimentiert, vereinzelt und dann ihrem Wachstum entsprechend anteilig neu ausgesät.

2.2.5. Kryokonservierung

Die sedimentierten Zellen wurden in Gefriermedium (Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in sterile Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.6 Isolierung humaner Mammaepithelzellen (HMEC) aus Reduktionsplastiken

Gewebeproben aus der Brust gesunder Patientinnen wurden nach ihrer operativen Entfernung in ein steriles Plastikgefäß (Falcon) überführt und in Lagermedium bei 4°C für max. 48 h aufbewahrt. Das Gewicht der jeweiligen Gewebeprobe wurde bestimmt, diese in kleinere Stücke von ca. 1 mm³ Größe geteilt und anschließend in ein steriles Plastikröhrchen mit steriler Kollagenase-Lösung überführt. Für das erste Gramm Gewebe wurden 20 ml, für jedes weitere Gramm weitere 10 ml Kollagenase-Lösung zugegeben.

Die Gewebeprobe wurde über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln (65 Upm) inkubiert und am nächsten Tag durch kräftiges auf- und abpipettieren mit einer sterilen 10 ml Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1000 Upm für 5 min sedimentiert, in 10 ml Waschmedium resuspendiert, in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Epitheliale Zellaggregate wurden mittels Siebseparation von Stromazellen getrennt, indem die Zellsuspension über ein steriles Metallsieb (Porengröße 100 µm, Sigma) gegeben wurde, das für epitheliale Zellaggregate nicht durchlässig war. Das Sieb wurde umgedreht, die epithelialen Zellaggregate mit Waschmedium ausgewaschen und in einem sterilen 15 ml Plastikröhrchen aufgefangen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die epithelialen Zellaggregate in 1 ml IHEC-Medium resuspendiert und Gesamtzellzahl sowie Zellvitalität bestimmt.

Innerhalb von 8-10 Tagen nach Aussaat in IHEC-Medium, das für die Kultur normaler Epithelzellen optimiert ist, wurde die Kultur von humanen mammären epithelialen Zellen (HMEC) dominiert, die eine für Epithelzellen charakteristische Kopfsteinpflaster-ähnliche Morphologie aufwiesen. HMECs wurden nach Stampfer et al. durch partielle

Trypsinierungen der epithelialen Primärkultur isoliert und sofort in Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt (Stampfer, 2004; Ethier et al., 1993).

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

Tab. 2.2: Medien und Lösungen für die Gewinnung und Kultur von primären HMEC.

Alle Medien und Lösungen enthielten die Antibiotika Gentamicin (5 µg/ml) und Penicillin/Streptomycin (1% v/v).

2.2.7 Isolierung humaner Blut-Monozyten (PBMC) aus Frischblut

Mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden nach Herstellerangaben mittels Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation (Pharmacia Biotech) aus frisch abgenommenen Blut isoliert. Nach zwei Waschzyklen mit PBS wurden vitale PBMC mit Trypan-Blau angefärbt und gezählt. Die benötigte Anzahl von Zellen wurde in abgerundete 96-Well Platten (round bottom 96 well plates) ausgesät und in RPMI1640 Medium mit 2 mM L-glutamine und 10% FBS inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1. RNA-Isolation

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um bei der Isolierung der RNA eine Degradierung durch RNAsen zu verhindern. Hierzu wird DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt, im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt und die Lösung nach Inkubation bei 37°C über Nacht autoklaviert.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe) eingesetzt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Es basiert auf einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse die Integrität der RNA schützt.

Trypsinierte und PBS-gewaschene Zellpellets wurden in 1ml Trizol resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben ca. 15 s geschüttelt. Nach 2-3 min Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 12000 Upm) pelletiert, mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut für 5 min bei 9500 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde das RNA-Pellet im Heizblock bei 55°C für 5-10 min getrocknet und in 20 bis 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch.

2.3.2. cDNA-Synthese

Mittels Reverser Transkriptase (OmniScript RT-Kit, Qiagen) und Random-Primern (Hexaoligonukleotide) wurde die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Verwendung unspezifischer Random-Primer ermöglicht es, die gesamte RNA-

Population zu erfassen bzw. mehrere Transkripte gleichzeitig zu untersuchen und zu quantifizieren.

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

2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können gezielt spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden.

Alle PCR-Reaktionen wurden standardmäßig in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Sie enthielten 50 ng DNA, 1 x PCR Reaktionspuffer, jeweils 125 µM dNTPs, je 50 pmol 5'- und 3'- Primer sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Für die quantitative Bestimmung der PCR-Produktmenge (*Automated Laser Fluorescence*-DNA-Sequenzierautomat, A.L.F.) musste ein 5'-Primer eingesetzt werden, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert war.

Für die PCR wurde ein Hybaid Omnigene PCR-Cycler benutzt. Zum Schutz vor Verdunstung mussten die Proben mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet werden. Zur Vermeidung unspezifischer Nebenreaktionen wurden die PCR-Reaktionen mit einem "Hot-Start" gestartet, d.h. die Polymerase wurde erst während einer Vorlaufphase von 10 min bei 94°C zugegeben. Am Schluss jeder PCR-Reaktion wurde eine "final extension" (8 min bei 72°C) durchgeführt, um den vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen.

Die Sequenzen der einzelnen Primer sowie die optimierten PCR-Bedingungen (Zyklenzahl, Annealing-Temperatur) sind den Tabellen 2.3 bis 2.5 zu entnehmen.

amplifizierte DNA	Basensequenz	Fragmentlänge
β-Aktin-cDNA-Kontrolle		
β-Aktin-forward	5´-AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3´	446 bp (cDNA)
β-Aktin-reverse	5´-ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3´	652 bp (gen. DNA)
GAPDH-Expression		
GAPDH-sense	5´-Cy5-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3´	187 bp
GAPDH-antisense	5´-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3´	
Cox2-Expression		
Cox2-sense	5´-Cy5-GGTCTGGTGCCTGGTCTGATGATG-3´	295 bp
Cox2-antisense	5´-GAAGGGGATGCCAGTGATAG-3´	

Tab. 2.3: Primer-Sequenzen. Cy5-markierte Primer wurden zur Detektion im A.L.F. eingesetzt.

2.3.3.1. Qualitätskontrolle der cDNA durch β-Aktin-PCR

Die synthetisierte cDNA wird mittels β-Aktin-PCR (Tab. 2.3 und 2.4) auf ihre Qualität und eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA untersucht. Die Primer wurden so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen ein größeres Fragment (652 bp) ergibt als das cDNA-Fragment (446 bp).

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H ₂ O	32,5	94°C → 1 min 62°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 27
10x Puffer	5,0	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tab. 2.4: β-Aktin-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

2.3.3.3. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression des Cox2-Gens bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation (Multiplex-PCR) des zu untersuchenden Gens und eines "single copy" Gens, d.h. eines in nur einer Kopienzahl vorliegenden Referenzgens in einem PCR Ansatz. Als Referenzgen wurde hier GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) eingesetzt, ein ubiquitär exprimiertes „house keeping gene“. Das GAPDH-Signal diente als interner Standard und erlaubte den Vergleich unterschiedlicher Proben hinsichtlich ihrer Cox2-Genexpression.

Die Bedingungen (Tab. 2.5) für eine quantitative PCR müssen so gewählt werden, dass allein die Menge der eingesetzten cDNA limitierend ist, also keine Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Primern, Nukleotiden oder Taq-Polymerase besteht (vergl. 3.1.1.2, Abb. 3.2 und 3.3). Die Detektion der PCR Produkte sowie die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgte mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software wie unter 2.3.5.1 beschrieben.

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H ₂ O	18,5	94°C → 1 min 60°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 28
cDNA	5,0 (1 µg)	
10x Puffer	5,0	
5'Primer GAPDH	4,0 (40 pmol)	
3'Primer GAPDH	4,0 (40 pmol)	
5'Primer Cox2	5,0 (50 pmol)	
3'Primer Cox2	5,0 (50 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tab. 2.5: Reaktionsansatz und Bedingungen der quantitativen RT-PCR zur Analyse der Cox2 mRNA-Expression. Die 5'-GAPDH-Primer wurden sowohl Cy5-markiert, als auch unmarkiert in einem Verhältnis von 1:20 eingesetzt. Der Cy5-markierte 5'-Cox2-Primer wurde aufgrund des schwächeren Signals unverdünnt eingesetzt.

2.3.3.4. Real-Time PCR zur Quantifizierung adenoviraler Partikel

Die Real-Time PCR ermöglicht die Detektion und die genaue Quantifizierung von Nukleinsäuren. Dabei wird die Amplifizierung einer bestimmten Sequenz durch den Einsatz markierter Gensonden in Echtzeit gemessen und aufgezeichnet. Über die Menge des PCR-Produktes in der exponentiellen Phase der Reaktion kann auf die Ausgangskonzentration in der Probe geschlossen werden. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in der sehr guten Reproduzierbarkeit und in der Erfassung großer Konzentrationsbereiche in der Ausgangsprobe.

Um die adenovirale Replikation direkt nachzuweisen, wurden Zellen mit Adenoviren infiziert und die Gesamtviruslast der Proben mittels Real-Time PCR über einen Zeitraum von 10 Tagen ermittelt. Dazu wurde in jeder Probe eine Sequenz des adenoviralen E4-Gens (ORF6) und des zellulären β -Aktin-Gens quantifiziert (Sequenzen der Primer und Sonden: Tab. 2.6). Die E4-Kopienzahl wurde auf die Menge zellulärer DNA bezogen, um eine Normierung auf die Zellzahl zu erreichen.

Die absolute Quantifizierung beider Gen-Sequenzen erfolgte dabei über die Verwendung je eines DNA-Standards, der bei jedem Probenlauf in der gleichen PCR mit aufgetragen wurde (vergl. 3.3.2.1, Abb. 3.18 und 3.19). Zum einen war dies eine serielle Verdünnungsreihe von 10^2 - 10^8 Kopien pro 25 μ l Reaktionsvolumen des hochreinen Plasmids pTG3602 (Transgene, Strasbourg, Frankreich; Chartier et al., 1996), das eine Kopie des adenoviralen E4-Gens trägt. Für die absolute Quantifizierung der β -Aktin-Sequenz wurden 0,002-2 ng humane genomische DNA (Applied Biosystems) pro 25 μ l Reaktionsvolumen eingesetzt.

Jede PCR umfasste mindestens zwei Positivkontrollen und zwei Non-template Kontrollen jeweils für beide Zielgene.

Infektion und Probenentnahme

Zunächst wurden in einer 96-Well Platte 15.000 Zellen pro Well in 100 μ l Wachstumsmedium (5% FCS) ausgesät. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit 10 VP/Zelle des jeweiligen Virus in 50 μ l Infektionsmedium (2% FCS) infiziert, nach einer Stunde wurden 100 μ l Wachstumsmedium (5% FCS) zugegeben. Nach 2, 4, 6, 8 und

10 Tagen wurden die infizierten Zellen samt virushaltigem Überstand geerntet. Dazu wurden die Zellen mit einer 100 µl-Pipettenspitze vom Untergrund abgelöst und samt Überstand in PCR-Tubes überführt. Anschließend erfolgte der thermische Aufschluss von Zellen und Viruspartikeln der Probe durch vier Zyklen mit je 5 min +99,9°C und 5 min –3°C in einem Thermocycler. Nach kurzem Abzentrifugieren der Virus- und Zelltrümmer wurde das Zell-/ Viruslysat bis zum Einsatz in der Real-Time PCR bei –20°C gelagert. Für jede Probe (d.h. jedes Virus und jeden Zeitpunkt) wurden drei unabhängige Infektionen und PCR-Läufe durchgeführt.

amplifizierte DNA	Basensequenz
Adenovirale E4-Sequenz (Ad5/E4/ORF6)	
Forward-Primer	5'-GGAGTGCGCCGAGACAAC-3'
Reverse-Primer	5'-ACTACGTCCGGCGTTCCAT-3'
Sonde	5'-Fam-TGGCATGACACTACGACCAACACGATCT-Tamra-3'
Humane β-Aktin-Sequenz	
Forward-Primer	5'-TAAGTAGGCGCACAGTAGGTCTGA-3'
Reverse-Primer	5'-AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAG-3'
Sonde	5'-Fam-CAGACTCCCCATCCCAAGACCCCA-Tamra-3'

Tab. 2.6: Sequenzen der Primer und Sonden für die Quantifizierung adenoviraler Partikel mittels Real-Time PCR (Bezugsquelle: Metabion, Martinsried, Deutschland)

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
Template (=Lysat)	5	Initial: 50°C → 2 min HotGoldStar Aktivierung: 95° → 10 min 95°C → 15 s 62°C → 1 min Zyklenanzahl: 40
qPCR™ Mastermix Plus	12,5	
5'Primer GAPDH	2,5 (15 pmol)	
3'Primer GAPDH	2,5 (15 pmol)	
Sonde	2,5 (5 pmol)	

Tab. 2.7: Reaktionsansatz und Bedingungen der Real-Time PCR zur die Quantifizierung adenoviraler Partikel

Real-Time PCR

Die Reaktion wurde nach Herstellervorgaben durchgeführt (qPCR™ Mastermix Plus, Eurogentec), wobei die Reaktionsansätze auf die Hälfte des Volumens, d.h. 25 µl reduziert wurden (Tab. 2.7). Der qPCR™ Mastermix Plus enthält bereits 2xReaktionspuffer, dNTPs (inkl. dUTP), Hot Goldstar DNA Polymerase, MgCl₂, Uracil-N-Glycosylase, stabilisierende Agenzien und eine passive Referenz.

Für die E4- und die β -Aktin-Reaktionen wurde jeweils ein Mastermix vorbereitet. In jedes Well der 96-well Platte (*Thermo-Fast 96 Detection Plate*, Abgene, Hamburg), wurden 20 μ l des jeweiligen Mastermixes vorgelegt. Nach Zugabe von 5 μ l der jeweiligen Probe (Zell-Virus-Lysat, siehe oben) wurde die Platte mit einer speziellen, lichtdurchlässigen Folie (*AbsoluteTM QPCR Seal*, Abgene, Hamburg) verschlossen. Die Real-Time PCR wurde in einem Thermocycler von ABI durchgeführt (ABI 7900HT) und die ermittelten Daten mit der dazu gehörigen Software SDS (*Sequence Detection System*) ausgewertet.

2.3.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in Lösungen wurde eine photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260 nm / 280 nm wurde zur Kontrolle des Reinheitsgrades herangezogen.

Die Nukleinsäure-Konzentration errechnet sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt: $c = E \times 1/\epsilon \times 1/d$.

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

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

2.3.5 Elektrophoretische Auftrennungsmethoden

2.3.5.1. Elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F.

Mit Hilfe von Sequenzierautomaten (A.L.F., Pharmacia) ist die Auftrennung und Quantifizierung auch geringer Nukleinsäuremengen möglich. Dabei liegt der optimale Trennbereich der verwendeten Polyacrylamid-Gele für DNA-Fragmente zwischen 60 und 400 bp. Die Fluoreszenz der Cy5-markierten PCR-Produkte wird durch einen Laserstrahl im unteren Drittel des vertikalen Polyacrylamidgels angeregt. Die Detektion der emittierten Strahlung erfolgt senkrecht zum Laserstrahl über Photodioden bei einer Wellenlänge von 632,8 nm (Helium-Neon-Laser). Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird direkt während der elektrophoretischen Auftrennung durch das optische System des A.L.F. gemessen und die Daten durch eine gekoppelte EDV erfasst und gespeichert. Nach Beendigung des Laufs können die Rohdaten mit Hilfe der Software *Fragment-Manager* ausgewertet werden.

Für die 29%-ige Polyacrylamid-Gellösung wurden 25,2 g Urea und 9 ml Monomerenlösung in 25,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 5 g Amberlite für 10 min gerührt. Nach dem Filtrieren von 6 ml 6 x TBE und der Gellösung wurden beide vereint und entgast. Dann wurden 40 µl TEMED und 200 µl 10%iges APS zugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation konnten die Proben aufgetragen werden.

Für die Fragmentanalysen wurden die PCR-Produkte mit Aqua dest. 1:5 verdünnt. 5 µl der Verdünnung wurden mit 5 µl A.L.F.-Probenauftragspuffer versetzt. Die Proben wurden vor der Auftragung auf das Gel für 5 min bei 95°C denaturiert und 3 min auf Eis abgekühlt.

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

Tab. 2.8: Verwendete Parameter für die A.L.F.-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.3.5.2. Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5 bis 1,5%-igen Agarosegelen (w/v in 1x TBE-Puffer). Proben wurden vor der Auftragung im Verhältnis 1:2 mit SB-Probenpuffer gemischt. Als Längenstandard wurden die 1kb DNA-Leiter (Gibco BRL) oder die SmartLadder (Eurogentec) eingesetzt, mit deren Hilfe die Fragmentlänge der aufgetrennten PCR-Produkte ermittelt werden konnte.

Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 100 bis 110 Volt für 45 bis 150 min. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) für mindestens 30 min gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=312$ nm) konnte die Fluoreszenz des interkalierten Agens angeregt und die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Verwendete Adenoviren

Virus	Beschreibung
Ad5CMVLuc	Replikationsdefizient durch E1-Deletion, Luziferase-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors
Ad5/3CMVLuc	Replikationsdefizient durch E1-Deletion, Luziferase-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5cox2LLuc	Replikationsdefizient durch E1-Deletion, Luziferase-Gen unter Kontrolle des Cox2L-Promotors
Ad5LacZ	Replikationsdefizient durch E1-Deletion, lacZ Gen unter Kontrolle des viralen E1-Promotors
Ad5Wt	Humanes Wildtyp Adenovirus Serotyp 5
Ad5/3 Δ 24	CRA _{Ad} , 24 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2LE1	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2L-Promotors, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2L Δ 24	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2L-Promotors, 24 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2L Δ 2 Δ 24	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2L-Promotors, 24 bp und zusätzliche 6 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2ME1	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2M-Promotors, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2M Δ 24	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2M-Promotors, 24 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3
Ad5/3cox2M Δ 2 Δ 24	CRA _{Ad} , E1A-Gen unter Kontrolle des Cox2M-Promotors, 24 bp und zusätzliche 6 bp Deletion im E1A-Gen, chimäre Fiber mit Tail- und Shaft-Domäne von Ad5 und Knob-Domäne von Ad3

Tab. 2.9: Auflistung verwendeter Adenoviren. Alle Cox2-CRA_{Ad}s wurden freundlicherweise von Dr. G. Bauerschmitz, Universitätsklinik Düsseldorf, bereitgestellt. Ad5CMVLuc, Ad5/3CMVLuc, Ad5cox2Luc, Ad5LacZ und Ad5Wt wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Curiel, University of Alabama (USA), bezogen. Ad5/3 Δ 24 wurde freundlicherweise von Dr. A. Kanerva, University of Helsinki (Finnland), bereitgestellt.

2.4.2 Virusproduktion mittels *Large Scale Virus Preparation*

Mittels *Large Scale Virus Preparation* wurde, ausgehend von Virusstocks (ca. 5×10^7 VP/ml), die Virusproduktion in großem Maßstab durchgeführt. Das Eintreten des zytopathischen Effekts (CPE) dient hier als Maßstab für die erfolgreiche Virusproduktion. Der CPE beschreibt ein Phänomen, das bei der Virusreplikation und Produktion in Zellen auftritt. Dabei kommt es zum Durchlaufen des lytischen, adenoviralen Infektionszyklus und in Folge dessen zum Absterben der Zellen und der Freisetzung neuer viraler Partikel. Der CPE zeigt sich primär in der charakteristischen Abkuglung Virus-infizierter Zellen und ihrer Ablösung vom Kulturgefäß. Die Adenoviren sind bis zur Lyse der Zellen, die erst 1-2 Tage nach der Infektion der Wirtszelle einsetzt, innerhalb der Zellen eingeschlossen und können so durch die Ernte dieser Zellen angereichert werden.

Für die Virusproduktion Replikations-defizienter Adenoviren ($\Delta E1\Delta E3$) wird standardmäßig die embryonale Nierenzellkarzinom-Zelllinie 293 verwendet. Durch die stabile genomische Integration der adenoviralen E1-Region sind 293A Zellen in der Lage, die Deletion des adenoviralen E1-Gens zu komplementieren, wodurch die Replikation rekombinanter $\Delta E1\Delta E3$ -deletierter Adenoviren in 293 Zellen ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu werden Replikations-kompetente Adenoviren (CRAds) unter Verwendung der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 generiert, die sich für die Herstellung von CRAds bewährt hat. CRAds sollten wenn möglich nicht in 293 Zellen generiert werden, da potentiell Rekombinationsereignisse zwischen der genomischen und adenoviralen E1-Region möglich sind.

A549-Zellen wurden in 40 Zellkulturplatten ($\approx 175 \text{ cm}^2$) ausgesät und bei einer Konfluenz von $>90\%$ die adenovirale Infektion durchgeführt. Für die Virusinfektion wurde ein Aliquot des vorhergehenden Produktionsmaßstab ($2 \times 75 \text{ cm}^2$) verwendet. Die Infektion wurde mit Kulturmedium durchgeführt, das 2% FCS enthielt. Für die Infektion wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und das virushaltige Medium (7 ml) zugegeben. Nach 2 h wurde mit Kulturmedium (5% FCS) auf das normale Kultivierungsvolumen von 30 ml aufgefüllt. Dabei war zu beachten, dass die Zellen durch die virale Infektion unter Stress stehen und sich nun sehr leicht von dem Schalenboden ablösen. Um das zu verhindern, musste das Kulturmedium äußerst vorsichtig zugegeben werden. Die infizierten Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO_2

inkubiert, bis sich ein vollständiger zytopathischer Effekt (CPE) einstellte. Die 293-Zellen begannen ca. 2 Tage nach Infektion sich abzukugeln und lösten sich bis zum 3. Tag vom Boden des Kultivierungsgefäßes ab. Nach der Ernte mussten die Zellen möglichst bei 4°C gelagert werden, um eine vorzeitige Lyse der Zellen zu verhindern. Abschließend wurden die Zellen bei 1000 Upm für 10 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 bis 10 ml 2%-igem Kulturmedium aufgenommen und bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet (siehe nächster Punkt).

2.4.3 Freisetzung der Adenoviren

Um die Adenoviren gezielt aus den Verpackungszellen freizusetzen, wurde das Pellet nach der Ernte der Zellen durch so genannte Gefrier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Dabei wurde die Zellsuspension abwechselnd für 20 min in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und sofort wieder im 37°C Wasserbad aufgetaut (20 min). Nach viermaligem Gefrier-Tau-Zyklus war der Zellaufschluss abgeschlossen und die Viren lagen frei in der Lösung vor. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde für 10 min bei 4°C und 1200 Upm zentrifugiert, der virushaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.4.4 Aufreinigung und Dialyse

Die Virussuspension besteht neben funktionellen viralen Partikeln auch aus defekten Viruspartikeln und Resten von Zelltrümmern. Um die infektiösen Partikel zu isolieren, wurde die Virussuspension über zwei Cäsiumchlorid(CsCl)-Gradienten aufgereinigt. Dafür wurde ein diskontinuierlicher CsCl-Gradient in Zentrifugenröhrchen (*Quick-Seal*, Beckman, Palo Alto, CA, USA) gegossen, indem zuerst die Virussuspension eingefüllt wurde. Anschließend wurde die leichtere CsCl-Lösung (Dichte: 1,2 g/cm³) unterschichtet und durch Unterschichten der schwereren CsCl-Lösung (Dichte: 1,4 g/cm³) das Volumen des Röhrchens aufgefüllt. Dieser Gradient wurde für 90 min bei

5°C und 60.000 Upm zentrifugiert. Die Bande der infektiösen viralen Partikel wurde eluiert und über einen zweiten identischen diskontinuierlichen Gradienten weiter aufgereinigt. Dieser zweite Gradient wurde bei 5°C und 60.000 Upm für >18h zentrifugiert. Die infektiösen, adenoviralen Partikel wurden zur Entfernung des CsCl über Nacht bei 4°C dialysiert. Dabei hatte das Volumen des Dialysepuffer mindestens das 200fache des Volumens der Viruslösung. Nach Abschluss der Dialyse wurden die Viren im Verhältnis 1:2 mit Virusverdünnungspuffer gemischt, in 10 bis 50 µl Aliquots abgefüllt und bei –80°C gelagert.

2.4.5 Titerbestimmung

Die Ausbeute der Virusproduktion wurde sowohl physikalisch (OD-Messung) als auch biologisch (*tissue culture infectious dose 50*, TCID₅₀) ermittelt (siehe unten).

2.4.5.1 OD-Messung zur Bestimmung der gesamten Viruspartikelzahl

Diese Methode basiert auf der photometrischen Messung viraler DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein Aliquot der Viruslösung wurde im Verhältnis 1:3, 1:5 und 1:10 mit Viruslysepuffer gemischt und durch Schütteln für 20 min bei 56°C lysiert.

Durch Messung der optischen Dichte der Virusverdünnungen konnte die Anzahl viraler Partikel in Lösung nach folgender Formel berechnet werden:

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

2.4.5.2 Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀)

Sowohl für die Bestimmung des biologischen Titers nach der Viruspräparation als auch zur Untersuchung der Replikation rekombinanter CRAds in unterschiedlichen Zelllinien (s. 3.3.2.2) wurde die Methode *tissue culture infectious dose 50* verwendet.

Der TCID₅₀-Test basiert auf der Ausprägung des CPE in 293A-Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen adenoviralen Titern.

Jede Titerbestimmung wurde standardmäßig in zwei 96-Well-Platten als Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well und 100 µl Volumen ausgesät und direkt im Anschluss mit 100 µl des jeweiligen Virus infiziert. Die virale Infektion erfolgte jeweils als sequentielle Verdünnungsreihe der jeweiligen Probe in 10-fach Bestimmung nach dem in Abb. 2.1 dargestellten Schema. Die Spalten 11 und 12 stellen die Negativ-Kontrollen dar und wurden nicht infiziert. Für die virale Infektion wurden die entsprechenden Verdünnungen der Stammlösung in 293-Kulturmedium mit 2% FCS angesetzt.

Die Platte wurde nach der Infektion 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der CPE-positiven Wells. Ein Well wurde als CPE-positiv gewertet, wenn bereits wenige Zellen CPE zeigten. Dabei waren die Virusverdünnungen so zu wählen, dass die niedrigste Verdünnung in allen Wells CPE und die höchste Verdünnung in keinem der Wells CPE induzierte.

Der Virustiter T (TCID₅₀/ml) berechnet sich nach folgender Formel:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

Dabei gilt d = log (Verdünnungsfaktor) und S = ΣCPE-Wells/10.

Der TCID-Titer kann wie folgt in die gebräuchliche Einheit „*plaque forming unit*“ (PFU) umgerechnet werden:

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

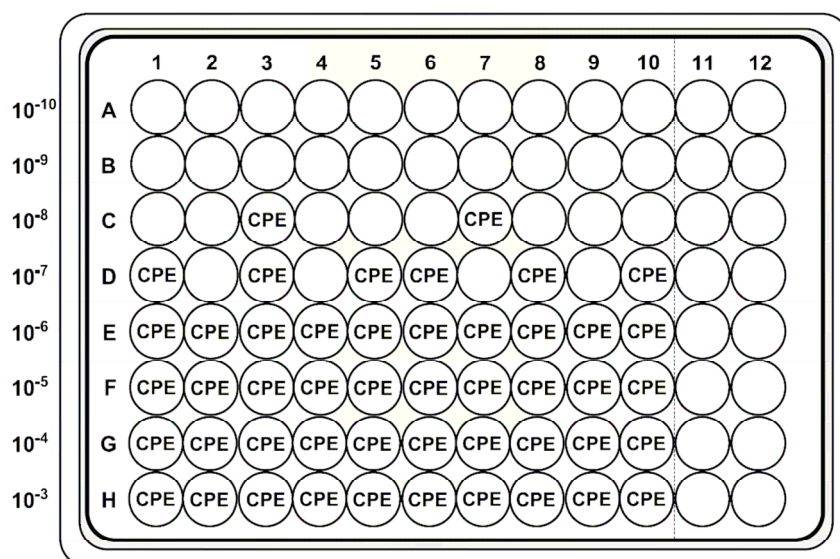


Abb. 2.1: Exemplarisches Ergebnis eines TCID₅₀

Die schematische Darstellung zeigt eine 96-Well-Platte. Links ist die Verdünnung der Probe angegeben (Reihe A-H), mit der die entsprechenden Wells infiziert werden. Die Spalten 11 und 12 stellen die Negativ-Kontrollen dar und werden nicht infiziert. Der Test kann nur ausgewertet werden, wenn die niedrigste Verdünnung (Reihe H) CPE in allen Wells und die höchste Verdünnung (Reihe A) in keinem der Wells CPE induziert. (Quelle: AdEasy™ Vector System Application Manual, Qbiogene, 2002)

2.4.5.3 Qualität der Viruspräparation

Das Maß für die Qualität einer Virusproduktion ergibt sich aus dem Verhältnis infektiöser Viruspartikel (biologischer Titer in PFU/ml) zur absoluten Viruspartikelzahl (physikalischer Titer in VP/ml). Das Verhältnis sollte 1:100 nicht überschreiten. Alle Adenoviren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wiesen ein Verhältnis zwischen 1:11 und 1:33 auf (siehe auch Tab. 3.1).

2.5 Sonstige in vitro Methoden

2.5.1 Immunhistochemie

2.5.1.1 Anzucht von Zellen auf Objektträgern

Zellen wurden auf sterilen Objektträgern in Quadriperm-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mittels Formalin (15 min) auf den Objektträgern fixiert, mit PBS gewaschen (5 min) und nacheinander für 5 min in Methanol (-20°C) und für 1 min in Aceton (-20°C) inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit PBS (5 min) konnten die Objektträger in einem speziellen Aufbewahrungsmedium bis zu sechs Monate bei -20°C gelagert werden.

2.5.1.2 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung der fixierten Zellen wurde unter Verwendung des Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kits (Vector Laboratories) durchgeführt. Dabei werden Zellen zunächst mit dem Primärantikörper inkubiert. Daraufhin erfolgt die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Die hohe Affinität von Avidin zu Biotin ermöglicht im nächsten Schritt die Bindung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes an den biotinylierten

Sekundärantikörper. Schließlich wird das chromogene Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin; ScyTek) zugegeben, das durch die Peroxidase-Aktivität oxidiert und als braunes Präzipitat sichtbar wird.

Die Objektträger mit den fixierten Zellen wurden aus dem Aufbewahrungsmedium entnommen, mit PBS gespült und 15 min lang in 10 mM Citratpuffer gekocht. Um eine spätere unspezifische Umsetzung des Chromogens DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu verhindern, wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid (10 min) inaktiviert.

Anschließend wurde die Probe erneut mit PBS gewaschen und mit einem Cox2-spezifischen, polyklonalen IgG-Primärantikörper aus Kaninchen (Dianova, Best.Nr. DLN-15525) laut Herstellerempfehlungen für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min nach Herstellerangaben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 30 min mit dem ABC-Reagenz (Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kit, Vector Laboratories) inkubiert und erneut mit PBS gespült. Nach Zugabe des chromogenen DAB-Substrates (ScyTek) und Inkubation für 10 min wurden die Zellen mit Leitungswasser gespült und anschließend die Zellkerne mit Hämalaun (nach Mayer, MERCK) gefärbt. Um eine möglichst vollständige Entwässerung der Zellen zu erreichen, wurden die Zellen einer ansteigenden Alkohol-Reihe mit finaler Xylol-Inkubation unterzogen. Die Objektträger wurden schließlich mit Eukitt® (Kindler GmbH & Co), einem wasserfreien Einschlussmittel für die mikroskopische Technik, eingebettet.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte lichtmikroskopisch. Abschließend wurden die Zellpräparate mit einer Digitalkamera (DXM 1000, Nikon), die an ein Phasenkontrast-Mikroskop angeschlossen war, fotografiert.

2.5.2 Luziferase-Reportergen-Assay

Das Luziferase-Reportergen wird standardmäßig für die Untersuchung der Genexpression in Säugerzellen eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *Bright-Glo™ Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) eingesetzt, um zum einen die Aktivität eines heterologen Promotors im adenoviralen Kontext und zum

zweiten Unterschiede in der Infektionsrate tropismusmodifizierter CRAds zu analysieren.

Bei diesem Assay handelt es sich um eine spezielle Variante des Luziferase-Assays, der für die luminometrische Messung von 96-Well-Platten entwickelt wurde. Einerseits ist hierbei die Signalintensität der Luziferase-Reaktion im Vergleich zu älteren Systemen stabiler (Halbwertszeit >25 min bei 22°C), so dass die reproduzierbare Messung von 96 Proben gewährleistet ist. Andererseits ist auch die Sensitivität gegenüber anderen Signal-stabilisierten Luziferase-Assays höher. Dadurch können auch geringe Luziferaseaktivitäten im letzten Well der Messplatte analysiert werden.

Die Luziferase-Reaktion beruht auf der Monooxygenierung von Luziferin zu Oxiluziferin, die durch das Luziferase-Enzym katalysiert wird. Die freiwerdende Biolumineszenz wird im Luminometer quantifiziert. Aufgrund der Temperatur-abhängigkeit der Luziferase-Reaktion wurden Zellen und Reagenzien vor ihrer Verwendung für mind. 2 h bei RT inkubiert.

Für den Bright-GloTM-Assay wurden jeweils 1×10^4 Zellen in eine 96-Well-Platte in 100 µl Wachstumsmedium (5% FCS) ausgesät. Die adenovirale Infektion der Zellen erfolgte 24 h später. Hierfür wurden die Zellen für 2 h mit Adenoviren in je 50 µl Infektionsmedium pro Well (2% FCS) infiziert (Dreifachbestimmungen), bevor 100 µl Kulturmedium (10% FCS) pro Well hinzu gegeben wurden. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen lysiert. Dafür wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Pro well wurden 100 µl Lysispuffer (Glo Lysis Buffer, Promega, Mannheim) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur war die Zelllyse abgeschlossen und 50 µl des Lysats wurden in eine Messplatte überführt. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Bright-GloTM-Assay Reagenz und 5 min Inkubation bei RT wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Dabei wurde im Plattenluminometer (Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) die Lichtemission jedes Wells für die Zeitdauer von 1 s bestimmt.

Die aufgezeichneten Daten wurden mittels einer angeschlossene Software ausgewertet. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen wurden auf den Mittelwert der Luziferase-Aktivität des Referenzvirus Ad5CMVLuc bezogen. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Für die Aktivitätsmessung des heterologen Promotors wurden die resultierenden relativen Luziferase-Aktivitäten als prozentualer Anteil der CMV-Promotor vermittelten Luziferase-Aktivität angegeben (%CMV).

2.5.3 Kristall-Violett-Assay

Zunächst wurde das onkolytische Potential ausgewählter CRAds in einigen Zelllinien mittels Kristall-Violett-Assay untersucht. Beim Kristall-Violett-Assay handelt es sich um eine Methode, bei der Zellen durch die Färbung des Gesamtproteins visualisiert werden können.

$1,25 \times 10^5$ Zellen wurden in eine 24-Well-Platte mit je 1ml Wachstumsmedium (5% FCS) ausgesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit entsprechenden Virusverdünnungen in 500 µl Infektionsmedium (2% FCS) für 1 h bei 37°C infiziert, bevor 1ml Wachstumsmedium pro Well hinzugegeben wurde. Die Zellvitalität wurde täglich kontrolliert, das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Sobald bei Wells mit der geringsten Viruslast CPE oder zytotoxische Effekte beobachtet wurden, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 10 min bei RT mit Formalin fixiert. Nach der Entfernung des Formalins wurde das Gesamtprotein der fixierten Zellen mit je 1 ml Kristall-Violett-Lösung (1% Crystal Violet in 70% Ethanol) je Well für 20 min bei RT angefärbt. Überschüssige Crystal-Violet-Lösung wurde unter fließendem Wasser abgewaschen und die Platten getrocknet, bevor sie fotografiert wurden.

2.5.4 Zytotoxizitäts-Assays

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche CRAds in vitro hinsichtlich ihres onkolytischen Potentials charakterisiert. Dazu wurden mittels MTS-Zytotoxizitäts-Assay (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega*) nach CRAd-Infektion Zytotoxizitätsprofile in Normal- und Tumorzellen erstellt.

Der verwendete MTS-Assay stellt eine etablierte Methode zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in Proliferations- oder Zytotoxizitäts-Assays (MTS-Assay) dar. Gemessen wird die Dehydrogenase-Enzymaktivität metabolisch aktiver Zellen. Der kolorimetrische Test basiert auf der enzymatischen Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTS zum violetten Formazan unter Beteiligung von NADPH oder NADH. Die Absorption des

produzierten Formazans wird photometrisch bei 492 nm gemessen. Die Quantität des Formazan-Produktes bzw. die Farbintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Jeweils 10^4 Zellen wurden in 100 μ l Wachstumsmedium (5% FCS) in 96-Wellplatten ausgesät und 24 h später mit einem CRAd bzw. Kontrollvirus infiziert. Dabei wurden adenovirale Partikel mit dem jeweiligen Virustiter in 50 μ l Infektionsmedium (2% FCS) angesetzt und nach Entfernung des Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Nach 2 h wurden 100 μ l Wachstumsmedium zugegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO² inkubiert. Beim Auftreten sichtbarer Zelllyse bei geringster Viruslast (5-7 Tagen nach Infektion) wurde mittels MTS-Assay der Anteil vitaler Zellen gemessen.

Die Durchführung des Assays erfolgte durch die Zugabe von 20 μ l MTS zu 100 μ l Kulturvolumen je Well (96 Well Platte) und einer Inkubationszeit von 2-4 h bei 37°C und 5% CO₂. Die Menge des umgesetzten Formazan-Produktes wurde spektrometrisch im ELISA-Platten-Reader (anthos htll) bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die experimentellen Werte wurden durch Subtraktion von Werten jeweils mitgeführter Kontrollansätze (gleiches Mediumvolumen mit MTS ohne Zellen) bezüglich der Hintergrundabsorption des Mediums bei 490 nm korrigiert.

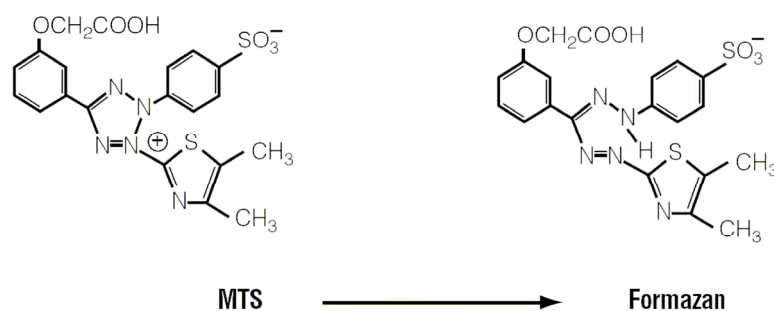


Abb. 2.2: Zugrundeliegende Farbreaktion des verwendeten Zytotoxizitäts-Assays
Struktur des MTS-Agens (gelb) und des resultierenden Formazanproduktes (violett)
(Quelle: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Manual, Promega)

2.6 In vivo Untersuchung: Tierversuche

Die Untersuchung der antitumoralen Effizienz einer Therapie mit den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten konditional replizierenden Adenoviren erfolgte in zwei unabhängigen murinen Tumormodellen. Hierbei wurde eine somatische, lokal angewandte Therapie zur Behandlung von malignen Ovarialtumoren am SCID-Mausmodell und Nacktmausmodell durchgeführt mit dem Ziel durch gezielte virale Replikation selektiv nur Tumorzellen abzutöten. Gemessen werden sollen je nach verwendetem Tiermodell Tumorgröße bei subkutanen bzw. Überlebenszeit bei intraperitonealen Tumoren.

Nach Inokulation von humanen Tumorzellen und Etablierung entsprechender solider Tumoren in Versuchsmäusen wurden die CRAds in Abhängigkeit vom verwendeten Tumormodell subkutan bzw. intraperitoneal appliziert.

2.6.1 Subkutaner Ovarialkarzinom-Mausmodell

Die Wirksamkeit des therapeutischen Ansatzes wurde in vivo im murinen Nacktmausmodell überprüft. Zu diesem Zweck wurden den Mäusen subkutan 1×10^7 Tumorzellen der Ovarialkarzinomzelllinie Hey implantiert (Versuchsschema siehe Abb. 3.22). Nach Erreichen einer Tumorgröße von 100 mm^3 wurde mit der Therapie begonnen. Dazu wurden an drei aufeinander folgenden Tagen intratumoral je 1×10^8 VP des jeweiligen Virus injiziert (1. Injektion = Tag 1) und das Tumorstadium über 15 Tage gemessen.

Die Tumorstadium V wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$V = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,5 \quad (\text{nach Arteaga et al., 1993})$$

Die Tumorstadium wurde täglich mit einer Schieblehre bestimmt, um Unterschiede des Tumorstadiums in den verschiedenen Gruppen festzustellen. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Student's t-Test (paarweise, doppelseitig) herangezogen. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.6.2 Intraperitoneales Ovarialkarzinom-Mausmodell

50 CB17 SCID-Mäusen (5 Gruppen à 10 Tiere) wurde zu Beginn des Versuchs (Tag 0) SKOV3.ip Zellen (1×10^7 Zellen in 500 μ l PBS) intraperitoneal implantiert (Versuchsschema siehe Abb. 3.24). Nach Anwachsen der Tumorzellen am Peritoneum und Erreichen einer in Vorversuchen etablierten Tumorlast (7 Tage nach Zellinokulation) wurden an drei aufeinander folgenden Tagen je 10^8 VP des jeweiligen Virus intraperitoneal injiziert.

Im Folgenden wurden die Versuchstiere täglich inspiziert und über einen Zeitraum von 110 Tagen die Überlebensrate beobachtet. Im Falle von übermäßiger Belastung und Stress wurden die Tiere getötet.

Abschließend wurden die gewonnenen Daten in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und die Überlebenszeit zwischen den Gruppen paarweise mittels Log-Rank Test unter Verwendung der Software SPSS 11.5 verglichen.

2.7 Statistik

Für die statistische Analyse wurden die Daten aus unabhängigen Experimenten verwendet. Beide Luziferase-Assays sowie die Quantifizierung viraler Partikel mittels Real-Time PCR wurden in dreifacher, die Zytotoxizitäts-Assays in vierfacher Ausführung durchgeführt. Im Falle der Luziferase-Assays sind die jeweiligen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Cox2-Promotors im Hinblick auf die Steuerung von CRAds (Transkriptionelles Targeting)

Um eine Selektivität der viralen Replikation für maligne Zielzellen zu erzielen, können Promotoren genutzt werden, die in Tumorzellen in besonderem Maße aktiv sind. Diese so genannten tumorspezifischen Promotoren (TSP) werden dann zur Kontrolle früher adenoviraler Gene eingesetzt, die essentiell für die Virusreplikation sind (transkriptionelles Targeting, s. Einleitung: 1.5.5.1). Auf diese Weise wird eine Abhängigkeit der Virusreplikation von der Aktivität des Promotors in der infizierten Wirtszelle erreicht. Dabei ist es wichtig, die Virusvermehrung bzw. die nachfolgende Zelllyse in Normalzellen zu verhindern, um lebenswichtige Organe zu schonen und somit eventuelle Nebenwirkungen onkolytischer Adenoviren zu minimieren.

In vielen Tumorentitäten epithelialen Ursprungs konnte eine erhöhte Expression der Cyclooxygenase-2 (Cox2) nachgewiesen werden, eines induzierbaren Enzyms, das an der Synthese von Prostaglandinen beteiligt ist (s. Einleitung: 1.5.7.1). Im Gegensatz dazu wird Cox2 in den meisten Geweben, wie auch der Leber, unter physiologischen Bedingungen nur gering exprimiert.

Damit scheint der Cox2-Promotor ein viel versprechender Kandidat für den Einsatz als tumorspezifischer Promotor in der Kontrolle des viralen Vermehrungszyklus zu sein.

3.1.1 Analyse der Cox2-Genexpression in Zervix- und Mammakarzinomen

Zunächst sollte mit zwei unabhängigen Methoden überprüft werden, inwieweit Cox2 in gynäkologischen Zelllinien tatsächlich exprimiert wird.

Die ersten Daten, die zur Auswahl des Cox2-Promotors als Kandidat zur Steuerung von CRAds geführt haben, stammen aus Micro-Array-Untersuchungen und mussten verifiziert werden.

Für das Ovarialkarzinom (OvCa) lagen hinsichtlich der Verwendung dieses Promotors für eine gentherapeutische Virotherapie bereits Daten vor (Kanerva et al., 2004a; Casado et al., 2001a). Aus diesem Grund beziehen sich die nachfolgend gezeigten Daten ausschließlich auf Zervix- (CeCa) und Mammakarzinomzellen (MaCa).

3.1.1.1 Cox2-Genexpression auf Proteinebene

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression des Cox2-Proteins in ausgewählten Zervix- und Mammakarzinomzelllinien untersucht. Für die Proteindetektion wurde ein Cox2-spezifischer, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Dianova) verwendet.

Die Cox2-Expression konnte immunhistochemisch sowohl in der getesteten Zervixkarzinomzelllinie CaSki, als auch in den drei untersuchten Mammakarzinomzelllinien BT-20, MCF-7 und MDA-MB-231 nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Dabei zeigte die Anfärbung die Lokalisation des Cox2-Proteins im Zytosol und an der Membran. BT-20 zeigte die stärkste Expression, die im Bereich der Positivkontrolle A549 lag. MCF-7 wies eine mittelstarke Cox2-Expression auf, während MDA-MB-231 und CaSki-Zellen als schwach positiv getestet wurden.

Die Cox2-negativen Kontrollzelllinien HT29 (Abb. 3.1) und BT-474 (Daten nicht gezeigt) wurden immunhistochemisch erwartungsgemäß negativ auf die Cox2-Expression getestet.

3.1.1.2 Cox2-Genexpression auf mRNA-Ebene

Mittels quantitativer RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) wurde die Cox2-Expression auf transkriptioneller Ebene analysiert. Die mRNA-Konzentration korreliert in der Regel stärker mit der Promotoraktivität als die Proteinkonzentration, da die Proteinexpression ebenfalls durch translationale Regulationsmechanismen beeinflusst wird.

Im ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA aus 13 unterschiedlichen Zelllinien isoliert und jeweils quantitativ in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Diese cDNA wurde anschließend in einer ebenfalls quantitativen PCR amplifiziert und somit die mRNA-

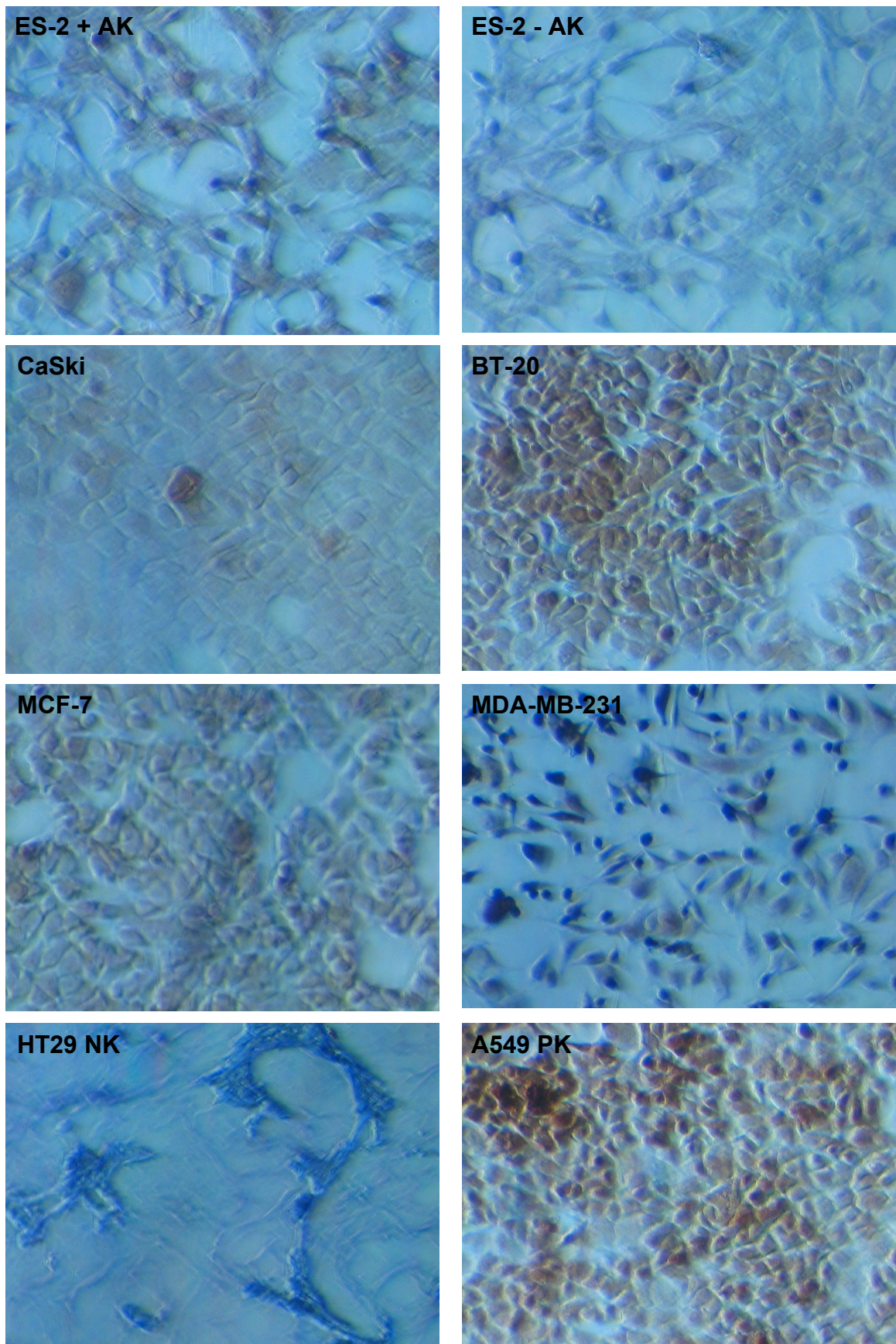


Abb. 3.1 Immunhistochemischer Nachweis der Cox2-Expression in ausgewählten gynäkologischen Tumorzelllinien

Oben: Kontrollfärbung der Ovarialkarzinomzelllinie ES-2 mit und ohne Cox2-Antikörper (AK)

Mitte: Zervixkarzinomzelllinie CaSki und Mammakarzinomzelllinien BT-20, MCF-7 und MDA-MB-231

Unten: Cox2-negative Darmkarzinomzelllinie HT29 als Negativkontrolle (NK), Cox2-positive Lungenkarzinomzelllinie A549 als Positivkontrolle (PK)

Expression ermittelt. Hierbei wurde Cox2 mit dem ubiquitär exprimierten Haushaltsgen GAPDH koamplifiziert (Multiplex-PCR). Dieser interne Standard ermöglicht einen Vergleich der Genexpression zwischen den Zelllinien. Zur Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurde ein DNA-Sequenzierautomat eingesetzt (A.L.F. Express).

Etablierung

Um eine quantitative Koamplifizierung des Ziel- und Referenzgens zu gewährleisten, müssen zahlreiche Parameter der PCR optimal eingestellt werden. Dazu gehören die Zyklenzahl und die Primerkonzentration, sowie dNTP-Menge, Enzymkonzentration, Annealing-Temperatur und Laufzeiten des PCR-Programms.

Ein geeignetes Primerpaar für Cox2 wurde mit Hilfe des Programms „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) ermittelt. Eventuelle Homologien zu anderen Genen wurden mit BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ausgeschlossen. Das resultierende Cox2-PCR-Produkt war 295 bp groß. Das PCR-Produkt der GAPDH-Amplifizierung hatte eine Größe von 187 bp.

Die optimale Annealing-Temperatur für die Amplifizierung sowohl des Ziel- als auch des Referenzgens wurde durch Testung mittels Agarose-Gelelektrophorese auf 60°C festgelegt.

Um eine Quantifizierung des PCR-Produktes zu ermöglichen, muss die PCR im linearen Bereich gestoppt werden. Die hierzu erforderliche Zyklenzahl war für die etablierte GAPDH-PCR bereits bekannt und wurde für Cox2 in einer zyklenabhängigen PCR ermittelt, bei der alle anderen Parameter konstant gehalten wurden (Abb. 3.2). Für beide Reaktionen ergab sich ein optimaler Bereich bei 28 Zyklen.

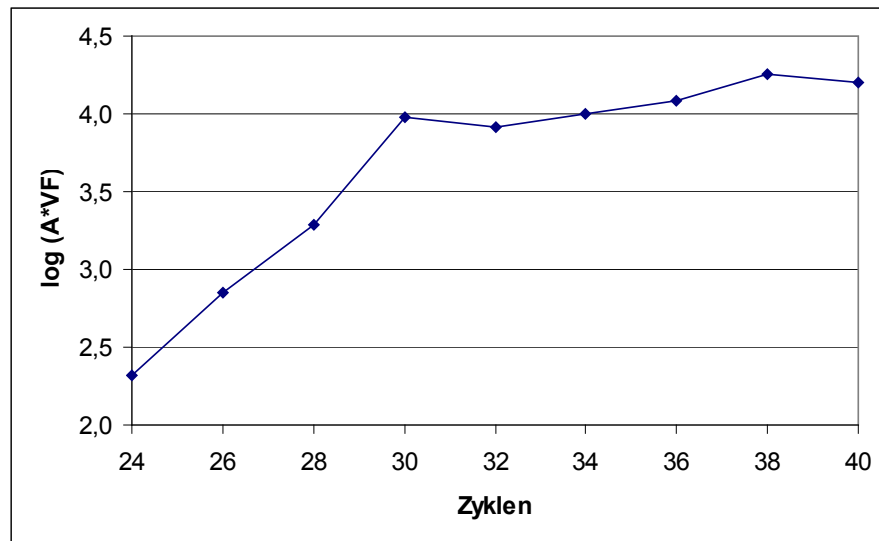


Abb. 3.2 Abhängigkeit der PCR-Produktmenge (Signalfläche, y-Achse) von der Anzahl der PCR-Zyklen in der Cox2 PCR-Reaktion

Die Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte mittels A.L.F.-Sequenzierautomaten erfordert, dass die nebeneinander detektierten Signale von Cox2 und GAPDH in einem vergleichbaren Größenbereich liegen. Zu diesem Zweck wurde der Cy5-fluoreszenzmarkierte GAPDH fwd Primer vor der PCR mit unmarkiertem fwd Primer im Verhältnis 1:20 verdünnt. Der entsprechend markierte Cox2-sense Primer wurde aufgrund des schwächeren Signals unverdünnt eingesetzt.

Um eine Limitierung des PCR-Produktes aufgrund begrenzter Primerkonzentration zu verhindern, wurde jeweils für Cox2 und GAPDH die Primerabhängigkeit getestet (Abb 3.3). Im gewählten Bereich war die Produktmenge für beide Reaktionen nahezu konstant, so dass im Folgenden jeweils 5 μ l Cox2-sense und -antisense und jeweils 4 μ l GAPDH fwd und rev Primer eingesetzt wurde.

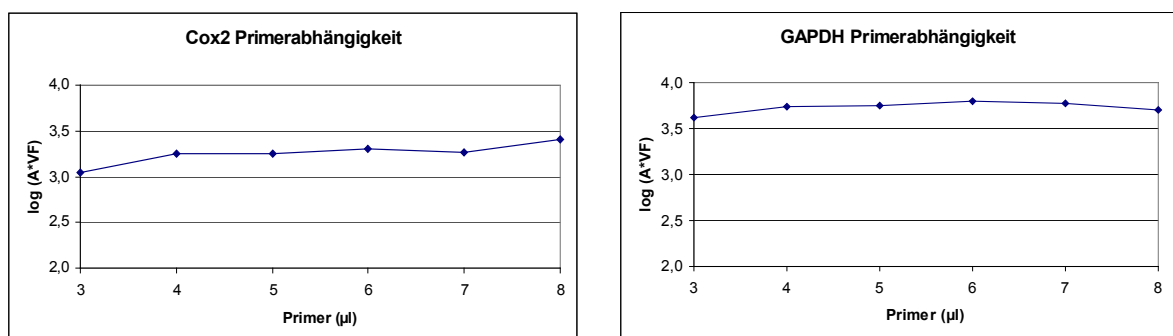


Abb. 3.3 Abhängigkeit der PCR-Produktmenge (Signalfläche, y-Achse) von der Primerkonzentration in der Cox2 und GAPDH PCR-Reaktion

Ergebnisse

In 3/4 CeCa-Zelllinien (HeLa, SiHa, CaSki) und in 3/8 MaCa-Zelllinien (MDA-MB 231, MDA-MB 123, Sk-Br-3) konnte eine Cox2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.4, 3.5). In den standardmäßig als Cox2-negativ eingesetzten BT-474-Zellen konnte erwartungsgemäß keine Expression gemessen werden.

Entgegen den Erwartungen zeigte die zur Kontrolle eingesetzte Normalgewebszelllinie MCF-12A (immortalisierte Mammaepithelzellen) eine hohe Cox2-Genexpression.

Die Daten der RT-PCR korrelierten nicht mit den Ergebnissen der Immunhistochemie: In BT-20 und MCF-7 Zellen konnte hier keine Expression gemessen werden, obwohl beide in der AK-Färbung eine hohe Intensität aufwiesen. Da bei der Proteindetektion jedoch auch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen ins Gewicht fallen, dürften die Ergebnisse der mRNA-Messung im Hinblick auf die transkriptionelle Steuerung adenoviraler Vektoren von größerer Relevanz sein.

Die besonders hohe Cox2-Expression in den beiden CeCa-Zelllinien HeLa und CaSki lässt eine gute onkolytische Effizienz der Cox2-gesteuerten CRAds erwarten. Der Cox2-Promotor stellt also eine viel versprechende Möglichkeit dar, um als tumorspezifischer Promotor den viralen Vermehrungszyklus zu kontrollieren, möglicherweise auch in anderen als den getesteten Tumorentitäten.

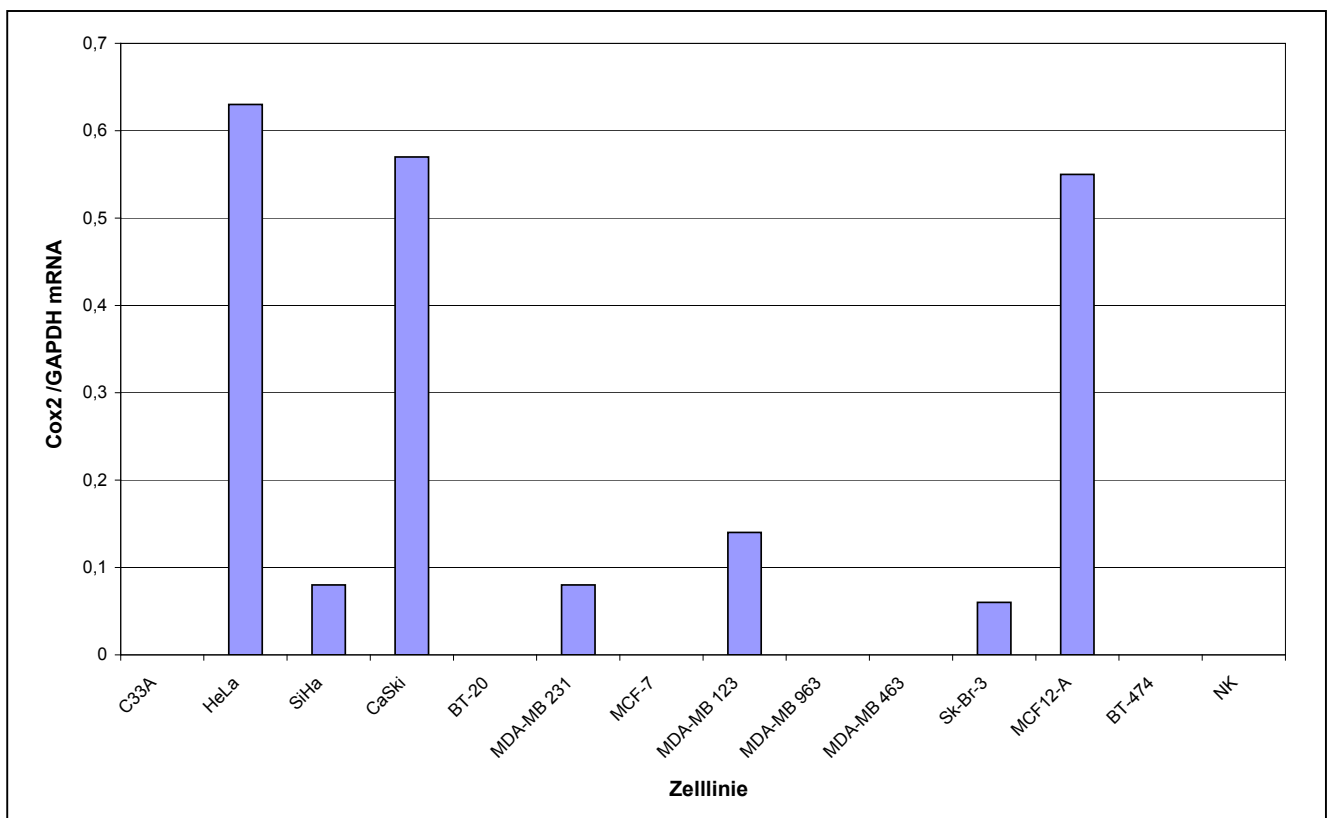


Abb. 3.4 Relative Cox2-Genexpression in Zervix- und Mammakarzinomzelllinien (vergl. Abb. 3.5)

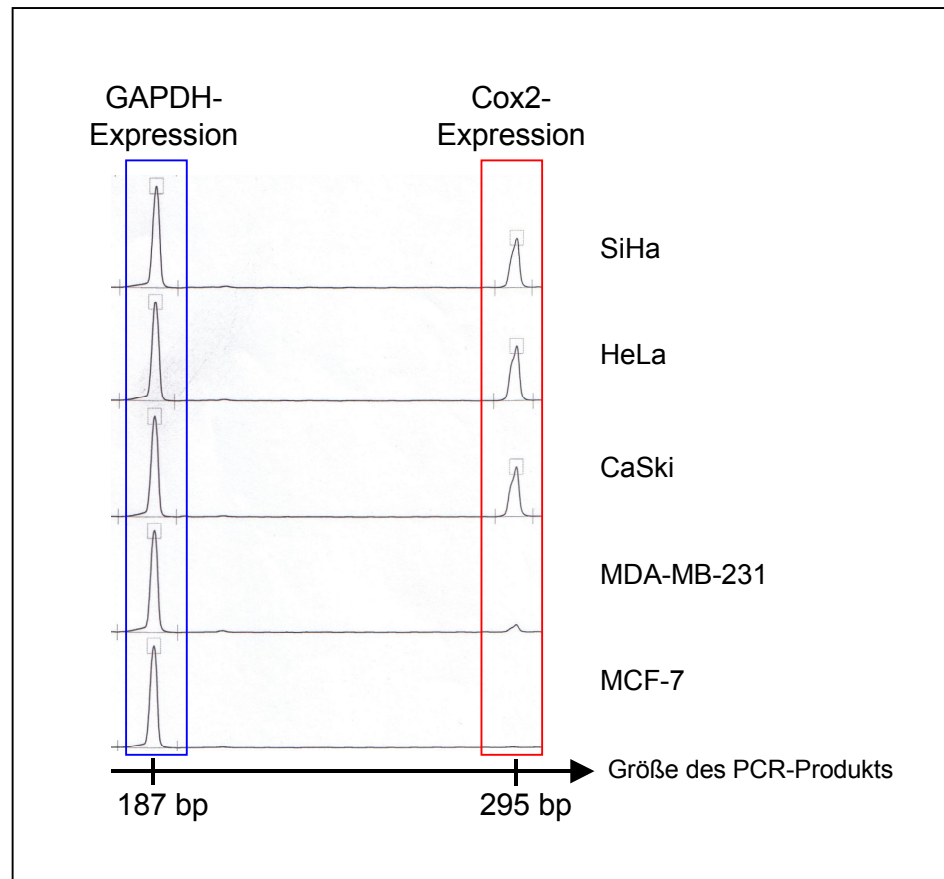


Abb. 3.5 Elektrophoretogramm der Auftrennung der PCR Produkte zur Analyse der Cox2-Genexpression in Zervix- und Mammakarzinomzelllinien am Beispiel ausgewählter Zelllinien (vergl. Abb. 3.4)

Dargestellt ist die Signalstärke (y-Achse) in Abhängigkeit von der Größe des PCR-Produktes. Die jeweilige Peakfläche gibt die Menge des GAPDH (blau) bzw. Cox2 (rot) PCR-Fragments an.

3.1.2 Analyse der Cox2-Promotoraktivität im Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Eine notwendige Voraussetzung für eine effiziente onkolytische Virotherapie ist die ausreichende Aktivität des steuernden tumorspezifischen Promotors. Aus diesem Grund kommen ausschließlich Promotoren in Betracht, die in Tumorgewebe nachweislich hochreguliert sind. Die Promotoraktivität muss hoch genug sein, um den viralen Vermehrungszyklus in Gang zu setzen, der wiederum in der Zerstörung der Zielzelle endet.

Mittels RT-PCR konnte bereits eine Cox2-Expression in 3/4 CeCa-Zelllinien und in 3/8 MaCa-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Aktivität eines Promotors ist jedoch auch abhängig von distalen Regulatoren, die bei der Insertion der Promotorsequenz in das Virusgenom verloren gehen. Um die Aktivität des Cox2-Promotors im adenoviralen Kontext zu überprüfen, wurden Luziferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt.

Dazu wurde das nicht-replikative Adenovirus Ad5cox2LLuc eingesetzt, bei dem das Luziferase-Reporter-Gen unter der Kontrolle des Cox2L-Promotors steht. Als isogenetisches Referenzvirus diente Ad5CMVLuc mit dem ubiquitär exprimierten *immediate early* Promotor und der Enhancer-Region des Cytomegalovirus (CMV).

Hierbei wurde die jeweilige Zelllinie mit Ad5cox2LLuc und Ad5CMVLuc mit 1 bis 100 PFU/Zelle infiziert und nach 48h die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Hintergrundsignale der Negativkontrollen (0 PFU/Zelle) lagen dabei deutlich (Faktor 10) unter den Lumineszenz-Signalen der Proben. Die Luziferase-Aktivitäten wurden innerhalb einer Zelllinie auf die Luziferase-Aktivitäten des Referenzvirus Ad5CMVLuc bezogen (% CMV). Während des Versuchs wurde die Vitalität der Zellen mikroskopisch überprüft, um Abweichungen aufgrund eventueller toxischer Effekte der Virusinfektion ausschließen zu können.

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine Aktivität des Cox2-Promotors gezeigt werden (Abb. 3.6). Dabei lagen die in den CeCa-Zellen (C33A, HeLa, SiHa, CaSki) gemessenen Werte bei 10 PFU/Zelle deutlich höher (9,2 bis 24,6 % CMV) als bei den MaCa-Zellen (BT-20, MDA-MB-231, MCF-7; 1,1 bis 3,8 % CMV).

Die eher geringe Cox2L-Promotoraktivität in MaCa-Zellen im Vergleich zu CeCa-Zellen korreliert tendenziell zu den Ergebnissen der Cox2-Genexpressionsmessungen. In BT-20 und MCF-7 ließ sich mittels RT-PCR keine Cox2-Expression nachweisen, und beide Zelllinien zeigten dementsprechend auch im Luziferase-Assay die geringsten Promotoraktivitäten. Insgesamt jedoch ist die Korrelation der Luziferase-Assays mit der Immunhistochemie und RT-PCR relativ gering. Während mittels RT-PCR in der CeCa-Zelllinie C33A keine Cox2-Genexpression gemessen werden konnte, ist die Luziferase-Aktivität in dieser Zelllinie die höchste. Diese Abweichung wird auf eine erhöhte Toxizität der Ad5CMVLuc-Infektion zurückzuführen sein, die bei C33A-Zellen gegenüber den anderen untersuchten Zelllinien zu beobachten war. Die daraus folgende geringere Signalstärke in den Referenzproben führt in der Darstellung der Promotoraktivität als Quotienten zu einer scheinbar höheren Cox2L-Promotoraktivität in C33A-Zellen. Dennoch zeigen die Ergebnisse des Luziferase-Assays im Gegensatz zu den Daten der RT-PCR eine relevante Cox2L-Promotoraktivität auch in C33A-Zellen, was wohl auf den adenoviralen Kontext zurückzuführen ist.

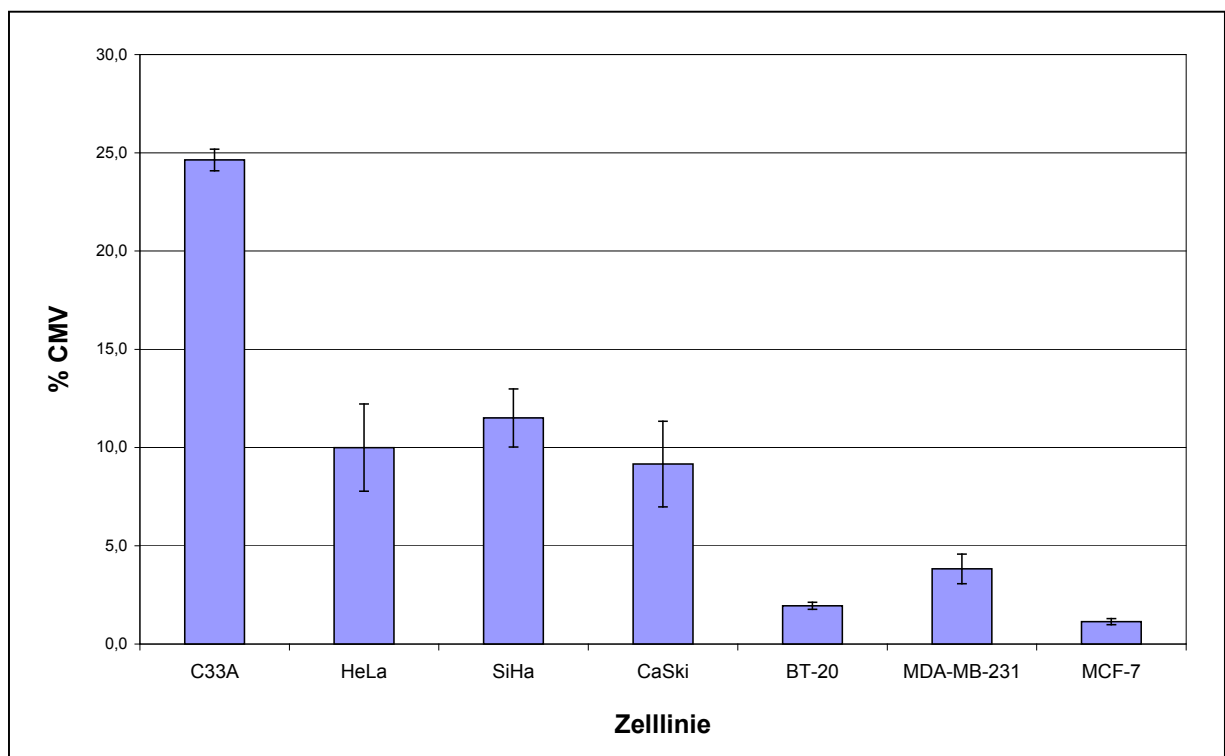


Abb. 3.6 Cox2L-Promotoraktivität in Zervix- und Mammakarzinomzelllinien

Dargestellt ist die relative Luziferase-Aktivität (% CMV) von Ad5cox2LLuc bezogen auf Ad5CMVLuc nach Infektion mit 10 PFU/Zelle. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Verbesserung der adenoviralen Infektionsrate durch Fibermodifikation (Transduktionelles Targeting)

Der primäre Rezeptor des Adenovirus Serotyp 5 ist der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Nach der Adhäsion eines Viruspartikels (VP) an CAR erfolgt zusätzlich die Bindung an α_v Integrine, gefolgt von der Internalisierung des Virus.

Die CAR-Expression ist jedoch in Tumorzellen oft deutlich reduziert, was zu Resistenzen gegenüber der adenoviralen Infektion führen kann. Eine verringerte adenovirale Gentransferrate vermindert die Effizienz adenoviraler Gentherapieansätze und macht eine Erhöhung der Virus-Dosis erforderlich, was wiederum zu einem schlechteren Nebenwirkungsprofil führt.

Ein Ansatz, um die CAR-Defizienz maligner Zielzellen zu umgehen, ist das transduktionelle Targeting. Hierbei wird die veränderte Rezeptorexpression für eine spezifische Infektion dieser Zellen genutzt, indem der Vektor durch die genetische Veränderung des Viruskapsids zu einem alternativen Rezeptor umgeleitet wird.

Um eine effiziente Adhäsion und Infektion von Tumorzellen mit Ad5-basierten CRAds zu erreichen, wurde durch genetische Fibermodifikation eine Chimäre konstruiert (Ad5/3), die die Knob-Domäne (eigentliches Bindungselement) des Adenovirus Serotyp 3 (Ad3) trägt (Kanerva et al., 2002a). Auf diese Weise erfolgt ein Retargeting der tropismusmodifizierten CRAds zum Ad3-Rezeptor und eine nunmehr CAR-unabhängige Transduktion (s. Einleitung: 1.5.7.2 und Abb. 1.11). Ad5/3-fibermodifizierte Adenoviren zeigten bereits deutlich verbesserte Infektionsraten in OvCa-Zellen (Kanerva et al., 2002a).

Im vorliegenden Fall sollte überprüft werden, ob sich durch den Einsatz einer fibermodifizierten Ad5/3-Chimäre ebenfalls eine verbesserte Infektionsrate in Zervix- und Mammakarzinomen erreichen lässt im Vergleich zu einem Ad5-Vektor.

Hierzu wurde die jeweilige Zelllinie mit Ad5CMVLuc und Ad5/3CMVLuc mit 1 bis 100 Viruspartikeln pro Zelle (VP/Zelle) infiziert und nach 48h die Luziferase-Aktivität

bestimmt. Die Hintergrundsignale der Negativkontrollen (0 VP/Zelle) lagen dabei deutlich (Faktor 10) unter den Luminiszenz-Signalen der Proben. Während des Versuchs wurde die Vitalität der Zellen mikroskopisch überprüft, um Abweichungen aufgrund eventueller toxischer Effekte der Virusinfektion ausschließen zu können.

In Abb. 3.7 ist jeweils der Quotient der Luziferase-Aktivitäten von Ad5/3- zu Ad5-infizierten Zellen innerhalb einer Zelllinie dargestellt. In allen getesteten Proben war dieser Quotient >1 , was einer Erhöhung der adenoviralen Infektionsrate durch die beschriebene Fibermodifikation entspricht (*Infectivity Enhancement*).

Der größte Effekt konnte bei MCF-7, CaSki- und SiHa-Zellen erreicht werden mit einer 5- bis 7-fachen Steigerung der Infektionsrate durch den veränderten Tropismus der Ad5/3-Fiberchimäre.

Damit ist die eingesetzte Ad5/3-Fiberchimäre geeignet, die Infektion von Tumorzellen zu verbessern.

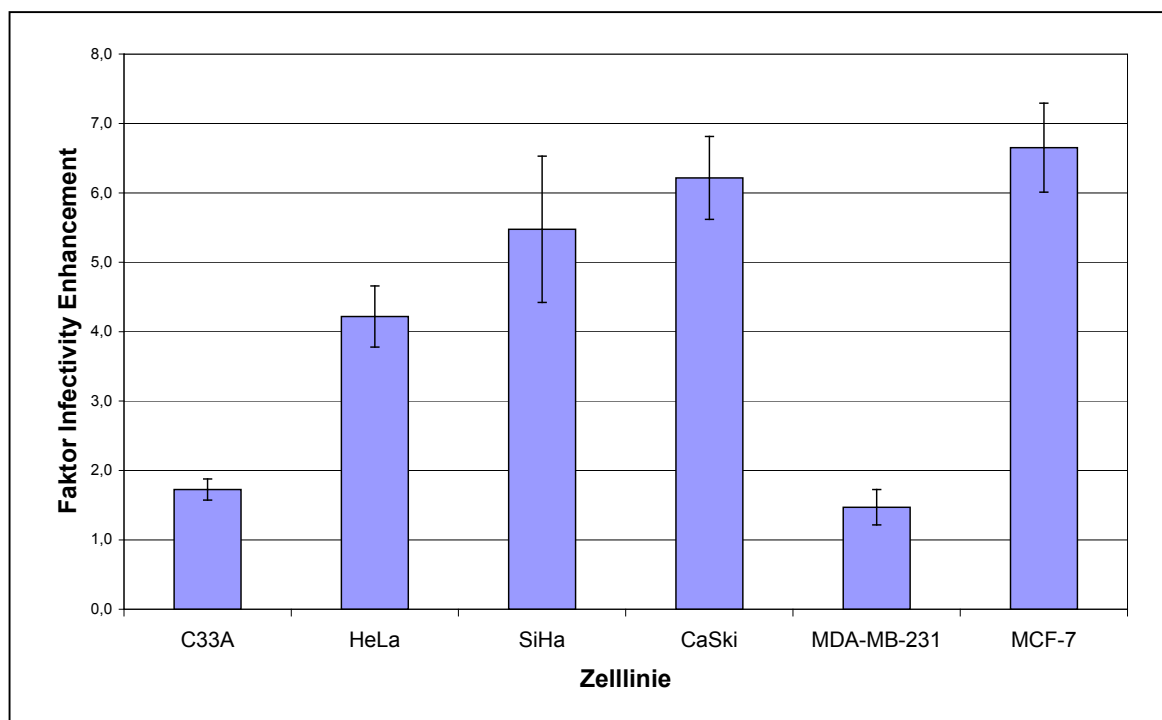


Abb. 3.7 Relatives *Infectivity Enhancement* in Zervix- und Mammakarzinomzelllinien

Erhöhung der Infektionsrate durch 5/3-Fibermodifikation. Vergleich der Luziferase-Aktivität von Ad5/3CMVLuc und Ad5CMVLuc nach Infektion mit 10 VP/Zelle: Es ist jeweils der Quotient der Luziferase-Aktivitäten von Ad5/3- und Ad5-infizierten Zellen dargestellt (y-Achse). Werte >1 entsprechen einer Erhöhung der adenoviralen Infektionsrate durch die 5/3-Fibermodifikation. Es handelt sich um Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Charakterisierung Cox2-gesteuerter, fibermodifizierter CRAds in vitro und in vivo

Wie zuvor dargelegt, scheint der humane Cox2-Promotor geeignet für die Steuerung von CRAds (transkriptionelles Targeting), die Aktivität des Promotors konnte in allen untersuchten CeCa- und MaCa-Zellen gezeigt werden.

Zudem führte die 5/3-Fibermodifikation zu einer erhöhten Infektionsrate im Vergleich zur wildtypischen Adenovirus Serotyp 5 Fiber in allen getesteten CeCa- und MaCa-Zellen (transduktionelles Targeting).

Entsprechendes war aus aktuellen Publikationen für das OvCa bereits bekannt (Casado et al., 2001a; Kanerva et al., 2002a; Kanerva et al., 2004a).

Nun sollte durch die Kombination beider Strategien zur Steuerung onkolytischer CRAds eine möglichst hohe Spezifität beziehungsweise Effizienz der adenoviralen Gentherapie erreicht werden. Um im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung toxische Effekte zu minimieren und lebenswichtige Organe zu schonen, sollte der Cox2-Promotor die Expression des adenoviralen E1A-Gens und den dadurch induzierten viralen Vermehrungszyklus auf das Zielgewebe beschränken. Eine hohe Infektionsrate der malignen Zielzellen sollte durch den Einsatz der 5/3-Fibermodifikation gewährleistet werden. Zudem sollte analysiert werden, ob die Verwendung der E1A-Deletionsvarianten E1A Δ 24 und E1A Δ 2 Δ 24, durch die die CRAd-Replikation in ruhenden Zellen verhindert werden sollte (s. Einleitung 1.5.7.3), die Spezifität der Cox2-regulierten Virotherapie steigern kann.

Promotorstärke

Bei der onkolytischen Gentherapie stellt sich die Frage, wie hoch die Aktivität des Promotors, der die virale Replikation steuert, sein sollte. Eine zu geringe Aktivität im Zielgewebe ist möglicherweise nicht ausreichend, um den viralen Vermehrungsprozess zu ermöglichen. Auf der anderen Seite kann jedoch eine sehr hohe Promotoraktivität durch Anhäufung des toxischen E1-Proteins zu einer Zerstörung der Wirtszelle führen, wodurch eine effektive Virusreplikation verhindert würde.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der tumorspezifische Cox2-Promotor in zwei Längenvarianten eingesetzt (Cox2L und Cox2M; Yamamoto et al., 2001; siehe auch Einleitung 1.5.7.1), um die optimale Promotorstärke für die Steuerung der adenoviralen Replikation zu ermitteln (s. 3.3.1.2).

Deletionen im viralen Genom und ihr Einfluss auf die Tumorspezifität

Es ist bekannt, dass die replikative Potenz der Adenoviren mit jeder eingeführten genetischen Modifikation, insbesondere Gendeletionen, abnimmt. Vorliegend stellt sich somit die Frage, ob auch die mehrfach-modifizierten Viren noch in der Lage sind, ausreichend in Tumorzelllinien zu replizieren (s. 3.3.1.3).

3.3.1 Zytotoxizitätsprofile der sechs Cox2-CRAbs in Zervix-, Mamma- und Ovarialkarzinomen

Durch Kombination der drei Strategien zur Steuerung von CRAbs (transkriptionelles Targeting, transduktionelles Targeting, E1A-Deletionen) standen sechs unterschiedliche Ad5/3cox2-CRAbs zur Verfügung (s. Einleitung: 1.5.7 und Abb. 1.9).

Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3 Δ 24 wurden in A549 Zellen propagiert (*Large Scale Virus Preparation*), über zwei diskontinuierliche Cäsium-Chlorid-Gradienten aufgereinigt und schließlich dialysiert. Durch Messung der optischen Dichte wurde der physikalische Titer (VP/ml) bestimmt. Zur Erhebung des funktionellen Titers wurde der biologische Titer *tissue culture infectious dose 50* (TCID₅₀) eingesetzt und der so bestimmte Titer in die gebräuchliche Einheit PFU/ml (*plaque forming unit*) umgerechnet (Tab. 3.1).

Das Maß für die Qualität einer Virusproduktion ergibt sich aus dem Verhältnis infektiöser Viruspartikel (in PFU/ml) zur absoluten Viruspartikelzahl (in VP/ml). Dabei sollte die Ratio 1:100 nicht überschreiten. Alle Viruspräparationen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wiesen ein Verhältnis zwischen 1:11 und 1:33 auf und konnten somit für die anschließenden Messungen eingesetzt werden.

	VP/ml	PFU/ml	Ratio
Ad5/3cox2LE1	$3,9 \times 10^{12}$	$2,6 \times 10^{11}$	1:15
Ad5/3cox2LΔ24	$4,0 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	1:33
Ad5/3cox2LΔ2Δ24	$2,0 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	1:17
Ad5/3cox2ME1	$3,5 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	1:29
Ad5/3cox2MΔ24	$3,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{11}$	1:30
Ad5/3cox2MΔ2Δ24	$1,1 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{11}$	1:11

Tab. 3.1: Virustiter der Cox2-CRAbs

Physikalische (VP/ml) und funktionelle (PFU/ml) Virustiter der Cox2-CRAbs.

Reinheit und Ratio (funktionelle vs. disruptierte Viruspartikel) der sechs Cox2-CRAbs lagen in einem zufrieden stellenden Bereich.

Zunächst wurde das onkolytische Potential ausgewählter Ad5/3cox2-CRAbs in einigen Zelllinien (CaSki, SKOV3.ip, MCF-7) mittels Kristall-Violett-Assay untersucht. Dabei werden vitale Zellen blau angefärbt. Abbildung 3.8 zeigt deutlich die mit steigendem Virustiter einhergehende Onkolyse durch Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2M Δ 24 am Beispiel der Zervixkarzinomzelllinie CaSki (vergl. auch Abb. 3.9). Dabei liegt die Effizienz beider Cox2-Viren im gleichen Bereich. Das Wt-Virus zeigt die höchste Onkolyse, gefolgt vom Kontrollvirus Ad5/3 Δ 24 (Positivkontrolle). Nach Infektion mit Ad5/3CMVLuc, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, war erwartungsgemäß keine Zelllyse zu beobachten.

Aufgrund der bei dieser Methode schwierigen Quantifizierung wurde für die folgende Analyse des onkolytischen Potentials der MTS-Zytotoxizitäts-Assay (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega*) eingesetzt (siehe nächstes Kapitel).

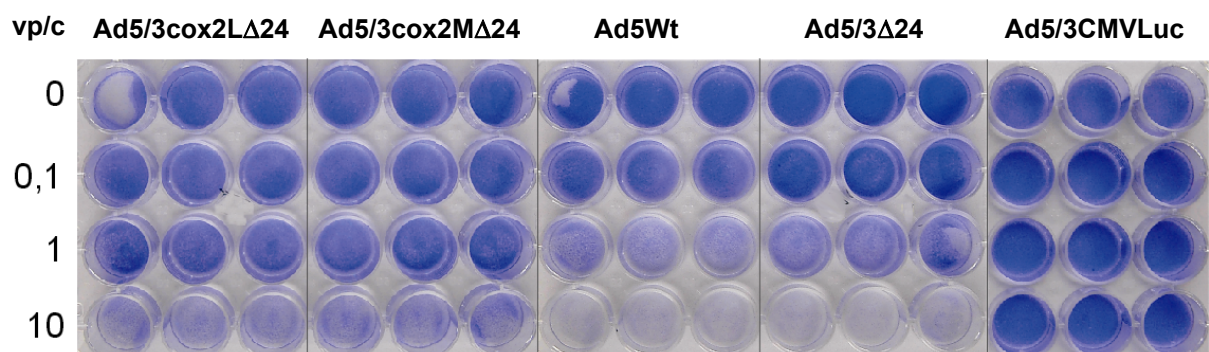


Abb. 3.8: Cox2-gesteuerte CRAbs lysieren Zervixkarzinomzellen.

Nach der Infektion von CaSki-Zellen mit zwei Cox2-CRAbs, Ad5 Wildtypvirus und zwei Kontrollviren in vier verschiedenen Viruskonzentrationen wurden die Zellen 6 Tage inkubiert. Anschließend wurden vitale Zellen mit Kristall-Violett angefärbt.

vp/c : Viruspartikel pro Zelle

3.3.1.1 Onkolytisches Potential der Cox2-CRAbs in CeCa, MaCa und OvCa

Die sechs Cox2-Promotor gesteuerten und tropismusmodifizierten CRAbs sollten hinsichtlich ihres onkolytischen Potentials in vitro charakterisiert werden. Dazu wurden mittels MTS-Zytotoxizitäts-Assay (*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega*) Zytotoxizitätsprofile in allen drei gynäkologischen Tumorentitäten erstellt.

Durch den Vergleich der Zelllyse von Normal- und Tumorzellen nach CRAb-Infektion sollten Aussagen zur Tumorspezifität getroffen werden.

Der MTS-Assay stellt eine etablierte Methode zur Messung der Zelltoxizität bzw. Zellproliferation dar. Gemessen wird die Dehydrogenase-Enzymaktivität metabolisch aktiver Zellen. Der kolorimetrische Test basiert auf der enzymatischen Reduktion des eingesetzten MTS-Agens zu Formazan, dessen Absorption bei 492 nm fotometrisch gemessen werden kann. Die Produktion des Formazans bzw. die Farbintensität ist dabei proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Zellen wurden in vier Parallel-Ansätzen mit ansteigenden Virustitern (0-10 VP/Zelle) infiziert. Zum Vergleich mit den sechs Cox2-Promotor gesteuerten CRAbs wurden Zellen ebenfalls mit dem nicht-modifizierten Wildtyp Adenovirus Serotyp 5 (Ad5Wt) infiziert. Als Positivkontrolle diente das isogenetische Vergleichsvirus Ad5/3Δ24, das den ursprünglichen adenoviralen E1A-Promotor aufweist. Als Negativkontrolle wurde das E1-deletierte (und somit replikationsdefiziente) Ad5/3CMVLuc Virus eingesetzt. Nach 5-7 Tagen wurde mittels MTS-Assay der Anteil vitaler Zellen gemessen und in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter dargestellt (Abb. 3.09 bis 3.16).

Onkolytisches Potential der Cox2-CRAbs in CeCa

In allen getesteten CeCa-Zelllinien (CaSki, SiHa, HeLa, C33A) konnte durch den Einsatz von Cox2-CRAbs eine leichte bis starke Onkolyse induziert werden.

In SiHa-, HeLa- und C33A-Zellen traten onkolytische Effekte der Cox2-CRAbs erst bei höchster Viruslast (10 VP/Zelle) auf. Einzig in CaSki-Zellen konnten hinsichtlich der

Cox2-Promotor gesteuerten CRAds bereits bei einer Viruslast von 1 VP/Zelle Zytotoxizitäten von bis zu 49% (Ad5/3cox2L Δ 24, Ad5/3cox2ME1) beobachtet werden. In CaSki- und SiHa-Zellen konnte der insgesamt stärkste, durch Cox2-CRAds induzierte, onkolytische Effekt von rund 75% durch das Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2ME1 Virus erzielt werden. Diese Daten korrelieren mit der gemessenen hohen Cox2-Promotoraktivität und der großen Verbesserung der Infektionsrate durch transduktionelles Targeting in diesen beiden Zelllinien. Im Gegensatz dazu resultieren vergleichbare Vordaten für HeLa-Zellen nicht in einer derartig hohen Zytotoxizität.

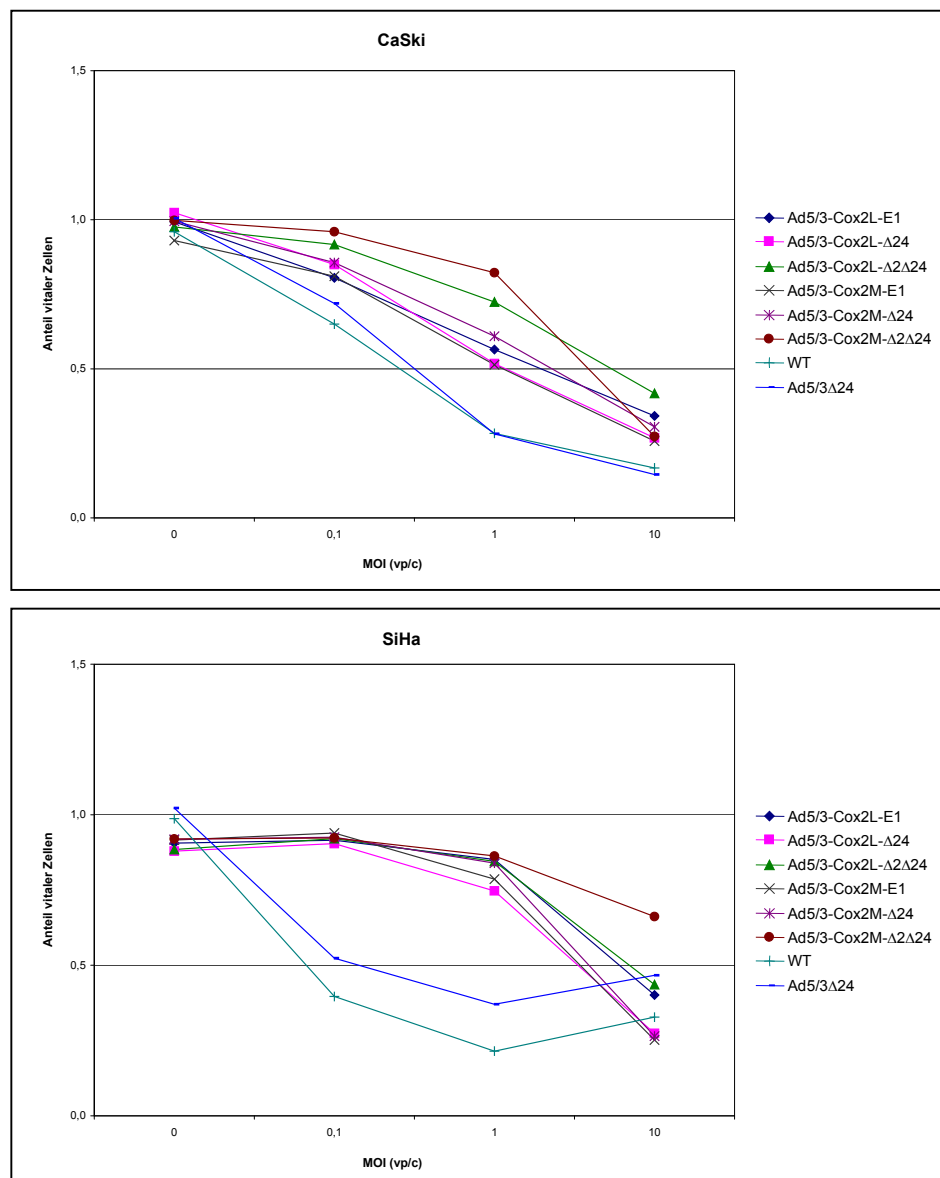


Abb. 3.9 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in CaSki und SiHa Zellen (CeCa)

Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 und dem replikations-defizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

In allen Fällen verursachten das Ad5Wt- und das Ad5/3 Δ 24-Kontrollvirus im Gegensatz zu den Cox2-CRAds bereits bei geringster Viruslast (0,1 VP/Zelle) leichte bis starke Zelltoxizität. Hierbei induzierte das unveränderte Ad5-Wildtypvirus die stärkste Zelllyse, gefolgt vom Ad5/3 Δ 24 Kontrollvirus.

In 3/4 CeCa-Zelllinien (CaSki, SiHa, HeLa) induzieren Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2ME1 bei höchster Viruslast hohe Onkolysen, die vergleichbar waren mit der Effizienz der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24.

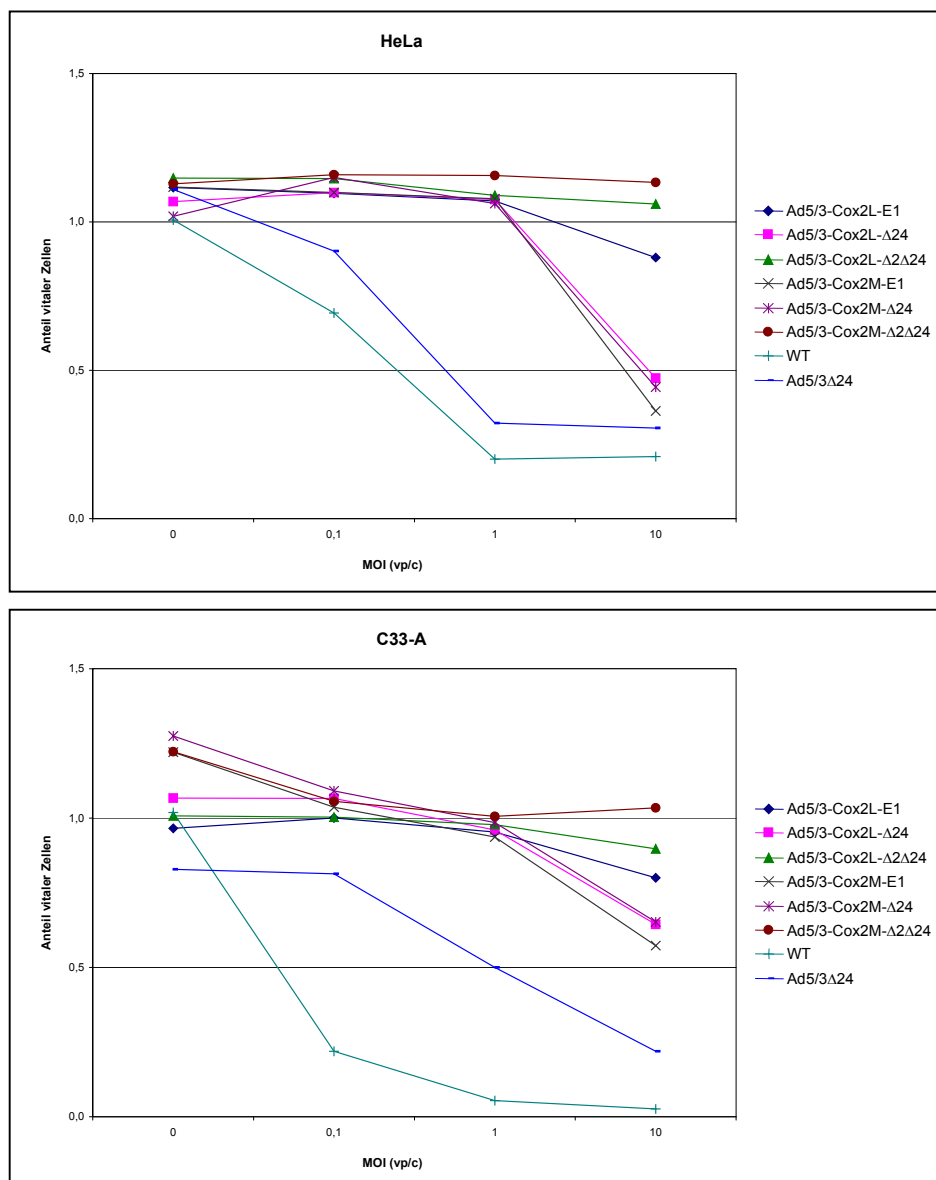


Abb. 3.10 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in HeLa und C33-A Zellen (CeCa)
Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 und dem replikations-defizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

Onkolytisches Potential der Cox2-CRAds in OvCa

Durch den Einsatz von Cox2-CRAds konnten in allen getesteten OvCa-Zelllinien (SKOV3.ip, ES-2, OV-4, Hey) deutliche Zytotoxizitäten induziert werden. In 2/4 OvCa-Zelllinien (SKOV3.ip, ES-2) konnten bereits bei einer Viruslast von 1 VP/Zelle hohe Zelltoxizitäten erreicht werden (bis zu 65% durch Ad5/3cox2ME1, bis 50% durch Ad5/3cox2LΔ24).

Die effizienteste Zellyse konnte in SKOV3.ip Zellen durch Ad5/3cox2LΔ24, Ad5/3cox2ME1 und Ad5/3cox2MΔ24 induziert werden (89%).

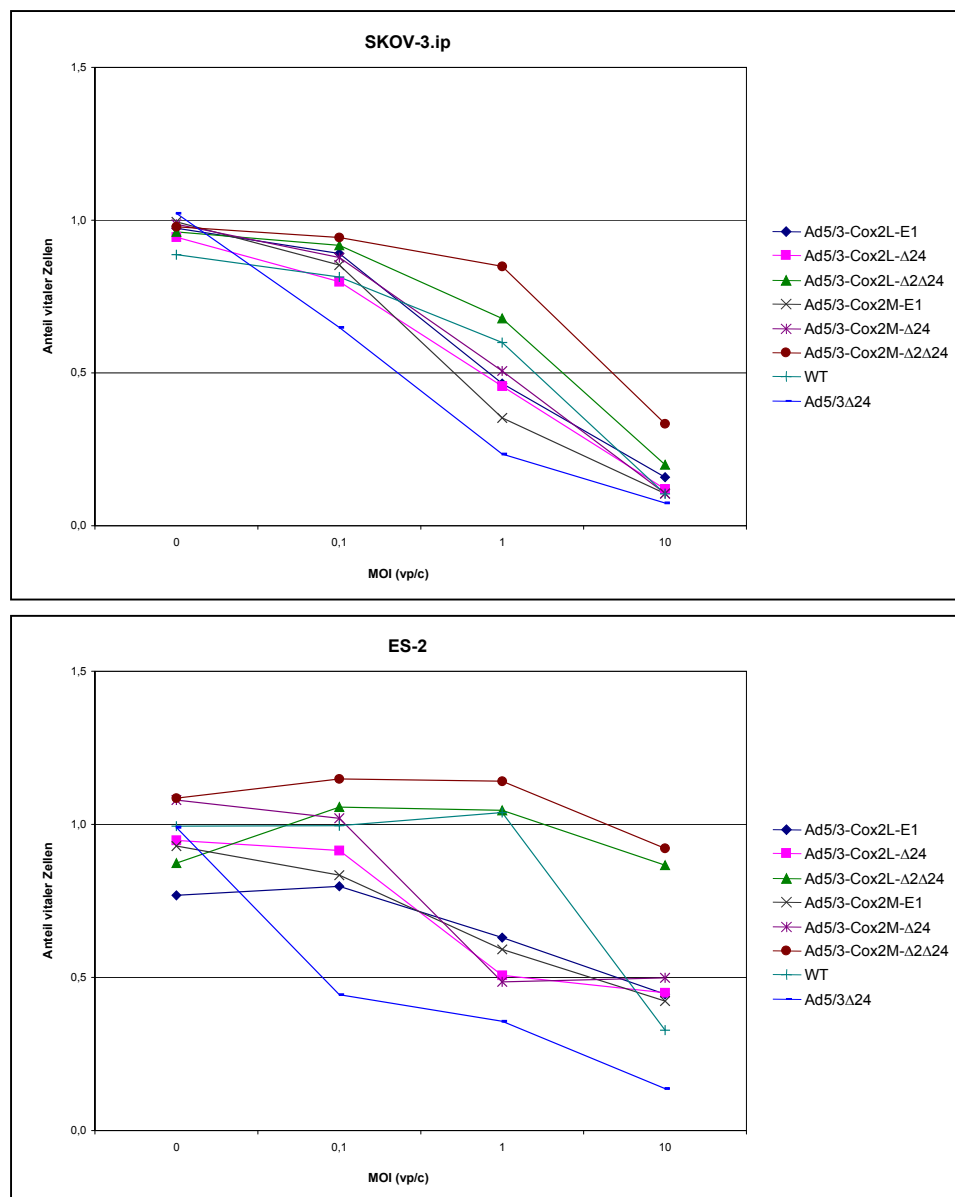


Abb. 3.11 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in SKOV3.ip und ES-2 Zellen (OvCa)

Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3Δ24 und dem replikationsdefizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

In 3/4 OvCa-Zelllinien (SKOV3.ip, ES-2, OV-4) war Ad5/3 Δ 24 das onkolytisch effizienteste Virus. Das hohe onkolytische Potential von Ad5/3 Δ 24 in Relation zu Ad5Wt ist ein Hinweis auf die effiziente Infektion der 5/3-Fiberchimäre im Ovarialkarzinom.

Hey war die Zelllinie mit den geringsten Unterschieden der onkolytischen Potenz zwischen den sechs Cox2-CRAds. Der Vergleich des onkolytischen Potentials der Cox2-CRAds mit dem hier sehr zelltoxischen Ad5Wt weist auf eine eher begrenzte Steigerung der Infektionseffizienz durch den Einsatz der 5/3-Fiber in dieser Zelllinie hin.

In 3/4 OvCa-Zelllinien (SKOV3.ip, ES-2, OV-4) waren alle Cox2-CRAds außer den doppelt E1A-mutierten Viren toxischer als Ad5Wt. Hierbei gehörte Ad5/3cox2L Δ 24 zu den potentesten CRAds und lag bei höchster Viruslast hinsichtlich der Zytotoxizität im Bereich der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24.

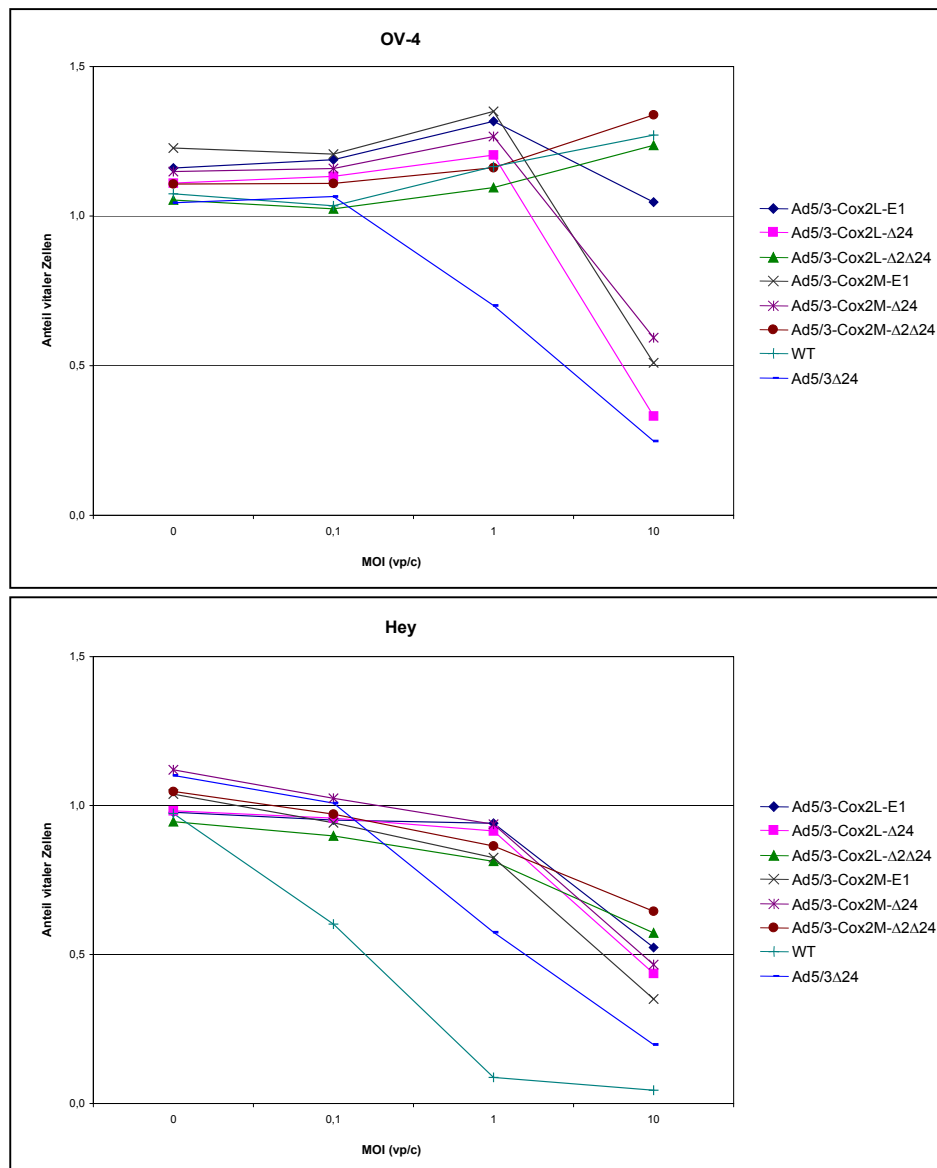


Abb. 3.12 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in OV-4 und Hey Zellen (OvCa)

Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 und dem replikations-defizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

Onkolytisches Potential der Cox2-CRAds in MaCa

In allen untersuchten MaCa-Zellen (MCF-7, BT-20, MDA-MB-231) zeigten Cox2-CRAds gute onkolytische Wirksamkeit. In 2/3 untersuchten MaCa-Zelllinien (MDA-MB-231, MCF-7) konnten bereits bei einer Viruslast von 1 VP/Zelle hohe Zytotoxizitäten (z.B. 91 % durch Ad5/3cox2L Δ 24 Virus in MDA-MB-231) induziert werden, die in MCF-7 Zellen sogar über den Werten der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 (71% versus 49%) lagen. Die höchste Zelltoxizität wurde in Ad5/3cox2LE1, Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2ME1 infizierten MDA-MB-231 Zellen gemessen (bis 97%).

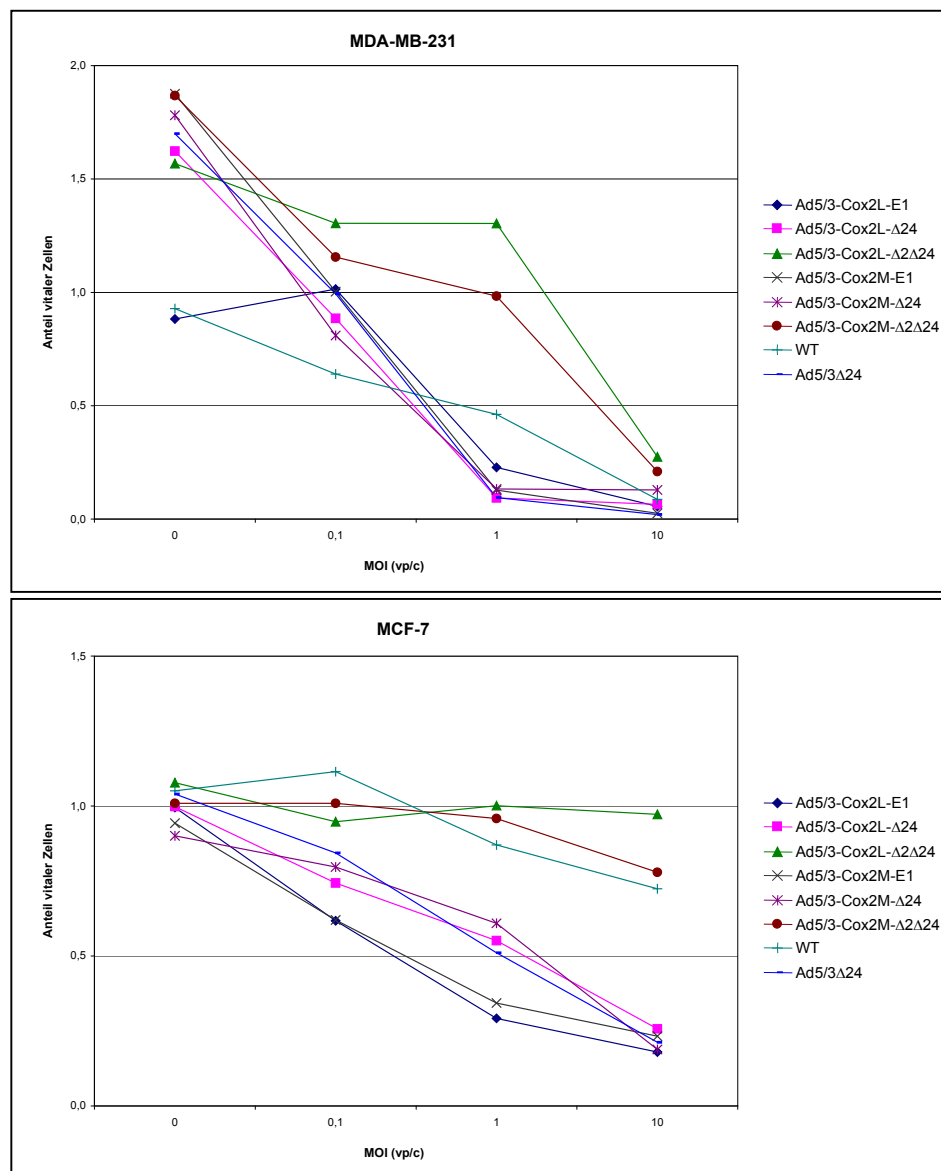


Abb. 3.13 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen (MaCa)
Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 und dem replikationsdefizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

Das Ad5Wt-Virus weist eine bemerkenswert geringe Zelltoxizität in MCF-7 Zellen auf (28% bei höchster Viruslast). Dieses Ergebnis korreliert mit den Messungen zum *Infectivity Enhancement*, wo die Erhöhung der Infektionsrate durch 5/3-Fibermodifikation in MCF-7 Zellen am größten war (Faktor 6,7, s. Abb. 3.7). Dementsprechend erreichten Cox2-CRAbs hohe Zelllysen trotz der in den Vorversuchen gemessenen geringen Cox2-Promotoraktivität.

Im Gegensatz dazu lässt sich die hohe Wirksamkeit von Cox2-CRAbs in MDA-MB-231 Zellen eher auf die im Vergleich zu MCF-7 hohe Promotoraktivität bei relativ geringem *Infectivity Enhancement* zurückführen.

In allen getesteten MaCa-Zelllinien zeigten Ad5/3cox2LE1, Ad5/3cox2LΔ24, Ad5/3cox2LΔ2Δ24 und Ad5/3cox2ME1 eine effiziente, mit der Positivkontrolle Ad5/3Δ24 vergleichbare Lyse der infizierten Tumorzellen.

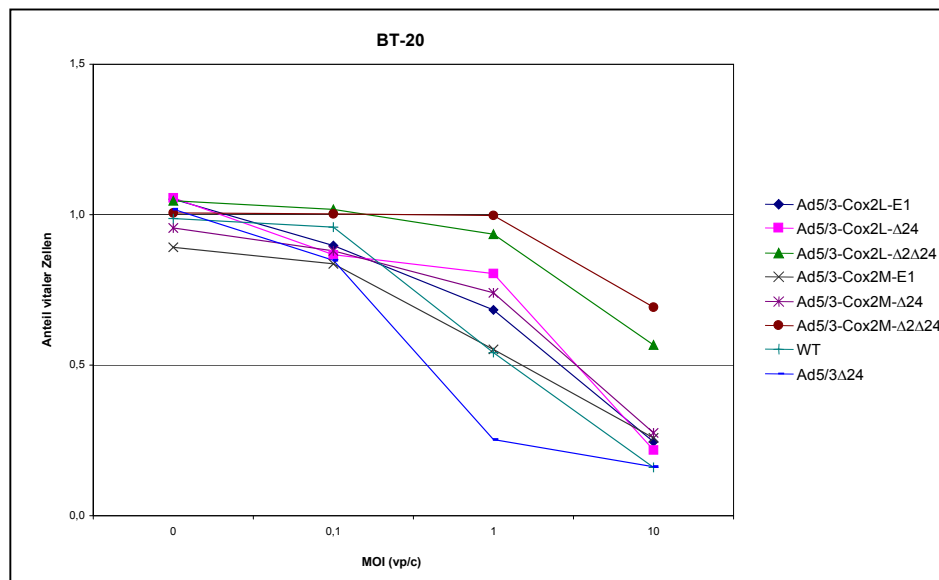


Abb. 3.14 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAbs in BT-20 Zellen (MaCa)

Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAbs, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3Δ24 und dem replikations-defizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

Onkolytisches Potential der Cox2-CRAds in Kontrollzellen

Die Toxizität der Cox2-Promotor gesteuerten CRAds in benignen Normalgewebszellen wurde an primären Hepatozyten (nHEP) und Mammaepithelzellen (HMEC) untersucht. Aus frischem Blut isolierte Monozyten (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) dienten zur Untersuchung der Sicherheit. Die Cox2-positive Lungenkarzinomzelllinie A549 wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Analyse der Zytotoxizität in nHEP-Zellen ist im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von großer Bedeutung, da Adenoviren nach der Applikation in der Leber akkumulieren und abgebaut werden. Deshalb ist eine stark reduzierte Replikationsrate die Voraussetzung, um lebertoxische Nebenwirkungen zu vermeiden.

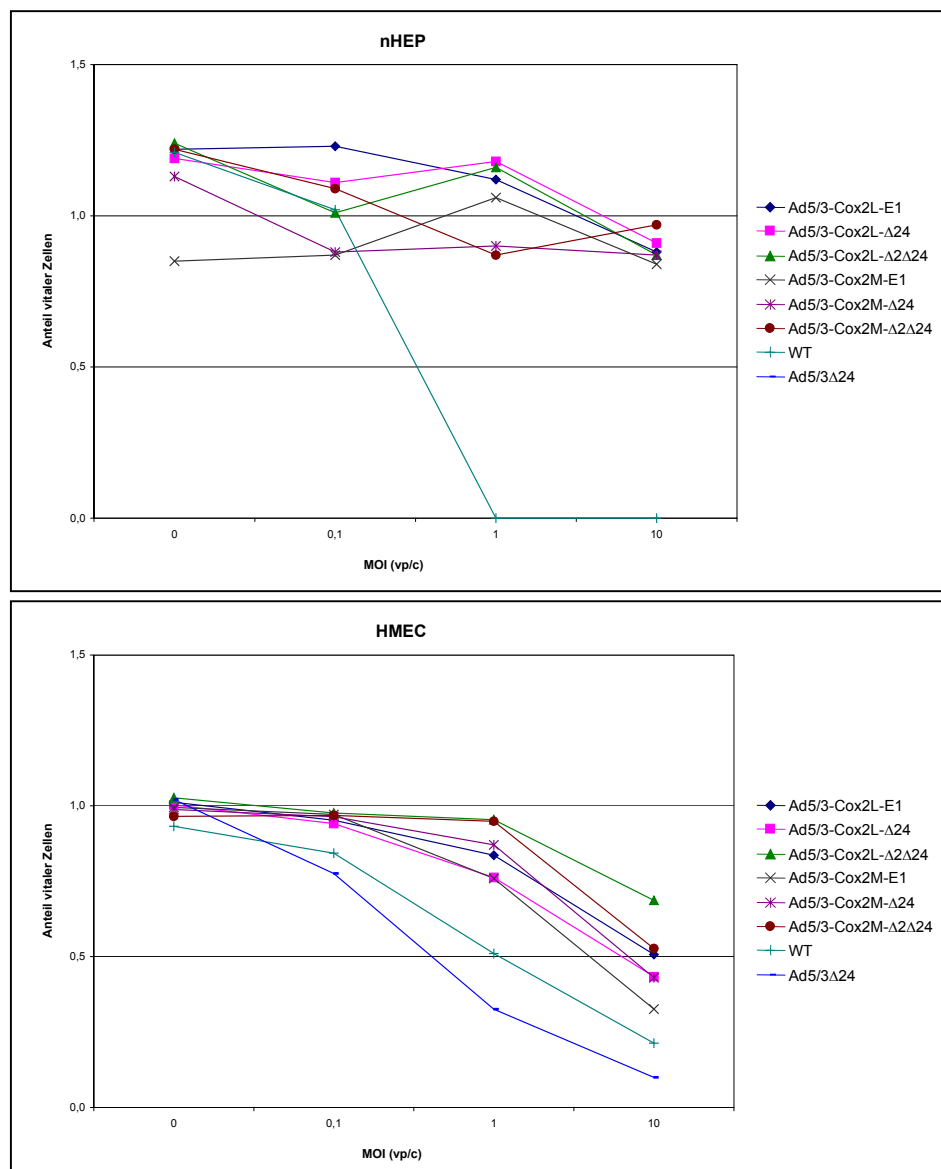


Abb. 3.15 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in benignen Normalgewebszellen
 Getestet wurden primäre Hepatozyten (nHEP) und Mammaepithelzellen (HMEC).
 Legende siehe Abb. 3.14

Mittels MTS-Assay konnte gezeigt werden, dass kein Cox2-CRAd zytotoxisch in nHEP-Zellen wirkt. Hingegen resultierte eine Infektion mit Wildtypvirus bereits bei einer Viruslast von 1 VP/Zelle in hundertprozentiger Zellyse.

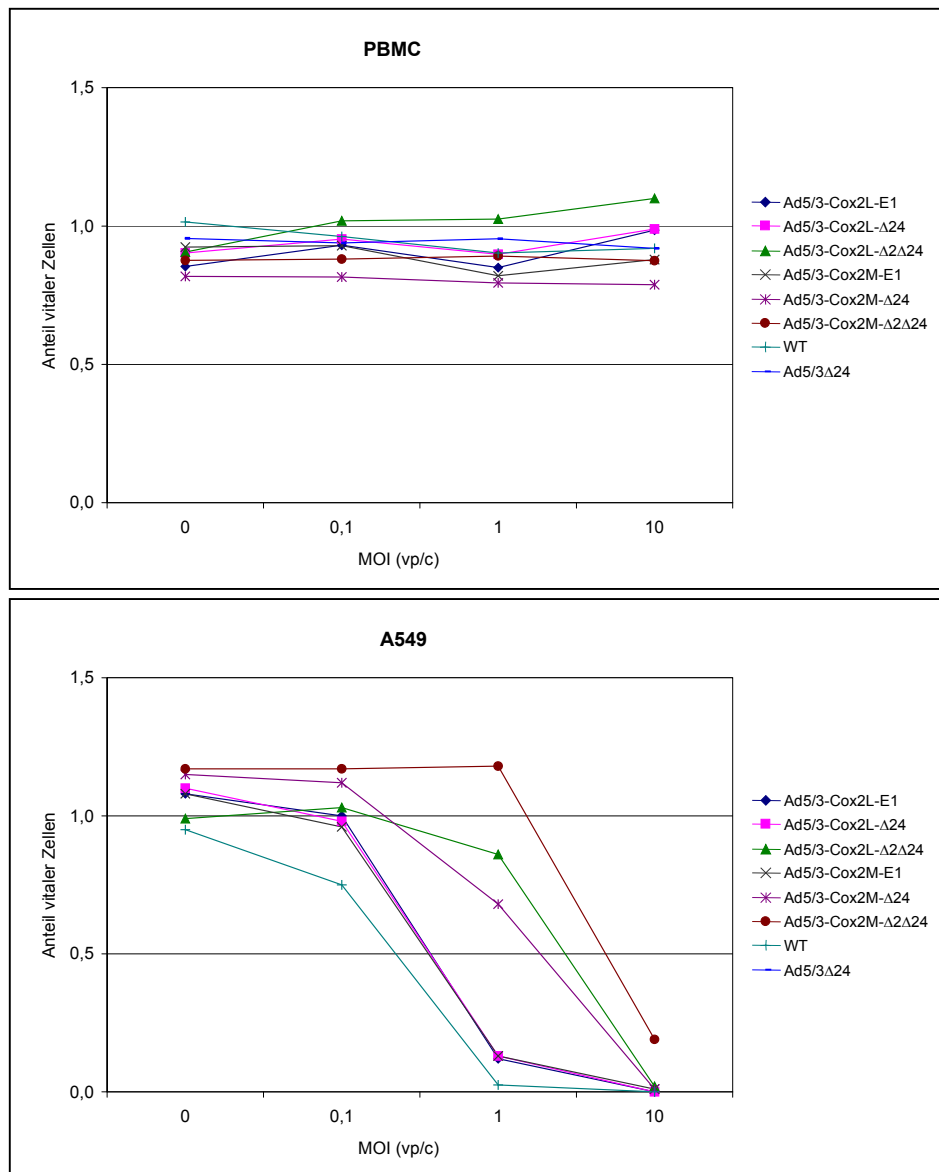


Abb. 3.16 Zytotoxizität der fibermodifizierten Cox2-CRAds in Blut-Monozyten (PBMC) und Cox2-positiven Lungenkarzinomzellen (A549)

Zellen wurden mit den sechs Cox2-CRAds, Ad5Wt, der Positivkontrolle Ad5/3Δ24 und dem replikations-defizienten Ad5/3CMVLuc infiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Anteil vitaler Zellen mittels MTS-Assay bestimmt und bezogen auf Ad5/3CMVLuc als relative Vitalität (y-Achse) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virustiter (x-Achse) dargestellt (Mittelwert aus vier Experimenten).

In HMEC-Zellen verursachten Cox2-CRAds eine leichte Zellyse (bis zu 24% bei 1 VP/Zelle), die jedoch im Vergleich zur Positivkontrolle Ad5/3Δ24 deutlich verringert war (67%). In den malignen MaCa-Zellen MCF-7 und MDA-MB-231 war das onkolytische Potential von 4/6 Cox2-CRAds und Ad5/3Δ24 hingegen vergleichbar oder sogar höher.

PBMC wurden durch keines der eingesetzten Viren lysiert. Dieses Ergebnis könnte für die Bewertung der Sicherheit einer CRAd-Therapie von Bedeutung sein.

Die Cox2-positiven Lungenkarzinomzellen A549 wurden erwartungsgemäß effizient durch Cox2-CRAbs lysiert (88% Zelltoxizität durch Ad5/3cox2LE1, Ad5/3cox2LΔ24, Ad5/3cox2ME1 bei 1 VP/Zelle).

Tests mit weiteren benignen Kontrollzellen (primäre Fibroblasten, Mammaepithelzelllinie MCF-12A) wiesen ebenfalls auf eine geringe Zelltoxizität der Cox2-CRAbs in Normalzellen hin (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ergibt sich aus der effizienten Onkolyse von Tumorzellen bei gleichzeitig reduzierter Zytotoxizität in Normalzellen die Tumorspezifität der Cox2-CRAbs.

3.3.1.2 Die Promotorvarianten Cox2L und Cox2M im Vergleich

Unter den sechs Cox2-CRAbs gab es große Unterschiede hinsichtlich ihres onkolytischen Potentials. Offensichtlich ist jedoch die Aktivität sowohl der langen als auch der kürzeren Cox2-Promotorvariante ausreichend hoch, um eine effiziente Virusreplikation zu induzieren und die Lyse der Wirtszelle zu gewährleisten.

Das onkolytische Potential der jeweils korrespondierenden CRAbs mit langer und kurzer Promotorvariante war in der Regel sehr ähnlich. Insbesondere gilt dies in Kombination mit Wt-E1A (Ad5/3cox2LE1 und Ad5/3cox2ME1) und E1AΔ24 (Ad5/3cox2LΔ24 und Ad5/3cox2MΔ24). Deutlich wird dies beispielsweise bei den Zelllinien ES-2 und MCF-7.

Berücksichtigt man die etwas geringere Toxizität der drei Cox2L-CRAbs gegenüber den drei Cox2M-CRAbs in den wichtigen Kontrollzellen nHEP, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die längere Variante des humanen Cox2-Promotors Cox2L eine leicht höhere Tumorspezifität gegenüber Cox2M aufweist. Dies entspricht im übrigen den Erwartungen aufgrund der upstream gelegenen Regulationselemente des Promotors. Darüber hinaus scheint insgesamt betrachtet der kürzere Cox2M-

Promotor tatsächlich eine etwas höhere Replikationsrate zu ermöglichen, was durch die höhere Onkolyse von Ad5/3cox2ME1 in Relation zu Ad5/3cox2LE1 in HeLa-, C33A-, SKOV3.ip-, Hey- und BT-20 Zellen verdeutlicht wird.

Die Ergebnisse werden durch eine Publikation von Yamamoto et al. untermauert, die für den längeren Promotor Cox2L eine gegenüber Cox2M höhere Spezifität bei geringerer Aktivität postulierten (Yamamoto et al., 2001).

Bemerkenswerterweise ist die Effizienz der Cox2-CRAds trotz der im Vergleich geringeren Cox2-Genexpression (3.1.1) und Cox2L-Promotoraktivität (3.1.2) in MaCa-Zellen gegenüber CeCa-Zellen insgesamt betrachtet in MaCa-Zellen höher. Dies stützt die Annahme, dass ein zu starker Promotor sich auch nachteilig auf die Effizienz einer onkolytischen Virotherapie auswirken kann.

3.3.1.3 Die Deletionsvarianten E1A Δ 24 und E1A Δ 2 Δ 24 im Vergleich

Da die replikative Potenz der Adenoviren bekanntermaßen mit jeder eingeführten genetischen Modifikation bzw. Gendeletion abnimmt (Bauerschmitz et al., 2002a), wurde untersucht, ob auch die E1A-mutierten Viren noch in der Lage sind, ausreichend in Tumorzelllinien zu replizieren.

In allen 11 getesteten Tumorzelllinien waren die einfach E1A-deletierten Cox2-CRAds (Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2M Δ 24) effizient genug, um infizierte Zellen zu lysieren. Die Δ 24-Mutation scheint in Karzinomzellen also keinen nachteiligen Einfluss auf die Replikationsrate der betreffenden CRAds zu haben. Dabei gehört Ad5/3cox2L Δ 24 zu den onkolytisch effizientesten CRAds mit Zelltoxizitäten von bis zu 91% (MDA-MB-231, 1 VP/Zelle).

Im Gegensatz dazu war die Replikation der doppelt E1A-deletierten Viren (Ad5/3cox2L Δ 2 Δ 24 und Ad5/3cox2M Δ 2 Δ 24) deutlich attenuiert. In 6/11 getesteten Tumorzelllinien war die Zelltoxizität stark reduziert. In 5/11 Fällen verhinderte die Δ 2 Δ 24-Deletion des E1A-Gens sogar vollständig die Virusreplikation.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnten Rückschlüsse darüber gezogen werden, ob die untersuchten Deletionen im adenoviralen E1A-Gen (Δ 24 und Δ 2 Δ 24) geeignet sind, die replikative Potenz der onkolytischen Viren im gesunden Gewebe zu senken

und als selektiver Sicherheitsmechanismus eingesetzt werden können. In PBMC induziert keines der Cox2-CRAbs Zelllyse, so dass ein Vergleich der E1A-Varianten nicht möglich ist. In primären Hepatozyten (nHEP) scheint die Kombination aus Cox2L-Promotor und E1A Δ 24-Deletion (Ad5/3cox2L Δ 24) tatsächlich eine leicht verbesserte Sicherheit zu bieten. In HMEC resultiert die Infektion mit Ad5/3cox2L Δ 24 Δ 24 in 31% Zytotoxizität, was im Vergleich zu 6/11 untersuchten Karzinomzelllinien (ca. 50-75% Lyse durch Ad5/3cox2L Δ 24 Δ 24) ebenfalls auf eine leichte Reduktion der onkolytischen Potenz in Normalzellen durch Kombination von Cox2L-Promotor und E1A Δ 24 Δ 24-Deletion hindeutet.

Zusammenfassung der MTS-Assays

In allen getesteten Zervix- (CaSki, SiHa, HeLa, C33A), Ovarial- (SKOV3.ip, ES-2, OV-4, Hey) und Mammakarzinomzellen (MCF-7, BT-20, MDA-MB-231) konnte durch den Einsatz von Cox2-Promotor gesteuerten, tropismusmodifizierten CRAbs eine effiziente Onkolyse induziert werden. Dabei wurden in einigen Fällen bereits bei einer Viruslast von 1 VP/Zelle Zytotoxizitäten von 50-91% erreicht. Zu den onkolytisch potentesten Viren gehörten vor allem Ad5/3cox2L Δ 24 und Ad5/3cox2ME1, die hinsichtlich ihrer Onkolyse mitunter im Bereich der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24 lagen. Zelllinien, die besonders effizient durch Cox2-CRAbs lysiert wurden, waren CaSki, SKOV3.ip, ES-2, MDA-MB-231 und MCF-7. Eine maximale Onkolyse von 97% konnte MDA-MB-231 Zellen durch Infektion mit Ad5/3cox2ME1 erzielt werden.

Die Replikationsrate aller nicht doppelt E1A-deletierten Cox2-CRAbs ist in 5/11 untersuchten Tumorzelllinien höher als beim Wildtypvirus, in gesunden Normalzellen (primäre Hepatozyten, gesunde Mammaepithelzellen) jedoch geringer. In diesen Fällen waren somit die eingeführten Modifikationen geeignet, eine Erhöhung der Tumorspezifität gegenüber dem Wildtypvirus zu erzielen.

Es konnte gezeigt werden, dass kein Cox2-CRAb zytotoxisch in primären Hepatozyten wirkt. Dagegen führte eine Infektion mit Wildtypvirus bereits bei einer Viruslast von 1

VP/Zelle zu hundertprozentiger Zelllyse. Somit wären bei einer eventuellen späteren Virotherapie keine lebertoxischen Nebenwirkungen zu erwarten.

Überdies war die Toxizität von Cox2-CRAbs in gesunden Mammaepithelzellen gegenüber der Positivkontrolle Ad5/3Δ24 und Ad5 Wildtyp-Virus deutlich verringert.

PBMC wurden durch keines der eingesetzten Viren lysiert.

Die effiziente Onkolyse von Tumorzellen bei gleichzeitig reduzierter Zytotoxizität in Normalzellen demonstriert die Tumorspezifität der Cox2-CRAbs.

Beide zur Steuerung der CRAbs eingesetzten Längenvarianten des humanen Cox2-Promotors liegen in einem Aktivitätsbereich, der geeignet ist, eine effiziente Replikation und damit Zelllyse zu gewährleisten. Dabei vermittelt Cox2L eine etwas höhere Tumorspezifität, während Cox2M zu einer leicht höheren Zelltoxizität führt.

Beide E1A-Deletionen vermindern die Toxizität in Normalzellen. Die Doppeldeletion reduziert oder verhindert in geringerem Maße jedoch auch die Virusreplikation in malignen Zielzellen, während die Δ24-Mutation hier keinen negativen Einfluss auf die Replikationsrate ausübt. Daher ist die einfache Deletion besser als selektiver Sicherheitsmechanismus geeignet.

Die Analyse der Zelltoxizität in den einzelnen Zelllinien zeigt, dass aus den sechs unterschiedlichen Kombinationen von Promotor und E1A-Variante eine große Bandbreite des onkolytischen Potentials resultiert. Dies könnte später die Möglichkeit zu einer individuellen Behandlung von Tumorpatienten bieten.

Insgesamt konnte durch die eingesetzten Targeting-Strategien eine Erhöhung der Tumorspezifität von CRAbs erreicht werden. Dabei erscheint Ad5/3cox2LΔ24 als bester Kompromiss höchstmöglicher Spezifität bei Erhalt der onkolytischen Potenz für die getesteten Tumorzellen.

3.3.2 Replikation von Ad5/3cox2LΔ24 in Abhängigkeit vom Cox2-Status

Der hier für die Gentherapie genutzte Prozess der Virusreplikation und Zelllyse stellt einen komplexen mehrstufigen Vorgang dar, dessen Gesamtergebnis letztendlich die Zerstörung der Wirtszelle ist. Das Ausmaß der onkolytischen Effizienz von Cox2-CRAds war mittels MTS-Assay bestimmt worden (3.3.2). Dieser Assay zeigt den Anteil vitaler Zellen nach mehrtägiger Virusinfektion und ist somit nur eine „Endpunktbestimmung“. Zudem traten deutliche Zytotoxizitäten in der Regel erst bei höheren Virustitern auf. Um zu demonstrieren, dass der zytopathische Effekt (CPE) tatsächlich mit der Virusreplikation korreliert und nicht auf andere toxische Effekte der Infektion zurückzuführen sind, sollten neue Methoden etabliert und angewandt werden.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, den Verlauf der adenoviralen Replikation über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen *direkt* zu messen und sichtbar zu machen. Mittels Real-Time PCR und biologischem Titertest (*tissue culture infectious dose 50*, TCID₅₀) konnte die Produktion viraler Partikel in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle verfolgt werden.

3.3.2.1 Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine höchst genaue Methode zur spezifischen Quantifizierung von Nukleinsäuren, die zunehmend auch in der virologischen Diagnostik eingesetzt wird. Die Verwendung genspezifischer Sonden ermöglicht eine schnelle und sensitive Messung und eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messdaten. Ein großer Vorteil ist der große Messbereich (*dynamic range*) von bis zu 7 Logs (im Vergleich zu 3 Logs in der konventionellen RT-PCR), so dass auch sehr unterschiedliche Templatekonzentrationen im Ausgangsmaterial akkurat erfasst werden können.

Durch den Einsatz einer markierten Gensonde kann in der Real-Time-PCR die emittierte Fluoreszenz während der Reaktion als Indikator für die Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts gemessen werden. Das Signal ist dabei direkt proportional

zur Menge des PCR-Produkts. Während der exponentiellen Phase der PCR korreliert die Menge des PCR-Produktes zur Ausgangskonzentration der Ziel-DNA.

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden in der Real-Time-PCR die C_t -Werte (*threshold cycle*) herangezogen. Der C_t -Wert ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die erforderlich sind, um eine bestimmte definierte (Fluoreszenz-) Signalstärke zu erreichen. Diese muss anhand der Amplifizierungskurven so gewählt werden, dass sie in der exponentiellen Phase der PCR liegt.

Im vorliegenden Fall wurde die Real-Time PCR mit einem Thermocycler (ABI 7900HT Sequence Detection System) durchgeführt und die Rohdaten mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Die Virusreplikation wurde durch die absolute Quantifizierung des adenoviralen E4-Gens direkt erfasst (physikalischer Titer). Eine indirekte Normierung auf die Zellzahl erfolgte durch die parallele Quantifizierung des zellulären Haushaltsgens Beta-Aktin in der jeweils identischen Probe.

Geeignete Primerpaare sowie 6-FAM/TAMRA-markierte Sonden für beide Gene wurden nach Kanerva et al. bestellt (Kanerva et al., 2002b).

Etablierung

Für die absolute Quantifizierung wurde für das virale und das zelluläre Zielgen jeweils eine externe Standardkurve unter Verwendung eines DNA-Standards bekannter Kopienzahl erstellt. Die Standardkurve ergibt sich aus der logarithmischen Auftragung der eingesetzten DNA-Menge bzw. Gen-Kopienzahl gegen den C_t -Wert. Hochreine Plasmid-DNA (pTG3602 mit einer Kopie des adenoviralen E4-Gens) bzw. kommerziell erhältliche, humane genomische DNA bekannter Konzentration (Applied Biosystems) wurden 10fach seriell verdünnt und in die Real-Time PCR eingesetzt. Die Ausgangskonzentration der Plasmid-DNA wurde durch fotometrische Messung ermittelt und mit Hilfe des Molekulargewichts in die absolute Kopienzahl umgerechnet.

Bei der Erstellung der Standardkurven wurde auf hohe Pipettiergenauigkeit geachtet, um das Endergebnis nicht zu verfälschen. Zur Kontrolle wurden in der Etablierungsphase doppelte Standards angefertigt (Abb. 3.18, 3.19). Dabei zeigten sich bei unabhängigen Verdünnungsreihen nur sehr geringe Standardabweichungen (0,6-2,2% SD für E4; 0,3-1,7% SD für Beta-Aktin).

Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt die lineare Korrelation innerhalb einer Standardkurve an. Die R^2 -Werte lagen für beide Kurven bei 0,98, was ebenfalls eine hohe Genauigkeit der Standardverdünnungen belegt.

Die Effizienz der Real-Time-PCR lässt sich aus der Steigung der Standardkurve bestimmen. Im Falle einer hundertprozentigen Effizienz der PCR würde sich die Menge des PCR-Produktes und damit auch das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus verdoppeln. Häufig treten mit dieser Methode Effizienzen über 100% auf, was theoretisch nicht möglich ist. Auch im vorliegenden Fall lag die Effizienz für die E4-Amplifizierung bei 108% und für die Beta-Aktin-Amplifizierung bei 112%.

Um eine hohe Qualität der Standardkurven zu gewährleisten, wurden die verdünnten Standardkonzentrationen in kleine Aliquots aufgeteilt, bei -80°C eingefroren und jeweils nur einmal unmittelbar vor Messung der Proben aufgetaut.

Für die Etablierung und Testung des Versuchssettings wurden SKOV3.ip Zellen mit 20 und 50 VP/Zelle Ad5/3 Δ 24 Virus infiziert.

Zunächst musste eine geeignete Methode gefunden werden, um die Viruspartikel und Zellen aufzuschließen. Es wurden verschiedene Methoden getestet, die auf dem thermischen Aufschluss von Viruspartikeln und Zellen beruhen. Die jeweiligen Lysate wurden mittels TCID₅₀-Test auf verbliebene funktionelle Viruspartikel untersucht und testweise in die PCR eingesetzt.

Durch abwechselnde Gefrier- und Auftauzyklen war keine ausreichende Disruption der Viruspartikel zu erzielen. Die Verwendung des Polymer-Granulats *Gene Releaser* (Bioventures), dass nach Herstellerangaben eine effektive Entfernung von PCR-Inhibitoren ermöglicht, war sehr aufwendig und lieferte ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse. Letztendlich erwies sich die thermische Lyse im Thermocycler mit

anschließender Zentrifugation des Lysats als effizienteste Methode, die einen konstanten Aufschluss der Viruspartikel (Abb. 3.17) und Zellen (Daten nicht gezeigt) garantierte und wurde bei allen folgenden Assays standardmäßig angewandt.

Input VP	Ct	Mittelwert Ct	SD Ct	SD Ct %	Quantität VP	Mittelwert VP	SD VP	SD VP %
1,00E+06	18,44	18,65	0,30	1,6	1,24E+06	1,05E+06	2,74E+05	26,1
1,00E+06	18,86				8,54E+05			
1,00E+05	21,29	21,39	0,14	0,7	1,00E+05	9,18E+04	1,15E+04	12,6
1,00E+05	21,50				8,37E+04			
1,00E+04	24,79	24,92	0,19	0,8	4,56E+03	4,09E+03	6,72E+02	16,4
1,00E+04	25,06				3,61E+03			

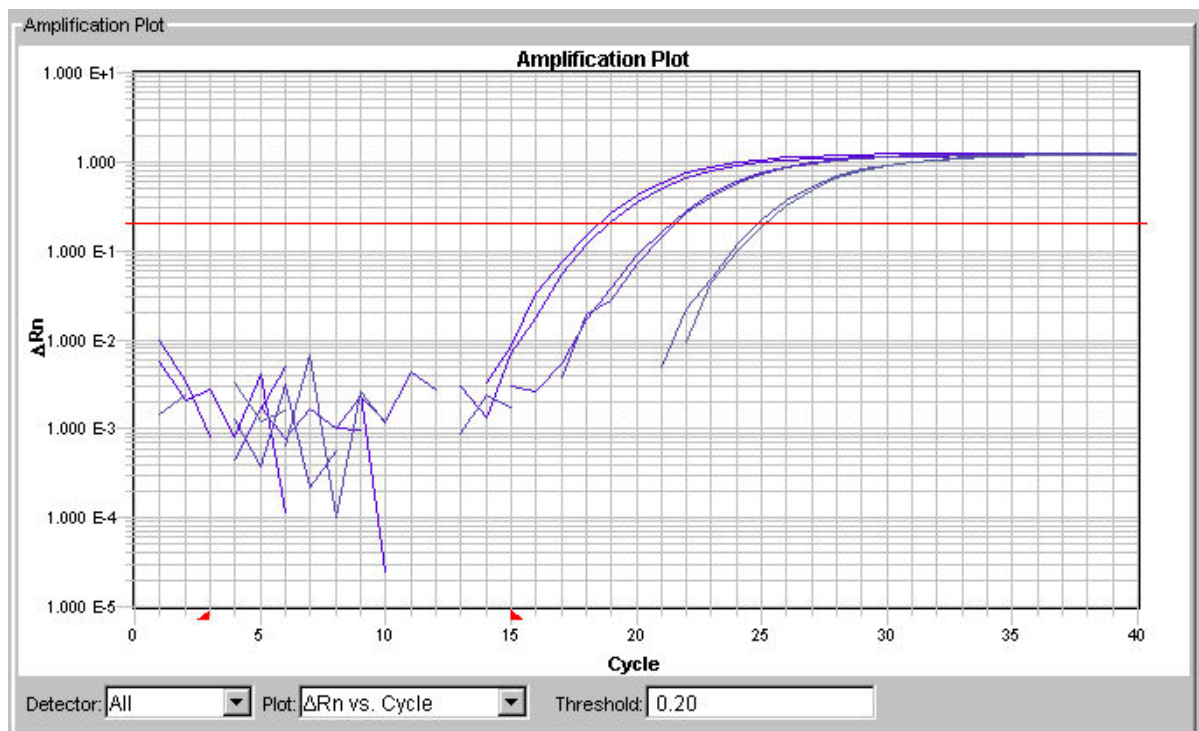


Abb. 3.17 Test zum Aufschluss von Viruspartikeln

Drei Verdünnungen des Ad5/3Δ24 Virus (Input VP) wurden in je zweifacher Ausführung im Thermocycler lysiert, abzentrifugiert und anschließend in die Real-Time PCR eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte über die Detektion einer Sequenz des viralen E4-Gens. Als Standard wurde hochreines Plasmid pTG3602 bekannter Konzentration eingesetzt, das eine Kopie des adenoviralen E4-Gens trägt. 10^2 bis 10^{10} Kopien des Plasmids pro Reaktionsvolumen wurden parallel zu den Virusproben in zweifacher Ausführung in die Real-Time PCR eingesetzt und detektiert.

Oben: Einzelwerte der Doppelbestimmungen mit jeweiligem Ct-Wert und der ermittelten Quantität, sowie deren Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) absolut und prozentual.

Unten: Amplifizierungsplot der Virusproben (Signalstärke ΔR_n gegen Zyklenzahl)

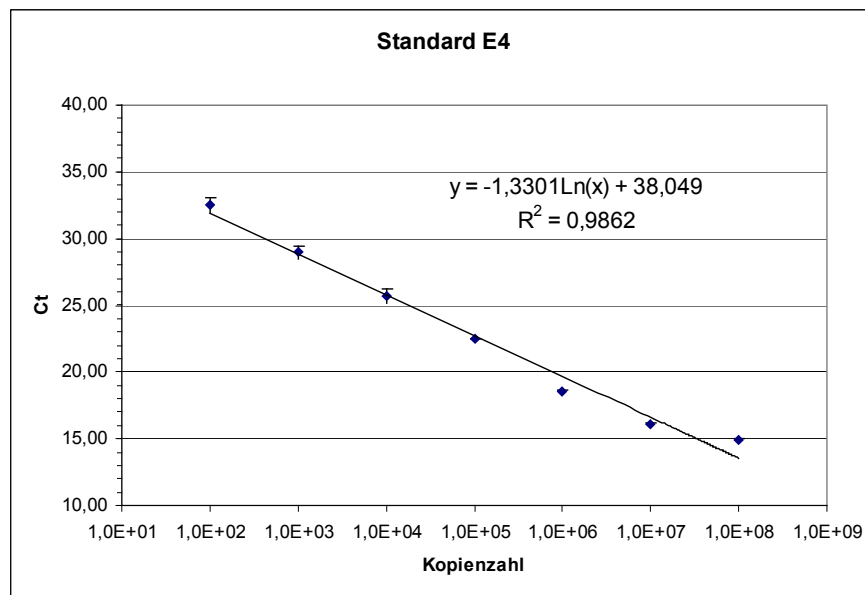
Schließlich wurde in Vortests untersucht, ob das Zellmedium des virushaltigen Überstands oder andere durch Zelllyse freigesetzte Substanzen nicht eventuell die PCR inhibieren, da eine Aufreinigung mit Säulchen aufgrund der großen Probenanzahl und der hohen Zeit- und Kostenintensität nicht möglich war. Eine Hemmung der PCR konnte in allen Fällen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt), so dass nach dem Abzentrifugieren der Virus- und Zelltrümmer des Lysats keine Aufreinigung der Template-DNA erforderlich war.

Infektion und Probenentnahme

Cox2-positive Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip und Cox2-negative Mammakarzinomzellen BT-474 wurden mit 10 VP/Zelle infiziert. Das hinsichtlich des Zytotoxizitätsprofils (s. 3.3.1) viel versprechende Cox2-CRA_d Ad5/3cox2L Δ 24 wurde mit dem nicht-modifizierten Ad5-Wildtypvirus und dem wiederum als Positivkontrolle dienendem isogenetischen Vergleichsvirus Ad5/3 Δ 24 verglichen. Als Negativkontrolle wurde, neben Mock-infizierten Proben (keine Virusinfektion), das E1-deletierte nicht-replizierende Ad5/3CMVLuc Virus eingesetzt.

Die Probenentnahme erfolgte jeweils 2, 4, 6, 8 (und 10) Tage nach Infektion. Um die Gesamtviruslast zu erfassen wurden nicht nur die infizierten Zellen, sondern auch der virushaltige Zellüberstand gesammelt. Die Proben wurden wie beschrieben lysiert und abzentrifugiert und schließlich bis zu Einsatz in der Real-Time PCR bei -20°C gelagert. Für jede Probe (d.h. jedes Virus und jeder Zeitpunkt) wurden drei unabhängige Infektionen und PCR-Läufe durchgeführt.

Bei jedem Probendurchlauf wurden in der gleichen PCR ein E4- und ein Beta-Aktin-Standard mit aufgetragen. Durch Austestung wurde für das E4-Gen ein Konzentrationsbereich von 10^2 - 10^8 Kopien und für zelluläre genomische DNA (über Beta-Aktin) von 0,002-2 ng pro 25 μ l Reaktionsvolumen ermittelt. Jede PCR umfasste mindestens zwei Positivkontrollen und zwei Non-template Kontrollen jeweils für beide Zielgene. Die Non-template Kontrollen waren in allen Fällen E4- und Beta-Aktin-negativ, so dass „Carry-over“-Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten.



Input VP	C _t 1.Messung	C _t 2.Messung	Mittelwert C _t	SD	SD %
100	32,06	32,90	32,48	0,59	1,8
1000	28,63	29,34	28,98	0,50	1,7
10000	25,28	26,09	25,68	0,57	2,2
100000	nd	22,48	22,48	0,00	0,0
1000000	18,49	18,65	18,57	0,12	0,6
1,00E+07	16,16	15,97	16,07	0,14	0,9
1,00E+08	14,76	15,00	14,88	0,17	1,1
1,00E+09	nd	nd	nd	nd	nd
1,00E+10	nd	nd	nd	nd	nd

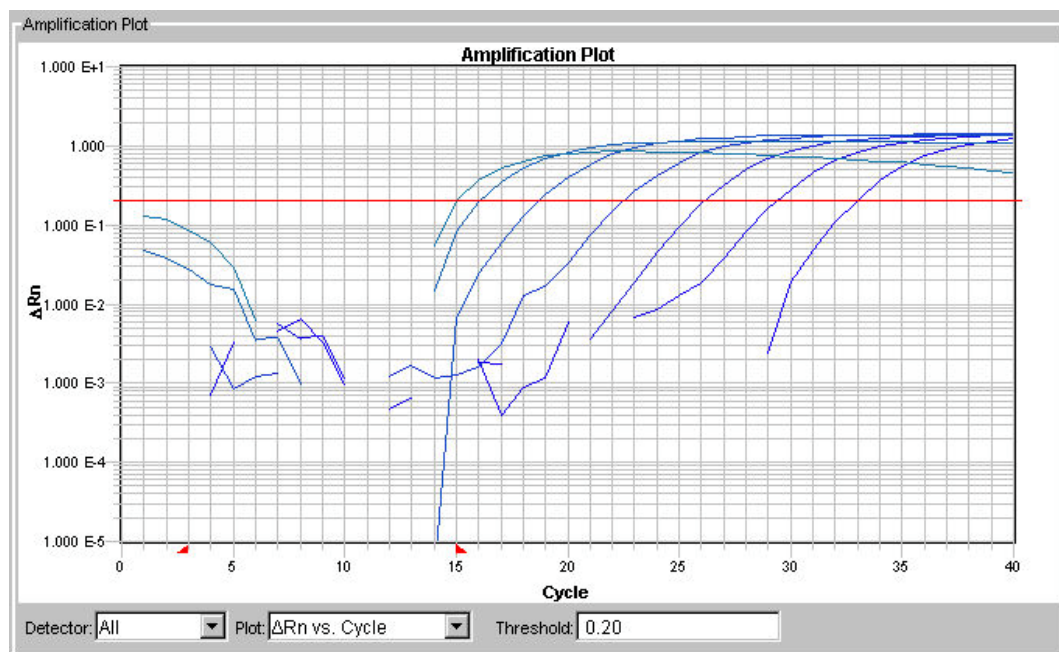


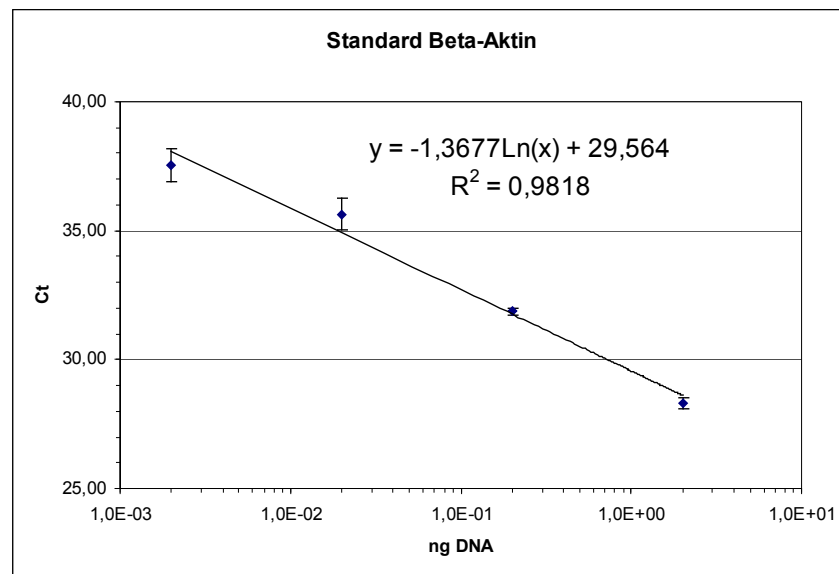
Abb. 3.18 Standardkurve zur absoluten Quantifizierung adenoviraler DNA (E4-Gen)

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

Oben: Standardkurve (C_t-Mittelwerte gegen Kopienzahl +/- Standardabweichung). Der Korrelationskoeffizient war 0,986. Die Steigung hatte einen Wert von -3,06, was einer theoretischen Amplifizierungseffizienz von 112% entspricht.

Mitte: Einzelwerte beider Messungen mit Standardabweichungen in Prozent

Unten: Amplifizierungsplot der 2.Messung (Signalstärke ΔRn gegen Zyklenzahl)



Input ng DNA	C _t 1.Messung	C _t 2.Messung	Mittelwert Ct	SD	SD %
2,00E-03	37,08	38,00	37,54	0,65	1,7
2,00E-02	35,23	36,07	35,65	0,60	1,7
2,00E-01	31,78	31,94	31,86	0,11	0,3
2,00E+00	28,45	28,17	28,31	0,20	0,7

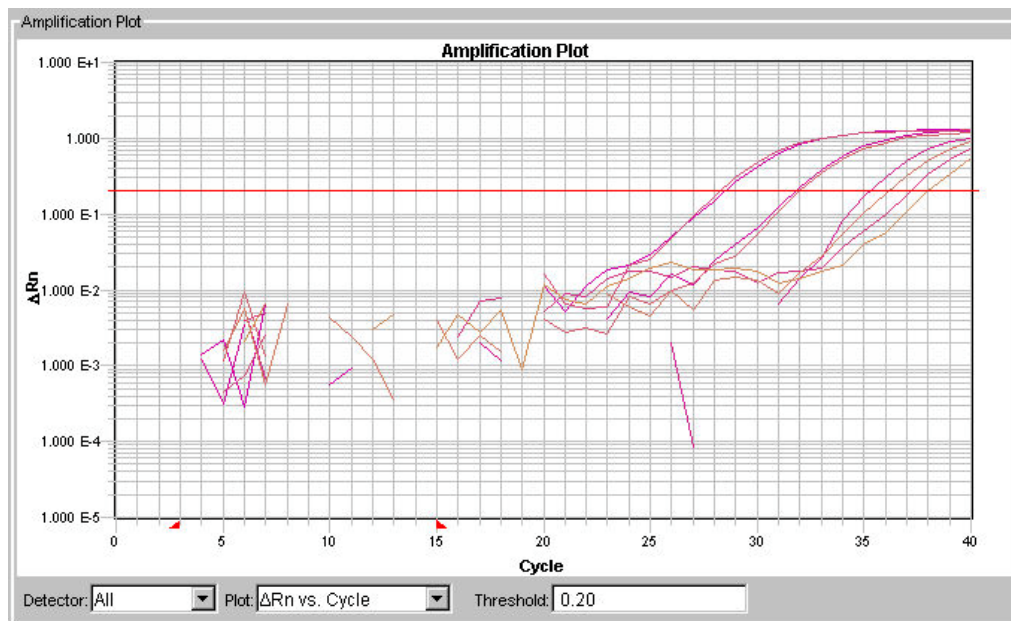


Abb. 3.19 Standardkurve zur absoluten Quantifizierung zellulärer DNA (Beta-Aktin-Gen)
Hochreine humane genomische DNA bekannter Konzentration wurde 10fach seriell verdünnt. 0,002-2 ng DNA pro Reaktionsvolumen wurden in zweifacher Ausführung in die Real-Time PCR eingesetzt und eine Sequenz des humanen Beta-Aktin-Gen detektiert.

Oben: Standardkurve (C_t-Mittelwerte gegen Kopienzahl +/- Standardabweichung). Der Korrelationskoeffizient war 0,982. Die Steigung hatte einen Wert von -3,15, was einer theoretischen Amplifizierungseffizienz von 108% entspricht.

Mitte: Einzelwerte beider Messungen mit Standardabweichungen in Prozent

Unten: Amplifizierungsplot beider Messungen (Signalstärke ΔRn gegen Zyklenzahl)

Ergebnis

Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnten sowohl Virustiter als auch Zellproliferation an mehreren Punkten nach Infektion verfolgt und die Tumorspezifität von Ad5/3cox2LΔ24 demonstriert werden: Während Ad5/3cox2LΔ24 in Cox2-hochexprimierenden Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip stark repliziert, ist die Virusreplikation in Cox2 negativen Mammakarzinomzellen BT-474 in Relation zur isogenetischen Positivkontrolle Ad5/3Δ24 mit E1A-Promotor deutlich reduziert (Abb. 3.20). Dabei ist die Viruslast des Cox2-CRAds in SKOV3.ip Zellen 10 Tage nach Infektion in etwa doppelt so hoch wie bei Ad5/3Δ24, in BT-474 beträgt sie nur ca. 30%. Die Replikationsrate von Ad5Wt in den OvCa-Zellen lag aufgrund der geringen CAR-Expression auf sehr niedrigem Niveau, in BT-474 zwischen der der Positivkontrolle und des Cox2-CRAds. D.h., dass durch die verwendeten Strategien der CRAd-Steuerung nicht nur eine vielfach höhere onkolytische Effizienz in OvCa-Zellen, sondern auch eine erhöhte Sicherheit in Cox2-negativen Zellen erzielt werden konnten. Mock-infizierte Proben (keine Virusinfektion) waren hinsichtlich der E4-Detektion in allen Fällen wie erwartet negativ.

Zusammenfassend konnte mittels Real-Time-PCR gezeigt werden, dass die differentielle Onkolyse tatsächlich das Resultat einer differentiellen Virusreplikation ist und nicht auf andere toxische Effekte nach Virusinfektion, beispielsweise der Expression des adenoviralen E1A-Proteins, zurückzuführen ist.

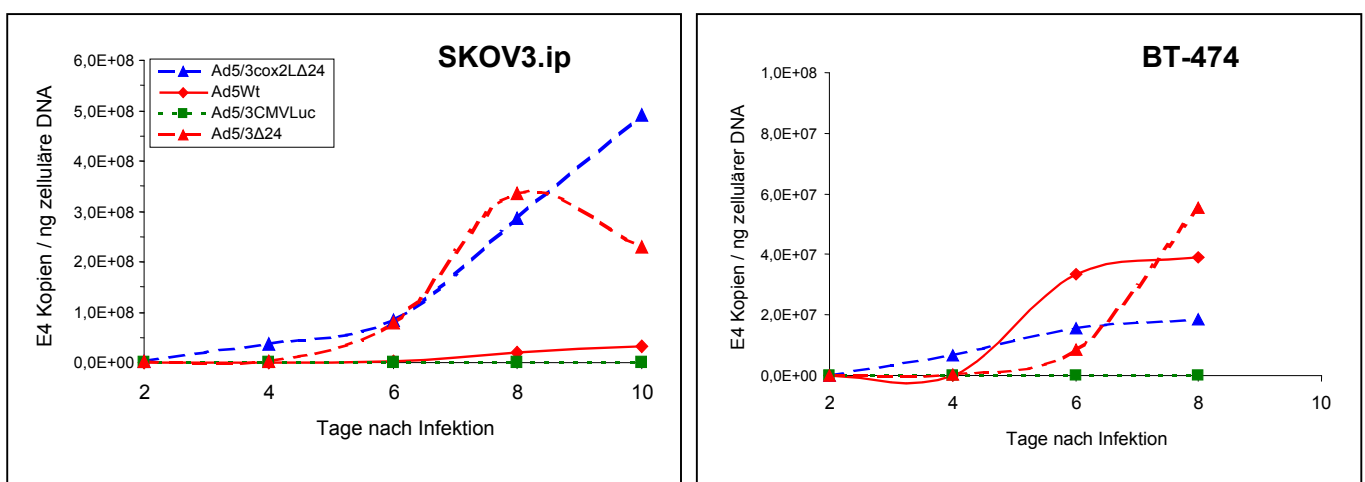


Abb. 3.20 Virusreplikation in Cox2-positiven (links) und Cox2-negativen Zellen (rechts)

Cox2-positive Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip und Cox2-negative Mammakarzinomzellen BT-474 wurden mit 10 VP/Zelle infiziert. Nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen wurden Zellen samt virushaltigem Überstand geerntet. Zellen und Viren wurden lysiert und das Lysat als Template in die **Real-Time PCR** eingesetzt. In jeder Probe wurden das adenovirale E4-Gen und das zelluläre Beta-Aktin Gen detektiert und anhand absoluter Standardkurven quantifiziert. Dargestellt ist die E4-Kopienzahl bezogen auf die Menge zellulärer genomischer DNA als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

In Relation zur Positivkontrolle Ad5/3Δ24 repliziert Ad5/3cox2LΔ24 in SKOV3.ip deutlich stärker als in BT-474.

3.3.2.2 Biologischer Titertest (TCID₅₀)

Mittels Real-Time PCR konnte die differentielle Virusproduktion in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle gezeigt werden (3.3.3.1). Dabei wurde ein virales Gen quantifiziert und somit auch defekte Viruspartikel erfasst.

Um nun ausschließlich die funktionellen Viruspartikel zu erfassen, wurde zusätzlich ein biologischer Titertest (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀) eingesetzt. Die TCID₅₀-Methode basiert auf der Entwicklung von CPE (zytopathischer Effekt) nach Infektion geeigneter Zellen in seriellen Virusverdünnungen (Virustitration) und zeichnet sich durch eine höhere Genauigkeit im Vergleich zu anderen Methoden der Virustiterbestimmung (Plaque Assay, Gene Transfer Assay) aus.

Cox2-positive Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip und Cox2-negative Mammakarzinomzellen BT-474 wurden mit 10 VP/Zelle des jeweiligen Virus infiziert. Es wurden die gleichen Viren wie in der Real-Time PCR eingesetzt: Ad5/3cox2LΔ24, Ad5Wt, Ad5/3Δ24 und Ad5/3CMVLuc. Für jede Probe wurden unabhängig voneinander vier Infektionen durchgeführt. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden die Zellen abgeschabt und samt virushaltigem Überstand (Gesamtviruslast) gesammelt. Der Zellaufschluss in den Proben erfolgte durch kurze Gefrier- und Auftauzyklen.

In einem Standard-TCID₅₀ Test wurden 293A-Zellen als Doppelbestimmung in 10-fachen Verdünnungsreihen mit einem Aliquot der jeweiligen Virusprobe infiziert und die 96-Well-Platten nach 10 Tagen hinsichtlich auftretendem CPE ausgewertet.

Um im Messbereich zu bleiben, musste die Viruskonzentration bei jeder Messung anhand vorangegangener Ergebnisse abgeschätzt werden und die Probe dann dementsprechend verdünnt werden. Dabei lagen die eingesetzten Verdünnungen je nach Virus und Zeitpunkt der Ernte zwischen 10^{-2} und 10^{-13} .

Die zuvor anhand der onkolytischen Assays und der Real-Time PCR getroffenen Aussagen konnten untermauert werden: Während das Cox2Δ24 CRAd stark in Cox2-hochexprimierenden Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip repliziert, ist die Virusreplikation in den Cox2 negativen Mammakarzinomzellen BT-474 vergleichbar zum isogenetischen Kontrollvirus Ad5/3Δ24 (Abb. 3.21). In Korrelation zu den Ergebnissen der quantitativen

PCR ist auch hier in SKOV3.ip der Ad5/3cox2LΔ24-Titer im Vergleich zu Ad5/3Δ24 ca. doppelt so groß (am Maximum vier Tage nach Infektion). Die Reduktion der Viruslast an Tag 6 und 8 ist auf eine geringere Anzahl zur Verfügung stehender Wirtszellen infolge der lysierenden Virusreplikation zurückzuführen.

Die Ad5Wt-Replikation in BT-474 ist wiederum deutlich höher in Relation zum Cox2-CRAAd. Das replikationsdefiziente Virus Ad5/3CMVLuc (Negativkontrolle) war erwartungsgemäß nicht nachweisbar.

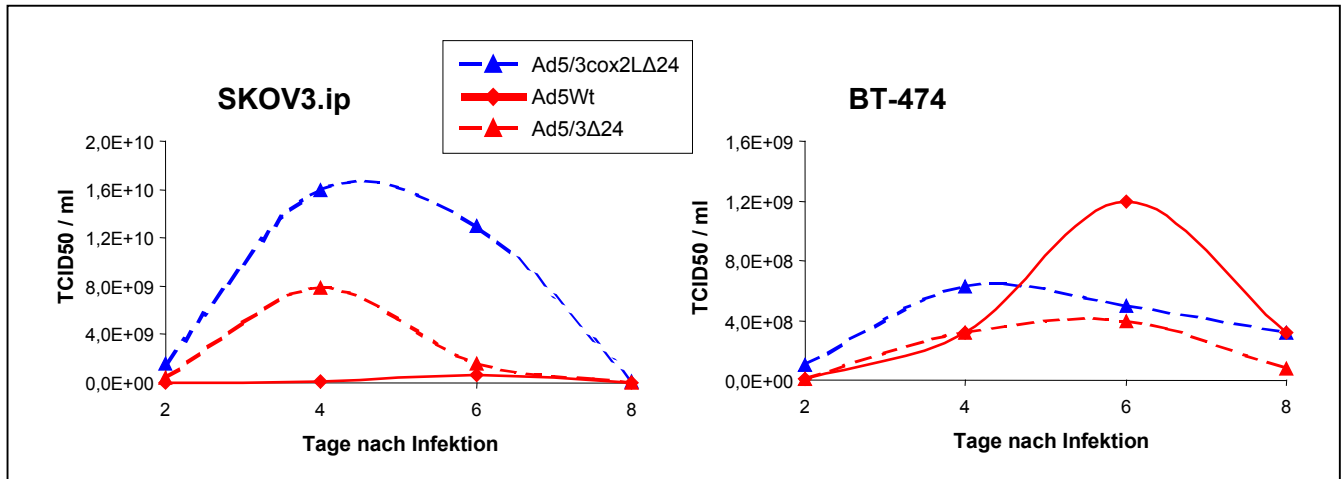


Abb. 3.21 Virusreplikation in Cox2-positiven (links) und Cox2-negativen Zellen (rechts)

Cox2-positive Ovarialkarzinomzellen SKOV3.ip und Cox2-negative Mammakarzinomzellen BT-474 wurden mit 10 VP/Zelle infiziert. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden Zellen samt virushaltigem Überstand geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proben in einem Standard-TCID₅₀ Test auf die Menge funktioneller Viruspartikel untersucht.

In Relation zur Positivkontrolle Ad5/3Δ24 repliziert Ad5/3cox2LΔ24 in SKOV3.ip deutlich stärker als in BT-474.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte mittels Real-Time PCR und TCID₅₀-Assay gezeigt werden, dass die differentielle Onkolyse tatsächlich das Resultat einer differentiellen Virusreplikation ist und nicht auf andere toxische Effekte nach Virusinfektion zurückzuführen ist. Die Replikation des Cox2-CRAAd in Cox2-positiven SKOV3.ip-Zellen ist im Vergleich zur Positivkontrolle Ad5/3Δ24 deutlich höher, während sie in Cox2 negativen BT-474 Zellen deutlich reduziert (Real-Time PCR) oder vergleichbar (TCID₅₀) ist.

Überdies wurde anhand der Daten zur Ad5Wt-Replikation der deutliche Vorteil, der durch die verwendeten Strategien der CRAAd-Steuerung hinsichtlich Effizienz und Sicherheit erzielt werden konnte, demonstriert.

3.3.3 Anti-Tumor Effekt der Cox2-CRAbs in vivo

In Vorversuchen in vitro konnte gezeigt werden, dass Tumorselektivität und onkolytische Potenz durch Kombination der einzelnen Komponenten deutlich gesteigert werden können. Die Verifizierung dieser Ergebnisse in vivo stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung einer tumorselektiven, klinischen Gentherapie dar. Durch die Austestung der verschiedenen Modifikationskombinationen können mögliche Unterschiede zur in vitro Situation erkannt und in die weitere Entwicklungsarbeit integriert werden.

Ziel war die Untersuchung der antitumoralen Effizienz einer Therapie mit Cox2-Promotor gesteuerten, konditional replizierenden Adenoviren bei humanen Ovarialkarzinomen im murinen Tumormodell. Hierbei wurde eine somatische, lokal angewandte Therapie zur Behandlung von malignen Ovarialtumoren am SCID-Mausmodell und Nacktmausmodell durchgeführt mit dem Ziel durch gezielte virale Replikation selektiv nur Tumorzellen abzutöten. Gemessen werden sollen je nach verwendetem Tiermodell Tumorgröße bei subkutanen bzw. Überlebenszeit bei intraperitonealen Tumoren.

Beide Tiermodelle sind standardisiert, international anerkannt und ermöglichen verlässliche und reproduzierbare Untersuchungen des Tumorwachstums bei malignen gynäkologischen Tumoren.

Nach Inokulation von humanen Tumorzellen und Etablierung entsprechender solider Tumoren in Versuchsmäusen wurden die CRAbs in Abhängigkeit vom verwendeten Tumormodell subkutan bzw. intraperitoneal appliziert.

3.3.3.1 Hemmung des Tumorwachstums durch Cox2-CRAbs in vivo

Zunächst wurden die Cox2-gesteuerten CRAbs mit der längeren Promotorvariante Cox2L in vivo in einem Ovarialkarzinom-Nacktmausmodell mit subkutanen Tumoren (Ovarialkarzinomzelllinie Hey) verglichen (Abb. 3.22 und 3.23).

Hierbei zeigte sich ein deutlich geringeres Tumorstadium bei Mäusen, die mit Ad5/3cox2LΔ24 behandelt worden waren: Dieses Cox2-Promotor gesteuerte und tropismusmodifizierte CRAd hatte einen größeren Anti-Tumor-Effekt als die Positivkontrolle Ad5Wt ($P=0.0001$), war effektiver als die Negativkontrollen Ad5LacZ ($P<0.01$) und die Gruppe ohne Virusgabe ($P<0.001$) und hatte eine vergleichbare Effizienz wie Ad5/3Δ24 ($P=0.4$). Das nicht E1A-deletierte Cox2-CRAd Ad5/3cox2LE1 und das E1A-doppelt deletierte CRAd Ad5/3cox2LΔ2Δ24 waren nicht effektiver als die Negativkontrollen (P nicht signifikant).

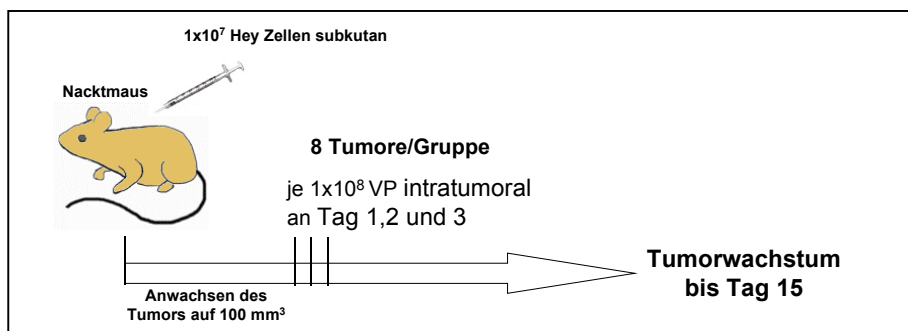


Abb. 3.22 Schema der Versuchsdurchführung zum subkutanen Nacktmausmodell

Hey Ovarialkarzinomzellen wurden subkutan in Nacktmäusen inokuliert. Nach Erreichen einer Tumorstöße von ca. 100 mm³ wurden an drei aufeinander folgenden Tagen je 1x10⁸ VP des jeweiligen Virus i.t. injiziert und das Tumorstadium über 15 Tage gemessen.

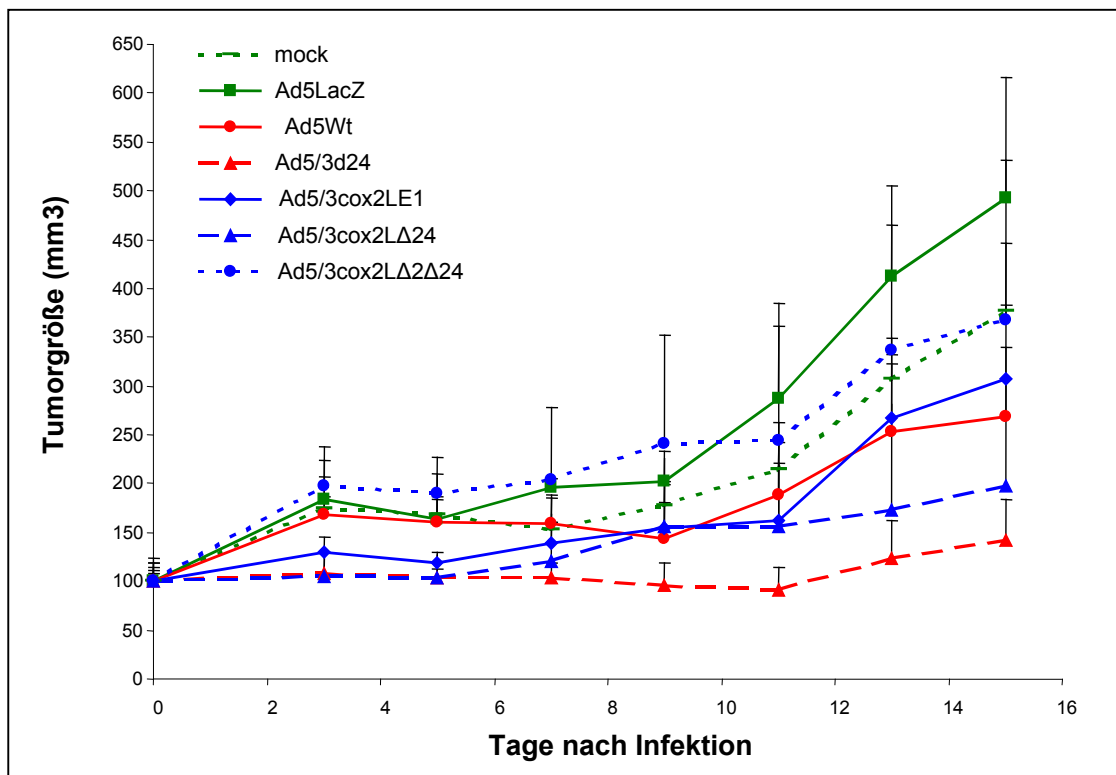


Abb. 3.23 Ad5/3cox2-CRAbs hemmen das Tumorstadium in vivo.

Ad5/3cox2LΔ24 zeigt einen größeren Anti-Tumor-Effekt als die Positivkontrolle Ad5Wt ($P=0.0001$), ist effektiver als die Negativkontrollen Ad5LacZ ($P<0.01$) und die Gruppe ohne Virusgabe ($P<0.001$) und hat eine vergleichbare Effizienz wie Ad5/3Δ24 ($P=0.4$). (Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus 8 Tumoren, siehe Abb. 3.22.)

3.3.3.2 Erhöhung der Überlebenszeit durch Cox2-CRAds in vivo

Im Rahmen einer Überlebenszeitanalyse wurden Tumorzellen und Adenoviren diesmal intraperitoneal injiziert, um der klinischen Situation einer Ovarialkarzinomkrankung noch näher zu kommen. 50 SCID-Mäusen (5 Gruppen à 10 Tiere) wurde zu Beginn des Versuchs SKOV3.ip Zellen (1×10^7 Zellen in ca. 500 μ l) intraperitoneal implantiert. Die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3.ip stellt ein standardisierbares Modell zum Vergleich mit publizierten Daten dar. Nach Anwachsen der Tumorzellen am Peritoneum und Erreichen einer in Vorversuchen etablierten Tumorlast wurden an drei aufeinander folgenden Tagen 1×10^8 Viruspartikel intraperitoneal injiziert und anschließend die Überlebenszeit der Gruppen verglichen. Dabei wurde das im subkutanen Tumormodell effizienteste Virus Ad5/3cox2L Δ 24 verglichen mit Wildtyp Adenovirus 5, dem replikationsdefizienten Virus Ad5/3CMVLuc, der isogenetischen Positivkontrolle ohne Cox2-Promotor Ad5/3 Δ 24 und schließlich einer Gruppe ohne Virusgabe.

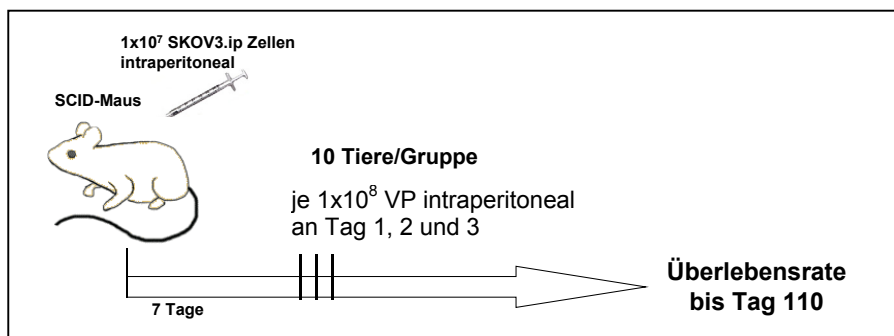


Abb. 3.24: Schema der Versuchsdurchführung zum intraperitonealen SCID-Mausmodell
SKOV3.ip Ovarialkarzinomzellen wurden intraperitoneal in SCID-Mäuse implantiert. Nach Anwachsen des Tumors wurden an drei aufeinander folgenden Tagen je 1×10^8 VP des jeweiligen Virus i.p. injiziert und die Überlebensrate über 110 Tage beobachtet.

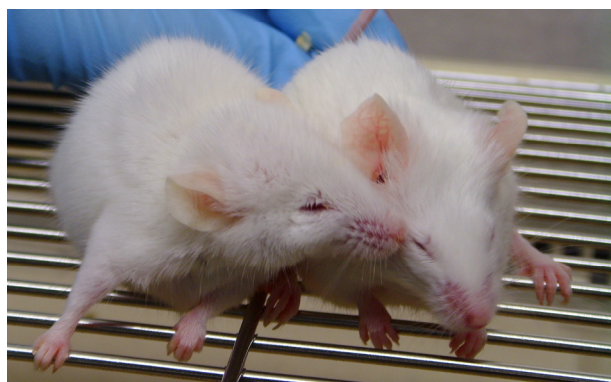
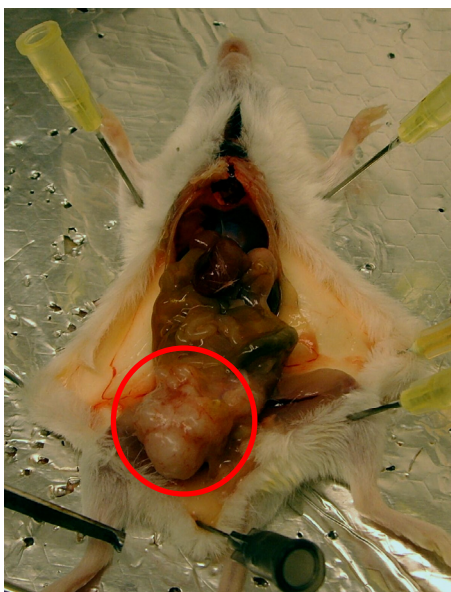


Abb. 3.25: SCID-Mäuse
(Foto freundlicherweise von Frau A. Dragoi, Universitätsklinik Düsseldorf bereitgestellt)

Abb. 3.26: SCID-Maus mit Tumor im Peritoneum
(Foto freundlicherweise von Frau A. Dragoi, Universitätsklinik Düsseldorf bereitgestellt)

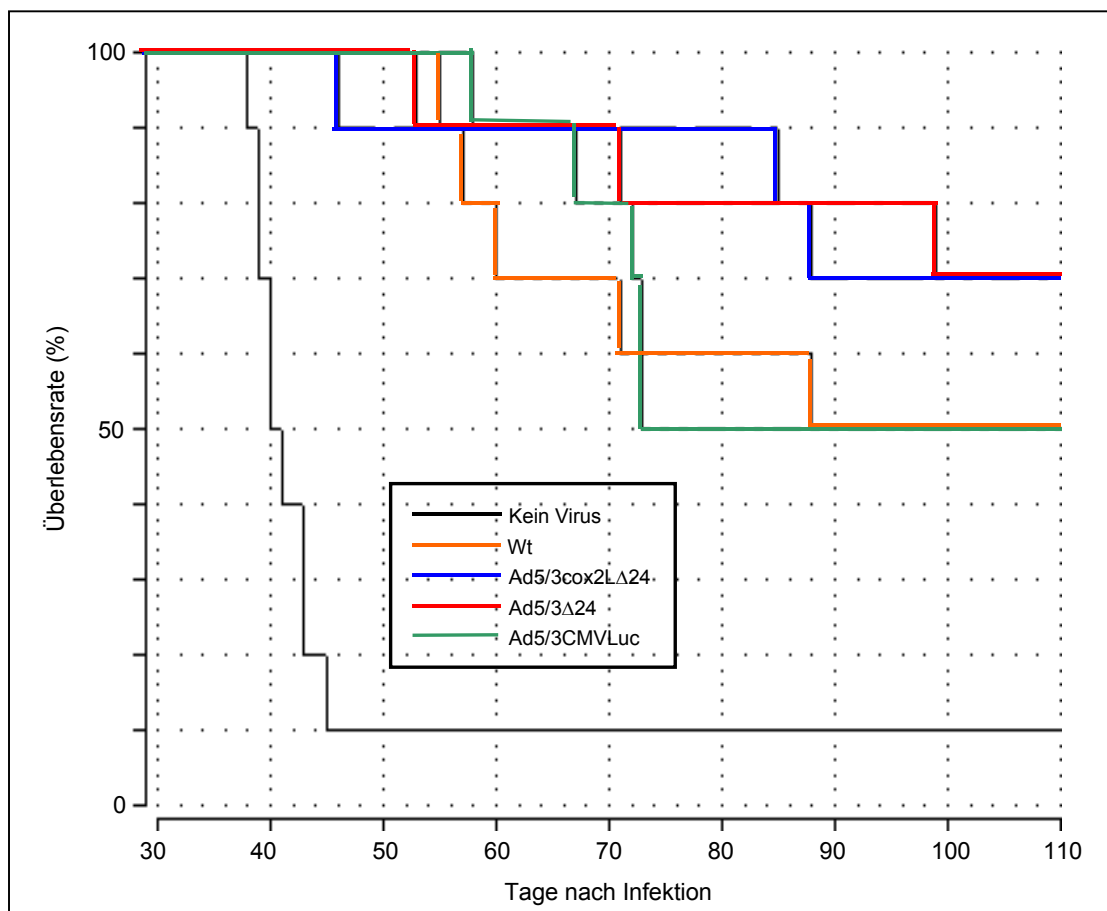


Abb. 3.26: Therapie mit Ad5/3cox2LΔ24 führt zu einer erhöhten Überlebensrate in vivo. SCID-Mausmodell mit intraperitonealen OvCa-Tumoren, Details siehe Text und Abb. 3.24.

Nach 110 Tagen zeigten das Wildtyp Virus ($P=0.002$), das Cox2-CRAAd Ad5/3cox2LΔ24 ($P<0.001$) und die Positivkontrolle Ad5/3Δ24 ($P<0.001$) ein signifikant höheres Überleben als die Gruppe ohne Virusgabe (Abb. 3.26). Dabei schienen das Cox2-CRAAd und die Positivkontrolle trotz nicht signifikanter P-Werte in einem höheren Überleben zu resultieren als das Wildtyp Virus. Ad5/3cox2LΔ24 und Ad5/3Δ24 zeigten vergleichbare Effizienz ($P=0.971$). Nach 110 Tagen überlebten 70% der Ad5/3cox2LΔ24 oder Ad5/3Δ24 behandelten Tiere. Die Überlebensrate bei Ad5Wt behandelten Mäuse lag dagegen nur bei 50%, bei Mäusen ohne Virusgabe bei 10%.

Zusammenfassung der in vivo Daten

Das Ergebnis der Tierversuche entspricht den Erwartungen der Arbeitshypothese und ist im Hinblick auf die Entwicklung einer wirksamen Therapie viel versprechend. Das Cox2-CRAAd Ad5/3cox2LΔ24 schneidet deutlich besser ab als das Wildtyp Virus. Ad5/3cox2LΔ24 zeigte sich in den Tierversuchen unter den getesteten Cox2L-Promotor gesteuerten CRAAds analog zu den gewonnenen in vitro Daten als interessantester Vektor. **Ad5/3cox2LΔ24 erscheint als bester Kompromiss höchstmöglicher Spezifität für die getesteten Tumorzellen bei Erhalt der onkolytischen Potenz.**

4. Diskussion

Fortgeschrittene Karzinome gehen trotz moderner Therapieregime häufig mit einer schlechten Prognose einher. Dies ist insbesondere auf die Schwierigkeit zurückzuführen, mit klassischen Methoden Tumorreste bzw. Mikrometastasen vollständig zu verhindern oder zu entfernen. Überdies treten bei betroffenen Patienten im Verlauf der Behandlung häufig Resistenzen gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika auf, resultierend in einem gesteigerten Rezidivrisiko verbunden mit einer schlechteren Prognose.

Gentechnisch modifizierte Adenoviren stellen vor diesem Hintergrund innovative onkolytische Agenzien für die Krebsgentherapie dar. Eine Vielzahl adenoviraler Vektoren wurde innerhalb der letzten Dekade getestet und konnte bereits in klinischen Studien erste Erfolge hinsichtlich Therapieeffizienz und insbesondere klinischer Sicherheit erzielen.

Unlängst wurde in China die weltweit erste Adenovirus-basierte Gentherapie zugelassen (Gendicine[®]), die in Kombination mit konventioneller Strahlentherapie für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt wird (Garber, 2006; Peng, 2005). Dieser Fortschritt hinsichtlich der Sicherheit und der klinischen Anwendbarkeit steht exemplarisch für die Möglichkeiten, die die gentherapeutische Nutzung adenoviraler Vektoren in Zukunft bieten könnte.

Weiterhin stehen allerdings Adenoviren als Vektoren für die Gentherapie unter genauer Prüfung, da früh erkannt wurde, dass die intravenöse Applikation hoher Dosen von Adenoviren der ersten Generation aufgrund einer starken Immunantwort zu einer deutlichen Toxizität des Vektors führen kann. Gerade für die Behandlung von hereditären Erkrankungen und Stoffwechselkrankheiten, wo die Erhaltung der Vitalität der Zielzellen und eine breite Transduktion von entscheidender Bedeutung sind, könnten andere Vektoren geeigneter sein (Hemminki et al., 2002).

Im Gegensatz dazu konnte in einer Vielzahl gentherapeutischer Studien der Nutzen adenoviraler Vektoren für onkologische Behandlungsansätze belegt werden. Dabei steht hier die selektive und effiziente Zerstörung der malignen Zielzelle, und nicht eine

dauerhafte Transgenexpression, im Vordergrund. Die ausgelöste Immunantwort könnte hinsichtlich benachbartem nicht-infiziertem Tumorgewebe zu einem zusätzlichen therapeutischen Effekt beitragen. Hohe Transduktionsraten in teilungsaktiven und ruhenden Zellen sind einer der wichtigsten Vorteile der Adenoviren für die Tumorbehandlung.

Gegenwärtig basieren die erfolgreichsten Ansätze in Zusammenhang mit bösartigen Erkrankungen auf replikationskompetenten Adenoviren, die eine effiziente Tumورpenetration und gewebespezifische Replikation erlauben. Die so genannten konditional replizierenden Adenoviren (CRAds) repräsentieren hoch-potente anti-tumorale Agenzien, die sich in Abhängigkeit bestimmter tumorcharakteristischer Zelldefekte selektiv replizieren. Neben der transkriptionellen Kontrolle spielt dabei auch das transduktionelle Targeting eine entscheidende Rolle, um gezielt Tumorgewebe zu infizieren und das umgebende gesunde Gewebe sowie lebenswichtige Organe zu schonen. Auf diese Weise können die Wirksamkeit der onkolytischen Virotherapie gesteigert und unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden. Im Fokus dieser neuen perspektivischen Therapieoption liegen vor allem fortgeschrittene Karzinome mit disseminierter Metastasierung bzw. schlechter Prognose.

Um das Ziel eines selbstamplifizierenden und gleichzeitig selbstlimitierenden Therapeutikums zu erreichen, kann die virale Replikation z.B. an tumorspezifische Promotoren gekoppelt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine neue Generation konditional replizierender Adenoviren für die Behandlung gynäkologischer Malignome konstruiert (s. Abb. 1.9; Bauerschmitz et al., 2006). Dabei wurden zwei Längenvarianten des humanen Cox2-Promotors (s. 1.5.7.1) in Kombination mit drei unterschiedlichen Varianten des viralen „Replikationsgens“ E1A eingesetzt. Durch die Mutationen im E1A-Gen kann der virale Vermehrungszyklus an karzinom-typische Signaldefekte (p16-Rb und p300) gekoppelt werden (s. 1.5.7.3). Überdies verfügten die Vektoren über eine genetisch modifizierte Virushülle (5/3-Fiberchimäre, s. 1.5.7.2 und Abb. 1.11; Kanerva et al., 2002a), durch die bereits eine deutliche Erhöhung der Infektionsrate bei Melanom- und Ovarialkarzinomzellen erreicht werden konnte (Rivera et al., 2004; Kanerva et al., 2002a).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese neuen, innovativen CRAds, die speziell für die Behandlung gynäkologischer Malignome, insbesondere des Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinoms entwickelt wurden, sowohl in vitro als auch in vivo charakterisiert.

Nachdem die Cox2-Genexpression in CeCa- und MaCa-Zellen gezeigt wurde (s. Abb. 3.4), konnte die Aktivität des Cox2-Promotors auch im adenoviralen Kontext nachgewiesen (s. Abb. 3.6) und der Cox2-Promotor damit zur transkriptionellen Steuerung der untersuchten Ad-Vektoren eingesetzt werden.

Darüber hinaus konnte durch den Einsatz der 5/3-Fibermodifikation, durch die der Vektor zum tumorspezifischen Ad3-Rezeptor umgeleitet wird, eine Erhöhung der Transduktionsrate bei CeCa- und MaCa-Zellen erreicht werden (s. Abb. 3.7).

Die Cox2-Promotor gesteuerten und tropismusmodifizierten CRAds zeigten in vitro deutliche onkolytische Aktivität bei CeCa-, MaCa- und OvCa-Zellen, während eine Zytotoxizität in normalen Kontrollzellen nicht auftrat oder deutlich reduziert war (s. Abb. 3.9 bis 3.16). Somit konnte die Tumorspezifität der 5/3-Cox2-CRAds demonstriert werden.

Um eine erhöhte Sicherheit zu erreichen, verfügten die untersuchten Vektoren über Deletionen im viralen Replikationsgen E1A, die in Kombination mit transkriptionellem Targeting durch den Cox2-Promotor und transduktionellem Targeting durch 5/3-Fibermodifikation hinsichtlich ihres Effektes auf eine tumorspezifische Virusreplikation evaluiert wurden. Dabei wurde gezeigt, dass beide E1A-Deletionen tatsächlich zu einer Reduzierung der Toxizität in Normalzellen führen. Dabei reduziert oder verhindert die Doppeldeletion E1 Δ 2 Δ 24 jedoch auch die Onkolyse von Tumorzellen, so dass die einfache Deletion E1 Δ 24 als selektiver Sicherheitsmechanismus vorzuziehen ist. Insgesamt steht das abnehmende onkolytische Potential mehrfach-modifizierter Viren in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Balague et al., 2001; Alemany et al., 2000).

Um die direkte Korrelation zwischen Zelllyse und Virusreplikation in Abhängigkeit des Cox2-Status der Wirtszelle zu demonstrieren, wurden erfolgreich zwei neue, unabhängige Methoden etabliert und angewandt. Mittels Real-Time PCR (s. Abb. 3.20) und einem biologischen Titertest (s. Abb. 3.21) konnte die Virusreplikation über mehrere Tage nach Infektion der Tumorzellen verfolgt werden. Es zeigte sich, dass die

differentielle Onkolyse tatsächlich das Resultat einer differentiellen Virusreplikation ist und nicht auf sonstige toxische Effekte der Virusinfektion zurückzuführen sind. So ist beispielsweise bekannt, dass ein möglicher Nebeneffekt der S-Phasen Induktion durch das adenovirale E1A-Protein in der Akkumulation des Tumorsuppressorproteins p53 und infolgedessen einer p53-abhängigen Apoptose besteht (Debbas et al., 1993).

Nach umfassender in vitro Charakterisierung konnte schließlich die Wirksamkeit der Cox2-CRAbs tierexperimentell in zwei unterschiedlichen Mausmodellen gezeigt werden. Zunächst wurden Toxizität und Wirksamkeit der CRAbs nach lokaler Virusapplikation in einem Ovarialkarzinom-Nacktmausmodell mit subkutanen Tumoren analysiert. Hierbei kam es durch die Behandlung mit Cox2-CRAbs, insbesondere mit Ad5/3cox2LΔ24, zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums in vivo (s. Abb. 3.23). Tiere, die mit Wildtyp-Virus oder dem isogenetischen Kontrollvirus ohne Cox2-Promotor Ad5/3Δ24 behandelt worden waren, hatten hingegen ein deutlich höheres Tumorwachstum.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden SCID-Mäuse mit intraperitonealen Tumoren eingesetzt, um der klinischen Situation einer Ovarialkarzinomerkrankung noch näher zu kommen. Tiere, die intratumoral Ad5/3cox2LΔ24 erhalten hatten, wiesen gegenüber anderen Gruppen eine deutlich erhöhte Überlebensrate auf (s. Abb. 3.26). Somit konnte durch Einsatz der Cox2-CRAbs eine Vervierfachung der Lebenserwartung erreicht werden.

Zusammenfassend konnten die zuvor in vitro gemessenen Daten zur onkolytischen Wirksamkeit der CRAbs in zwei unabhängigen Mausmodellen bestätigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Evaluierung der Ad5/3cox2-CRAbs für die Behandlung gynäkologischer Malignome ist zum Teil bereits in eine Publikation für *Molecular Therapy* eingeflossen (Bauerschmitz et al., 2006).

4.1 Kontrolle der viralen Replikation durch den Einsatz eines heterologen Promotors (transkriptionelles Targeting)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zunächst in der Evaluierung der Cox2-Genexpression in Zervix- und Mammakarzinomzellen, um die potentielle Eignung des Cox2-Promotors als tumorspezifischer Promotor (TSP) für die transkriptionelle Kontrolle der adenoviralen Replikation im Rahmen einer onkolytischen Virotherapie zu überprüfen.

Hinsichtlich des Ovarialkarzinoms wurde bereits eine erhöhte Cox2-Expression sowohl in Zelllinien als auch in Tumorproben von betroffenen Patientinnen nachgewiesen (Denkert et al., 2002). Auch für das Mammakarzinom (Ristimäki et al., 2002; Half et al., 2002; Soslow et al., 2000) und das Zervixkarzinom (Dai et al., 2005; Ferrandina et al., 2002) lagen entsprechende Daten vor, die jedoch eher auf die klinische Relevanz des Cox2-Status als prognostischem Indikator abzielen.

Kürzlich demonstrierten Subbaramaiah et al. eine Induktion der Cox2-Transkription durch Onkoproteine des humanen Papillomavirus 16 (HPV16), das kausal an der Zervix-Karzinogenese beteiligt ist: HPV16 E6- und E7-Proteine führten durch eine Aktivierung des EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Pathways zu einer gesteigerten Cox2-Transkription (Subbaramaiah et al., 2007). Der Effekt wurde über die Bindung von AP-1 (*activator protein*) an das CRE (*cAMP-responsive element*) des Cox2-Promotors vermittelt (vergl. unten und Abb. 4.1).

Für eine erfolgreiche onkolytische Virotherapie ist es wichtig, nicht nur eine ausreichende TSP-Aktivität in Tumorzellen zu gewährleisten, sondern auch eine geringe Aktivität bzw. E1A-Expression in Normalzellen sicherzustellen. Eine unspezifische Virusreplikation und Zelllyse im benachbarten gesunden Gewebe und lebensnotwendigen Organen kann zu toxischen Nebenwirkungen führen und wirkt damit auch Dosis-limitierend. Da adenovirale Partikel in der Leber akkumulieren ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Promotoraktivität in Hepatozyten zu berücksichtigen (Raper et al., 2003).

Der Cox2-Promotor wurde bereits erfolgreich im Hinblick auf seine Verwendbarkeit für die adenovirale Gentherapie des Ovarialkarzinoms evaluiert (Barker et al., 2003; Casado et al., 2001a). Der so genannte „*tumor on/liver off*“-Status des Cox2-Promotors im adenoviralen Kontext wurde durch Yamamoto et al. demonstriert (Yamamoto et al., 2001): Bei intravaskulärer Injektion entsprechender Vektoren war die Cox2-Promotor vermittelte Transgenexpression in Hepatozyten geringer als unter dem starken ubiquitären CMV-Promotor. Die in vivo Administration Cox2-Promotor gesteuerter Viren resultierte in Relation zur CMV-Promotor Kontrolle in einer reduzierten Toxizität. Das Aktivitätsprofil des Cox2-Promotors korrelierte überdies mit dem Cox2-mRNA Status der getesteten Zelllinien.

Bezüglich der Verwendung des Cox2-Promotors für die onkolytische Behandlung des Ovarialkarzinoms konnten bereits Kanerva et al. gute Effizienz und Tumorselektivität in Kombination mit einer RGD-Fibermodifikation nachweisen (Kanerva et al., 2004a).

Casado et al. zeigten die Aktivität des Cox2-Promotors in einer Reihe von OvCa-Zelllinien bei reduzierter Aktivität in normalen primären Mesothel- und Leberzellen (Casado et al., 2001a). Überdies wurde bei Ad-Vektoren, die die Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase (HSV-TK) unter Kontrolle des Cox2-Promotors exprimierten, eine klare Verringerung der Toxizität in Normalgewebe beobachtet.

Die Sicherheit dieses gentherapeutischen Behandlungsansatzes durch die Kombination aus Cox2-Promotor und 5/3-Kapsidmodifikation konnte auch in der vorliegenden Arbeit belegt werden, da primäre Hepatozyten im MTS-Zytotoxizitäts-Assay nicht lysiert wurden (s. Abb. 3.15). Somit wäre in der klinischen Situation keine Lebertoxizität zu erwarten.

Die Expression von Cox2 in ausgewählten gynäkologischen Tumorzelllinien (CeCa, MaCa, OvCa) konnte in der vorliegenden Arbeit mittels immunohistochemischer Färbung zunächst auf Proteinebene bestätigt werden (s. Abb. 3.1).

Da die Expressionsrate jedoch auch auf translationaler Ebene kontrolliert wird, korreliert die Proteinmenge nur bedingt mit der Promotorstärke. Aus diesem Grunde wurde die Cox2 Genexpression im folgenden auch auf transkriptioneller Ebene über die Quantifizierung der Cox2-mRNA charakterisiert. Dabei konnte in 3/4 CeCa-Zelllinien

und in 3/8 MaCa-Zelllinien eine Expression nachgewiesen werden, die in CeCa-Zellen tendenziell höher war als in MaCa-Zellen (s. Abb. 3.4).

Im weiteren Verlauf musste überprüft werden, inwieweit die Cox2-Promotor-Aktivität im Kontext des adenoviralen Vektors eventuell von der zellulären Situation, d.h. der endogenen Cox2-Expression, abweicht.

So ist die Aktivität eines Promotors unter anderem abhängig von distalen Regulatoren, die bei der Insertion der Promotorsequenz in das Virusgenom verloren gehen. Diese sogenannten cis-Elemente können die Transkription des jeweiligen Gens verstärken (*Enhancer*) oder verringern (*Silencer*).

In der Nukleotidsequenz bis -1,69 kb vor dem Transkriptionsstartpunkt des humanen Cox2-Gens wurden tatsächlich einige putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie eine CArG-Box, NF-IL6, PEA-1, myb, GATA-1, *xenobiotic response element*, cAMP response element (CRE), NF-κB, PEA-3, Sp-1 und eine TATA-Box identifiziert (Kosaka et al., 1994) (siehe auch Abb. 4.1). Überdies wurde ein TPA-response element (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) im ersten Intron gefunden, das möglicherweise ebenfalls in der Aktivierung der Cox2-Transkription fungiert.

Die Cox2-Promotor-Aktivität könnte außerdem durch den Ad5 E1A-Enhancer beeinflusst werden, der in der upstream-Region des E1-Gens liegt (Nt 1-353), und aufgrund seiner Überlappung mit dem adenoviralen Verpackungssignal nicht deletiert werden kann. Nettelbeck et al. vermuten, dass der Einfluss des E1A-Enhancers davon abhängt, welcher heterologe Promotor im Einzelfall eingesetzt wird und welche

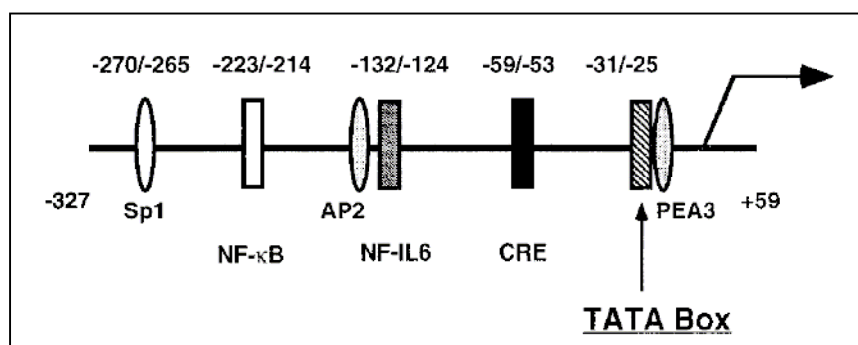


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der 5'-flankierenden Sequenz des humanen Cox2-Gens
Putative cis-Elemente in der Region -327 bis +59 relativ zum Startpunkt der Transkription +1.
(Quelle: Inoue et al., 1995)

Transkriptionsfaktoren an ihm gebunden werden (Nettelbeck et al., 2002). Dies wurde durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt, die speziell den Einfluss der E1A-UAS (*upstream activating sequence*) auf den Cox2-Promotor analysierte (Hoffmann et al., 2005). Dabei wurde die Cox2-Promotoraktivität durch die entsprechende adenovirale Sequenz um bis zu 146% gesteigert.

Des Weiteren ist in einigen Fällen ausgehend von einer Transkriptionsinitiation im linken ITR (*inverted terminal repeat*) des adenoviralen Genoms eine so genannte *read-through transcription* beobachtet worden (Yamamoto et al., 2003a; Hatfield et al., 1991). Diese führte in einigen Fällen zum Verlust der Spezifität des in die E1-Region inkorporierten heterologen Promotors. Überdies enthält die 103 bp lange Ad5 LITR Sequenz sowohl einen Replikationsursprung (*origin of replication*) als auch multiple Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie SP1, ATF NFIII/OTF-1 und NFII/CTF, die die Transkription zellulärer und viraler Gene regulieren (Hatfield et al., 1993; Hatfield et al., 1991; Miralles et al., 1989).

Aus diesen Gründen ist es wichtig, die Aktivität des Cox2-Promotors im adenoviralen Kontext zu evaluieren. Diese konnte mittels Reporter-gen-Assays in allen getesteten CeCa- und MaCa-Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. 3.6). Die Cox2-Promotoraktivität der CeCa-Zellen lag hierbei, in Übereinstimmung mit den Daten der Cox2-Genexpression (RT-PCR), über den Werten der getesteten MaCa-Zellen.

In vitro Daten zur onkolytischen Potenz der Ad5/3-Cox2-CRAds zeigten den Nutzen des Cox2-Promotors in der transkriptionellen Steuerung der E1A-Genexpression bzw. Virusreplikation im Rahmen der Virotherapie (s. Abb. 3.9 bis 3.16). In allen getesteten Zervix-, Ovarial- und Mammakarzinomzellen konnte durch CRAd-Infektion eine effiziente Onkolyse induziert werden. Im Gegensatz dazu verursachten CRAds in gesunden Kontrollzellen keine (primäre Hepatozyten) oder nur eine deutlich reduzierte Toxizität (Mammaepithelzellen). Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays belegen also den Erhalt der Cox2-Promotor-Spezifität im adenoviralen Kontext. Somit ist der humane Cox2-Promotor geeignet, die Tumorspezifität der CRAd-Therapie zu erhöhen.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays lassen keine exakten Rückschlüsse auf den konkreten Beitrag einerseits der Cox2-Promotorkontrolle und andererseits der 5/3-Kapsidmodifikation zur Tumorspezifität zu. Beispielsweise konnten zwar in allen

getesteten CeCa-Zelllinien durch den Einsatz von Cox2-CRAds onkolytische Effekte induziert werden. Nichtsdestotrotz scheint die Effizienz der Cox2-CRAds in CeCa-Zellen in Relation zu den OvCa- und MaCa-Daten aber eher gering ausgeprägt, trotz der vergleichsweise hohen Cox2-Genexpression und –Promotoraktivität. In C33A-Zellen ist dies möglicherweise auf eine geringe Expression des Ad3-Rezeptors zurückzuführen, wenn man die sehr starke Onkolyse durch CAR-abhängiges Ad5 Wildtyp Virus in Betracht zieht. Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass C33A das geringste *Infectivity Enhancement* aller vier CeCa-Zelllinien aufwies.

In den restlichen CeCa-Zelllinien lässt die ähnliche Effizienz von Ad5Wt und Positivkontrolle Ad5/3Δ24 darauf schließen, dass der adenovirale E1-Promotor hier eine stärkere Aktivität aufweist als beide Cox2-Promotorvarianten. Die höchsten Lyseraten zeigten CaSki-Zellen, die in dem vorangegangenen Experiment wiederum das größte *Infectivity Enhancement* zeigten. Genauere Daten zur Spezifität des Cox2-Promotors könnten durch eine Analyse der E1A Expression gewonnen werden.

Die direkte Korrelation zwischen Zelllyse und Virusreplikation in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle konnte durch zwei unabhängige Methoden demonstriert werden: Mittels Real-Time PCR und biologischem Titertest (*tissue culture infectious dose 50*, TCID₅₀) wurde der Verlauf der adenoviralen Replikation über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen direkt gemessen und sichtbar gemacht. Der Vorteil der Real-Time PCR liegt in der hohen Genauigkeit der Messung und der guten Reproduzierbarkeit. Da durch die Quantifizierung der adenoviralen E4-Gensequenz auch defekte Viruspartikel erfasst werden, war es jedoch wichtig, die Ergebnisse mit einem funktionellen Test zu untermauern. Der TCID₅₀-Test basiert auf der Entwicklung und Auswertung des zytopathischen Effektes und ist daher besonders geeignet, den rein funktionellen Virustiter zu messen.

Die Ergebnisse beider Experimente demonstrieren, dass die Produktion viraler Partikel tatsächlich in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle erfolgt. Ad5/3cox2LΔ24 repliziert in Cox2-positiven OvCa-Zellen deutlich effizienter als die Positivkontrolle Ad5/3Δ24, während die Replikation in Cox2-negativen BT-474 Zellen geringer oder vergleichbar ist.

Fragen zur optimalen Promotorstärke für die Steuerung onkolytischer Adenoviren sollten durch den Einsatz zweier Cox2-Promotorvarianten geklärt werden. Dazu wurden

zwei Längenvarianten verglichen, eine längere Version (Cox2L, 1554 bp), die als spezifischer gilt, und eine kürzere (Cox2M, 988 bp), die eventuell eine höhere Genexpression vermittelt (Yamamoto et al., 2003b; Yamamoto et al., 2001).

Anhand der MTS-Daten wird deutlich, dass beide Längenvarianten des humanen Cox2-Promotors auch im adenoviralen Kontext eine für die Zelllyse ausreichende Aktivität in den untersuchten Karzinomzellen aufweisen und somit beide eine effiziente Replikation und Zelllyse gewährleisten. Somit scheint die Anhäufung des toxischen viralen E1A-Proteins kein Hindernis für eine effiziente Virusreplikation und Zelllyse darzustellen. Die gegenüber Cox2M leicht höhere Tumorspezifität des Cox2L-Promotors, die bereits zuvor durch Yamamoto et al. postuliert wurde (Yamamoto et al., 2001), konnte hier ebenfalls bestätigt werden. Welche Promotoraktivität letztendlich optimal ist für die Steuerung onkolytischer CRAbs konnte jedoch anhand der gewonnenen Daten nicht abschließend geklärt werden.

4.2 E1A-Mutationen erhöhen die Sicherheit der onkolytischen Virotherapie

Drei Versionen des zentralen adenoviralen Regulationsgens der Replikation E1A wurden eingesetzt: Wildtyp-E1A, eine $\Delta 24$ -Version (24 bp Deletion in der Rb-Bindestelle von E1A, Fueyo et al., 2000) und eine $\Delta 2\Delta 24$ -Version (zusätzliche 3 bp Deletion, durch die die zweite Aminosäure des E1A-Proteins und damit die p300-Bindestelle entfernt wird, Nettelbeck et al., 2002).

Die E1A-mutierten CRAbs exprimieren ein E1A-Protein, das nicht mehr an Rb bzw. p300 binden kann. Diese Bindung stellt aber im Falle von wildtypischem E1A einen Mechanismus dar, durch den beispielsweise die zelluläre DNA-Synthese in ruhenden Zellen induziert wird (Zhang, 1999). Dies wiederum ist eine Voraussetzung für die virale Replikation. Die selektive Vermehrung einer E1A $\Delta 24$ -Mutante in Zellen mit inaktivem Rb-Protein wurde bereits in früheren Studien gezeigt (Fueyo et al., 2000).

Die konstanten Regionen CR1 und CR2 des adenoviralen E1A-Gens sind essentiell für die Induktion des Übergangs der Wirtszelle in die S-Phase bzw. der Schaffung eines für die adenovirale Replikation optimalen Milieus (Zhao et al., 2003). Die Funktion des E1A-Proteins resultiert teilweise aus der Disruption verschiedener inhibitorischer Komplexe zwischen Tumorsuppressorfaktoren wie Rb und der Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, die zu einer deregulierten Expression E2F-abhängiger Gene führt (Cobrinik, 1996). Überdies ist E1A involviert in die Interaktion mit chromatin-modifizierenden Koaktivator-Komplexen, die im Rahmen sowohl der basalen als auch der spezifischen zellulären Transkriptionsmaschinerie eine Rolle spielen (Chan et al., 2001b).

Die Interaktion zwischen E1A und dem Koaktivator p300/CBP (Arany et al., 1995) führt zu einer reduzierten Transkription unterschiedlicher Gene, die beispielsweise am Zellzyklusarrest (Missero et al., 1995) und an der Zelldifferenzierung (Braun et al., 1992) beteiligt sind.

Die zusätzliche E1A-Kontrolle sollte daher in einer höheren Tumorzell-Spezifität resultieren und damit zu einem breiteren therapeutischen Fenster (Differenz der Lyse normaler Zellen im Verhältnis zu Tumorzellen) führen.

Gerade die Rb-Bindestelle des adenoviralen E1A-Proteins ist von großem Interesse in Zusammenhang mit der Erhöhung der klinischen Sicherheit replikationskompetenter Adenoviren. So hat kürzlich eine Arbeitsgruppe 11 im E1A-Gen verschieden mutierte Adenoviren mit unterschiedlichen Deletions- und Substitutionsvarianten der Rb-Bindestelle untersucht und hinsichtlich der Tumorselektivität gute Erfolge erzielt: durch den Einsatz einer entsprechenden E1A(Rb-BS)-E1B-Doppelmutante wurde das Tumorstadium im CeCa-Nacktmäusemodell signifikant inhibiert (Kim et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigt der Vergleich verschiedener E1A-Varianten in Kombination mit dem Cox2-Promotor die Überlegenheit der E1A Δ 24-Einfachmutation gegenüber der E1A Δ 2 Δ 24-Doppelmutante und dem Wildtyp. Im Gegensatz zur Einfachmutation verhindert der Einsatz der Δ 2 Δ 24-Variante in einigen Fällen die Onkolyse maligner Zielzellen, ohne einen deutlichen Sicherheitsvorteil in Bezug auf Normalzellen zu bieten.

Frühere Studien untermauern Spezifität und Effizienz E1A- Δ 24 modifizierter Adenoviren (Lam et al., 2004; Kanerva et al., 2003; Bauerschmitz et al., 2002b; Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000).

Bezüglich der verminderten Replikationsrate mehrfach modifizierter CRAbs stehen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten in Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Balague et al., 2001; Alemany et al., 2000).

Insgesamt lassen die Ergebnisse der MTS-Assays darauf schließen, dass die E1A Δ 2-Mutation hinsichtlich der Spezifität keinen zusätzlichen Nutzen bringt, wohl aber die onkolytische Effizienz beeinträchtigt. So ist für den gentherapeutischen Ansatz die einfache Δ 24-Deletion doppelt E1A-modifizierten Viren vorzuziehen.

4.3 Gezielte Infektion durch transduktionelles Targeting

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden tropismusmodifizierte CRAbs hinsichtlich einer Steigerung der Infektionsrate von gynäkologischen Tumorzellen untersucht. Das transduktionelle Targeting besteht hier in der genetischen Insertion einer alternativen Fiber-Knob-Domäne, die für die initiale Bindung des Viruspartikels an die Zelle verantwortlich ist, in das adenovirale Kapsid. Im Hinblick auf die unterschiedliche Rezeptor-Nutzung demonstrierten Krasnykh et al., dass der native Tropismus des Adenovirus Serotyp 5 durch die Inkorporation der Ad3-Fiber-Knob-Domäne verändert werden kann (Krasnykh et al., 1996). Die Überlegung, die diesem Retargeting der 5/3-CRAbs zum Ad3-Rezeptor im Rahmen onkologischer Behandlungsansätze zu Grunde liegt, basiert auf der Erkenntnis, dass die Expression des primären Ad5-Zellrezeptors CAR im Tumorgewebe häufig stark reduziert ist (Shayakhmetov et al., 2002; Jee et al., 2002). So erreichten Ad5-basierte Vektoren im klinischen Einsatz oft nur geringe Infektionsraten.

Im Gegensatz dazu resultierte der Einsatz der Ad3-Fiber in einer gesteigerten Zytotoxizität von CRAbs in primären Melanomzellen, die mindestens vier Größenordnungen über der des wildtypischen Ad5-Virus lag (Rivera et al., 2004). Eine Verbesserung der Infektionsrate wurde darüber hinaus in Nierenkarzinom- (Haviv et al., 2002) und Plattenepithelkarzinomzellen (Kawakami et al., 2003) festgestellt. In Zusammenhang mit gynäkologischen Krebserkrankungen weisen vorangehende Arbeiten darauf hin, dass die 5/3-Fiberchimerisierung die momentan beste Targetingoption für das OvCa darstellt (Lam et al., 2004; Kanerva et al., 2002a; Kanerva et al., 2002b). So demonstrierten Kanerva et al. im Rahmen einer in vivo Untersuchung 5/3-fibermodifizierter onkolytischer Ad-Vektoren einen gegenüber Ad5Wt- und RGD-inkorporierten Vektoren verbesserten antitumoralen Effekt von Ad5/3 Δ 24, wobei die Ad5/3 vermittelte Toxizität und Biodistribution mit Ad5 vergleichbar war (Kanerva et al., 2003). In Zusammenhang mit der Transduktion CAR-negativer primärer Melanomzellen zeigten Volk et al. die deutliche Überlegenheit der Ad5/3-Fiberchimerisierung: in Relation zur Ad5-Vektor wurde eine 1100fache Erhöhung der Infektionsrate erzielt, die außerdem ebenfalls gegenüber der RGD-Modifikation um den Faktor 30 erhöht war (Volk et al., 2003). Überdies demonstrierten die Autoren die CAR-

Unabhängigkeit der Infektion und die Korrelation der Infektivität Ad5/3-modifizierter Vektoren mit der Expression des Ad3-Rezeptors.

Vigne et al. demonstrierten *in vitro* und *in vivo* eine starke Verminderung des Hepatotropismus Ad5-basierter Vektoren, bei denen sowohl die Ad5 Fiber Shaft- als auch die Knob-Domäne gegen die entsprechenden Motive des Adenovirus Serotyp 3 ausgetauscht wurden (Vigne et al., 2003). So führte die intravenöse Injektion dieser kapsidmodifizierter Vektoren in Mäuse zu einer 10fachen Reduktion der Virusreplikation bzw. Transgenexpression in Leberzellen.

Die Identifizierung des zellulären Ad3-Rezeptors ist bislang nicht abschließend geklärt. Die 51 bekannten Serotypen humaner Adenoviren werden abhängig vom Gewebetropismus und der damit assoziierten Pathologie in die sechs Subgruppen (-genera) A-F unterteilt. Bereits 1995 zeigten Stevenson et al., dass die Knob-Domänen der Serotyp 5 Adenoviren (Subgruppe C) und Serotyp 3 Adenoviren (Subgruppe B1) an unterschiedliche Zellrezeptoren binden (Stevenson et al., 1995). Ad3 ist aufgrund der CAR-unabhängigen Transduktion ein interessanter Vektor für die Gentherapie.

Einige Publikationen verweisen auf CD46 als Rezeptor für Adenoviren der Subgruppe B (Sirena et al., 2004; Gaggar et al., 2003). Das CD46 Membran Kofaktor Protein gehört zu einer Familie von Glykoproteinen und wird ubiquitär exprimiert. Es gilt als Komplement-Inhibitor und könnte Tumorzellen vor der Komplement-vermittelten Immunantwort schützen. CD46 dient auch als Rezeptor für das humane Herpesvirus 6 und das Masernvirus. Ein ubiquitäres Molekül wie CD46 als Rezeptor könnte den breiten Tropismus und die damit verbundene Diversität der durch Gruppe B Adenoviren verursachten Erkrankungen erklären.

Speziell für Ad3 wurden außerdem CD80 und CD86 als Zellrezeptoren vorgeschlagen (Short et al., 2006; Short et al., 2004). CD80 und CD86 sind kostimulatorische Moleküle, die beispielsweise auf maturierten dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert werden und in die Stimulierung der T-Lymphozyten Aktivierung involviert sind. Laut den Autoren liegt hier der erste bekannte Fall vor, in dem ein Virus immunologische akzessorische Moleküle für den Zelleintritt nutzt, möglicherweise auch zur Umgehung des Immunsystems.

Segerman et al. zeigten in Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Adenoviren, dass es einen gemeinsamen Rezeptor für alle Gruppe B Adenoviren gibt (sBAR), sowie

einen spezifischen Rezeptor (sB2AR), der ausschließlich durch Adenoviren der Gruppe B1 wie Ad3 genutzt wird (Segerman et al., 2003). Marttila et al. kommen zu dem Schluss, dass CD46 als Rezeptor für alle Adenoviren der Subgruppe B außer Ad3 und Ad7 dient (Marttila et al., 2005).

So bleibt anzunehmen, dass Ad3 CD46 zumindest nicht als hochaffinen Rezeptor nutzt. In Einklang mit diesen Ergebnissen demonstrierten Ulasov et al. kürzlich eine Steigerung der adenoviralen Gentransfer-Effizienz in Hirntumorzellen, die durch das Targeting zu den CD80 und CD86 Rezeptoren erzielt wurde (Ulasov et al., 2007).

Systematische Analysen zur CD80/CD86 Expression in gynäkologischen Tumoren liegen bislang nicht vor. Ortiz-Sanchez et al. wiesen CD86 (aber nicht CD80) auf der Oberfläche von normalen Keratinozyten des Zervixepithels und HPV-16 positiven intraepithelialen Läsionen nach (Ortiz-Sanchez et al., 2007). Die Überexpression des kostimulatorischen Moleküls B7-H4, ein Mitglied der B7-Familie, zu der auch CD80 und CD86 gehören, wurde außerdem in Zellen des Ovarialkarzinoms (Tringler et al., 2006) und im duktalem und lobulärem Mammakarzinom (Tringler et al., 2005) gezeigt.

Hingegen liegen zur CD46 Expression etliche Daten vor. So wurde der CD46-Status als prognostischer Faktor u.a. für das Mammakarzinom diskutiert: Rushmere et al. konnten eine hohe mRNA- und Protein-Expression von CD46 in Tumorbiopsien von Brustkrebspatientinnen nachweisen (Rushmere et al., 2004). Der CD46-Level korrelierte mit der Expression des Östrogen-Rezeptors (ER) und verschiedenen anderen klinischen, pathologischen und biochemischen Faktoren.

Surowiak et al. konnten in zwei Dritteln aller von ihnen untersuchten OvCa-Biopsien eine Expression von CD46 nachweisen (Surowiak et al., 2006). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die CD46 Expression einen Indikator für eine kürzere Rezidiv-freie Überlebenszeit darstellt bzw. mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist.

Ni et al. zeigten, dass die CD46-Expression in Zervixkarzinomen mit dem Tumorgrad korreliert. Ihre Daten weisen auf einen deutlichen Vorteil des CD46-Targetings gegenüber Ad5-Vektoren in der Behandlung von Tumorerkrankungen (Ni et al., 2006). Insgesamt ist also die prognostische Bedeutung des CD46-Status für gynäkologische Krebserkrankungen in der Literatur gut belegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Vorteil der 5/3-Kapsidmodifikation für die Infektion von Zervix- und Mammakarzinomzellen demonstriert werden: Die

fibermodifizierte Ad5/3-Chimäre erreichte im Vergleich zum Ad5-Vektor eine deutlich verbesserte (bis zu siebenfach erhöhte) Infektionsrate in Zervix- und Mammakarzinomzelllinien (Reporter-gen-Assay, s. Abb. 3.7). In Zytotoxizitäts-Assays konnte zusätzlich die hohe onkolytische Potenz der 5/3-tropismusmodifizierten CRAds in den drei getesteten Tumorentitäten demonstriert werden.

Die verbesserte Infektionsrate, die in vitro erzielt werden konnte, ist jedoch nur bedingt auf die in vivo Situation übertragbar: Aufgrund etlicher Faktoren kann die Rezeptorexpression unter den Bedingungen der Zellkultur von der Situation im Gewebeverband bzw. klinischen Tumoren abweichen (Miller et al., 1998a). So spielen beispielsweise auch das Kulturmedium und die Zelldichte eine Rolle. Auch der Einsatz (passagierter) Zelllinien birgt eine gewisse Problematik hinsichtlich der Interpretation gewonnener Daten, da es infolge klonaler Selektion zu geno- und phänotypischen Veränderungen kommen kann. So sind in der Regel primäre Zellen vorzuziehen, die jedoch aufgrund schwieriger Isolation bzw. Kultivierung und der begrenzten Haltbarkeit nicht immer zur Verfügung stehen.

Eine weitere Möglichkeit, der Situation im zellulären Gewebeverband näher zu kommen, ist die Nutzung dreidimensionaler Zellaggregate, so genannter Sphäroide (Lam et al., 2007). Dabei wird durch die räumliche Anordnung primärer Tumorzellen der Zustand im Tumor simuliert, so dass auch Hinweise zum Ausmaß der Tumorpenetration gewonnen werden können. Trotz der Fortschritte in der Entwicklung derartiger in vitro Methoden bleibt jedoch weiterhin zu beachten, dass keines der neuen Systeme die physiologische Gewebearchitektur menschlichen Gewebes inklusive aller Zelltypen sowie der extrazellulären Matrix adäquat wiedergibt.

Hinsichtlich der präklinischen Evaluierung der Toxizität adenoviraler Vektoren hat sich die *Krumdieck Tissue Slice* Technologie etabliert, bei der dünne Gewebeschnitte von ca. 0,2 µm Dicke über einen Zeitraum von bis zu fünf Tagen in Kultur gehalten werden können (Stoff-Khalili et al., 2006; Kirby et al., 2004; Krumdieck et al., 1980). Ein großer Vorteil liegt hierbei in der Möglichkeit, gesunde Gewebeproben mit Tumorschnitten zu vergleichen. Auf diese Weise konnte bereits anhand von Leberschnitten die Sicherheit eines Cox2-Promotor gesteuerten und Ad5/3-tropismusmodifizierten CRAds belegt werden (Kirby et al., 2004): die Replikationsrate des CRAds war in Hepatozyten im

Vergleich zum Wt-Virus reduziert, in primärem OvCa-Tumorgewebe dagegen vergleichbar.

Insgesamt trägt die gesteigerte Infektionsrate und die selektive Virusreplikation bzw. Onkolyse zu einer Verbesserung der totalen Therapieeffizienz bei.

4.4 Tiermodelle und ihre Limitierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Wirksamkeit Cox2-Promotor gesteuerter und 5/3-kapsidveränderter CRAbs in zwei unabhängigen murinen Tiermodellen belegt werden.

Bei der Xenotransplantation von Karzinomzellen in Nackt- oder SCID-Mäuse handelt es sich um Tumormodelle, die für die Untersuchung neuer Therapieansätze etabliert sind. Nacktmäuse sind aufgrund einer Thymusaplasie nicht in der Lage, immunkompetente T-Lymphozyten zu bilden. Die fehlende zelluläre Immunabwehr ermöglicht das Wachstum von xenograften Tumoren und verhindert ihre Abstoßung. Im Gegensatz zu SCID-Mäusen verfügen Nacktmäuse noch über ein intaktes B-Lymphozyten-System und aktive natürliche Killerzellen.

Der SCID-Mausstamm (*severe combined immunodeficiency*) ist aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation sowohl T- als auch B-Lymphozyten defizient (Bosma et al., 1983). Aufgrund der fehlenden humoralen und zellulären Immunantwort treten in der Regel keinerlei Abstoßungs- oder Entzündungsreaktionen nach der Transplantation humaner Tumorzellen auf.

Die in vivo Daten zeigen deutlich die Wirksamkeit der Virotherapie mit Ad5/3-Cox2-CRAbs: Im subkutanen Ovarialkarzinom-Nacktmausmodell zeichnete sich Ad5/3cox2L Δ 24 durch eine starke Hemmung des Tumorstwachstums aus, die deutlich über dem antitumoralen Effekt des wildtypischen Ad5-Virus (Positivkontrolle), eines replikationsdefizienten Virus (Negativkontrolle) sowie der Gruppe ohne Virusgabe lag.

Um die Situation einer fortgeschrittenen Ovarialkarzinomkrankung in einem orthotopen Tiermodell zu imitieren, wurde bei der zweiten in vivo Untersuchung auf ein SCID-Mausmodell mit intraperitonealen Tumoren zurückgegriffen. Die intratumorale Injektion von Ad5/3cox2L Δ 24, das bereits im subkutanen Modell die beste Wirksamkeit zeigte, erbrachte hierbei eine signifikant höhere Überlebensrate im Vergleich zur Gruppe ohne Virusgabe. Die Werte des Ad5/3-Cox2-CRAds lagen im Bereich der Positivkontrolle Ad5/3 Δ 24. Beide Viren zeigten tendenziell bessere antitumorale Effizienz als das Wildtyp Ad5-Virus, obwohl die Unterschiede hier nicht statistisch signifikant waren.

Die in vivo Ergebnisse veranschaulichen deutlich sowohl die Tumorspezifität als auch die onkolytische Potenz der getesteten CRAds, insbesondere des Cox2L-Promotor gesteuerten und Δ 24-deletierten Ad5/3cox2L Δ 24 Virus.

Die Übertragbarkeit der aus Tierversuchen gewonnenen Daten auf den Menschen ist bislang aufgrund nicht vollständig aufgeklärter Unterschiede problematisch. So ist beispielsweise bekannt, dass die Rezeptorexpression auf murinen Zellen im Vergleich zum Menschen abweichen kann (Bao et al., 2005). Die Expression des für den hier untersuchten Therapieansatz relevanten Adenovirus Gruppe B Rezeptors CD46 erfolgt im Menschen ubiquitär auf nukleären Zellen, in der Maus hingegen ausschließlich in den Testis (Ni et al., 2005). Folglich ist die Verwendung dieser Mausmodelle für die präklinische Testung Ad3-Rezeptor redigierter CRAds limitiert, insbesondere im Hinblick auf potentielle toxische Effekte.

Ein genereller Nachteil immundefizienter Tumormodelle besteht außerdem in der Tatsache, dass der Beitrag bzw. Einfluss des Immunsystems nicht erfasst werden kann. Eine Möglichkeit, den Einfluss der Immunabwehr mit einzubeziehen, besteht in der Verwendung syngener Tumormodelle, bei denen Tumorzellen und Wirt der gleichen Spezies bzw. dem gleichen Stamm zugehören. In syngen Tumormodellen können daher immunkompetente Tiere verwendet und somit Beiträge des Immunsystems studiert werden. Die Identifizierung syngener muriner Tumorzelllinien, die permissiv für die adenovirale Replikation sind, hat die Entwicklung und die präklinische Testung onkolytischer Adenoviren deutlich verbessert (Hallden et al., 2003).

Diese Tumormodelle zusammen mit den traditionellen humanen Xenograft-Systemen wurden benutzt um die erhöhte Selektivität, Distribution und den Anti-Tumor-Effekt eines E1B 19K-deletierten Adenovirus zu demonstrieren (Liu et al., 2004).

Darüber hinaus konnte die Rolle des adenoviralen E3-Proteins bei immunologischen Effekten und der Zytokin-Induktion untersucht werden und wichtige Funktion des E3B-Proteins bei der viralen Genexpression und Replikation identifiziert werden (Wang et al., 2003). Diese Ergebnisse führten letztendlich dazu, dass im Laufe der weiteren Entwicklung adenoviraler Vektoren E3 wieder eingeführt wurde (wie auch bei den vorliegend getesteten CRAds), um eine verbesserte onkolytische Potenz, Virusverteilung und optimale Tumorselektivität zu gewährleisten (Yu et al., 1999).

Aktuell gibt es Bestrebungen, neue Modelle für die Evaluierung gentherapeutischer Behandlungsansätze zu entwickeln.

Toth et al. entwickelten kürzlich ein neues Tumormodell, um speziell die Selektivität, die Immunogenität und die Effizienz onkolytischer Adenoviren zu evaluieren (Toth et al., 2005): Bei der Wollratte (*cotton rat*) handelt es sich um eine Nagetierspezies, die semipermissiv für humane Adenoviren ist. Experimente mit subkutanen Tumoren zeigten eine Hemmung des Tumorwachstums nach intratumoraler Injektion onkolytischer Adenoviren. Durch die Verwendung immunokompetenter Tiere ergibt sich den Autoren zufolge nun die Möglichkeit, Interaktionen zwischen Wirt, Tumor und Ad-Vektor in seiner ganzen Komplexität zu studieren.

Der Einsatz höherer Tiere könnte zu einer besseren Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf den Menschen beitragen. Einen Erfolg erzielten kürzlich Smith et al., die in Zusammenhang mit dem Osteosarkom ein syngenes Testsystem im Hund entwickelten (Smith et al., 2006). Die Studie demonstriert die erste CRAd-Administration in einem höheren („großen“) und immunkompetenten Tier und stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur klinischen Anwendung dar. Das in vivo Experiment ermöglichte die Untersuchung physiologischer Indikatoren für Stress, histologischer Veränderungen und anderer Effekte. Es wurde keine Virus-assoziierte Toxizität beobachtet, so dass die Sicherheit des getesteten CRAds klar belegt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Die onkolytische Virotherapie stellt einen innovativen Behandlungsansatz für Krebserkrankungen dar, die durch klassische Therapieoptionen nicht erreicht werden können. Dabei werden konditional replizierende Adenoviren (CRAds) eingesetzt, die selektiv Tumorzellen infizieren und durch ihre tumorspezifische Replikation zu einer Lyse der malignen Zielzellen unter Schonung des Normalgewebes führen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die umfassende Charakterisierung neuer CRAd-Vektoren, die speziell für die Behandlung des Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinoms entwickelt wurden.

Durch die Kombination dreier Targeting-Strategien (transkriptionelles Targeting, transduktionelles Targeting, tumorspezifische Deletionen im viralen Genom) standen sechs unterschiedliche Ad5/3cox2-CRAds zur Verfügung, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich evaluiert werden konnten. Diese Daten sind zum Teil bereits in eine Publikation für *Molecular Therapy* eingeflossen (Bauerschmitz et al., 2006).

Nachdem die Cox2-Expression in Zervix- und Mammakarzinomzellen nachgewiesen wurde, konnte die Aktivität des tumorspezifischen Cox2-Promotors auch im adenoviralen Kontext gezeigt werden. Somit ist der Cox2-Promotor geeignet für die transkriptionelle Steuerung onkolytischer CRAds.

Die 5/3-Modifikation der Virusfiber führte zu einer deutlichen Steigerung der Infektionsrate von Zervix- und Mammakarzinomzellen. Die untersuchte Kapsidchimärisierung könnte folglich dazu beitragen, die Transduktion von Tumorzellen, die häufig resistent gegenüber einer Infektion durch Ad5 sind, sowie die Tumورpenetration im klinischen Einsatz zu erhöhen.

Ad5/3cox2-CRAds induzierten in vitro effizient die Onkolyse von Zervix-, Mamma- und Ovarialkarzinomzellen, während in gesunden Normalzellen keine oder nur sehr geringe Toxizität auftrat. Mittels einer speziell für diese Fragestellung angepassten Real-Time PCR wurde die Korrelation zwischen Zelllyse und Virusreplikation in Abhängigkeit vom Cox2-Status der Wirtszelle nachgewiesen. Die differentielle Onkolyse als Resultat einer differentiellen Virusreplikation wurde außerdem in einem zweiten, biologischen Virus-Titertest demonstriert.

Die Wirksamkeit ausgewählter Ad5/3cox2-CRAds konnte schließlich in vivo in zwei unabhängigen murinen Tumormodellen bestätigt werden. Dabei wurde (I) in einem Ovarialkarzinom-Nacktmausmodell mit xenotransplantierten subkutanen Tumoren eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und (II) in SCID-Mäusen mit intraperitonealen Tumoren eine deutliche Erhöhung der Überlebensrate demonstriert.

Insgesamt stellen Ad5/3cox2-CRAds, speziell das Virus Ad5/3cox2L Δ 24, viel versprechende Vektoren für die antitumorale Behandlung dar und lassen eine gute Therapieeffizienz und Sicherheit in fortführenden klinischen Studien erwarten.

6. Summary

Oncolytic virotherapy represents an innovative approach to treat cancers resistant to traditional therapy options. For this purpose conditionally replicating adenoviruses (CRAds) have been developed, which selectively infect tumor cells and lead to a lysis of the malignant target cells by tumor-specific replication. Aim of this work was the comprehensive characterization of new CRAd vectors, specifically designed for the treatment of breast, ovarian and cervical carcinoma.

Through combination of three targeting strategies (transcriptional targeting, transductional targeting, tumor-specific deletions in the viral genome) six different Ad5/3cox2-CRAds were available, which could be successfully evaluated in the context of this work. Part of this data has already been published in *Molecular Therapy* (Bauerschmitz et al., 2006).

After the demonstration of Cox2 expression in cervical and breast cancer cells, the activity of the tumor-specific Cox2 promoter in an adenoviral context was shown. Thus the Cox2 promoter is suitable for the transcriptional control of oncolytic CRAds.

5/3-modification of the virus fiber led to a significant increase of the infection rate of cervical and breast cancer cells. The examined capsid chimera could thus contribute to an enhanced transduction of tumor cells, which are frequently resistant to infection by Ad5, and improve tumor penetration in clinical application.

In vitro Ad5/3cox2-CRAds efficiently induced oncolysis of cervical, breast and ovarian cancer cells, while no or only very low toxicity occurred in normal healthy cells.

Correlation between cell lysis and viral replication as a function of Cox2 status of the host cell was proven using a particularly adapted real-time PCR. In addition the differential oncolysis as a result of differential virus replication was demonstrated in a second, biological virus titer test.

In vivo the effectivity of selected Ad5/3cox2-CRAds was finally confirmed in two independent murine tumor models. (I) A significant inhibition of tumor growth in nude mice with xenotransplanted subcutaneous ovarian tumors and (II) a significant increase in the survival rate of SCID mice with intraperitoneal tumors were demonstrated.

Overall, Ad5/3cox2-CRAds, especially Ad5/3cox2L Δ 24, represent promising vectors for anti-tumor treatment and suggest good therapeutic efficiency and safety in clinical trials.

7. Literatur

Addison CL, Hitt M, Kunsken D et al. Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 7):1653-1661.

AdEasy Vector System Application Manual, QBiogene.
<http://www.qbiogene.com/literature/protocols/geneexpression/pdf/m-adeasy.pdf>. 2002.

Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene.* 2005;24:7802-7816.

Aleman R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2000;18:723-7.

Alvarez RD, Curiel DT. A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Human Gene Therapy.* 1997;8:597-613.

Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M et al. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther.* 2000;2:524-530.

Arany Z, Newsome D, Oldread E et al. A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature.* 1995;374:81-84.

Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR et al. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest.* 1993;92:2569-2576.

Balague C, Noya F, Aleman R et al. Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol.* 2001;75:7602-11.

Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:296-306.

Bao Y, Peng W, Verbitsky A et al. Human coxsackie adenovirus receptor (CAR) expression in transgenic mouse prostate tumors enhances adenoviral delivery of genes. *Prostate.* 2005;64:401-407.

Barker SD, Coolidge CJ, Kanerva A et al. The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *J Gene Med.* 2003;5:300-310.

Bauerschmitz GJ, Barker SD, Hemminki A. Adenoviral gene therapy for cancer: From vectors to targeted and replication competent agents (Review). *Int J Oncol.* 2002a;21:1161-74.

Bauerschmitz GJ, Guse K, Kanerva A et al. Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the cox2 promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells. *Mol Ther.* 2006;14:164-174.

Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A et al. Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res.* 2002b;62:1266-70.

- Bell JC, Lichty B, Stojdl D.** Getting oncolytic virus therapies off the ground. *Cancer Cell*. 2003;4:7-11.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G et al.** Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275:1320-3.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L et al.** 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*. 1994;91:8802-8806.
- Bilbao R, Gerolami R, Bralet MP et al.** 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*. 2000;7:657-62.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A et al.** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996;274:373-6.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ.** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 1983;301:527-530.
- Braun T, Bober E, Arnold HH.** Inhibition of muscle differentiation by the adenovirus E1a protein: repression of the transcriptional activating function of the HLH protein Myf-5. *Genes Dev*. 1992;6:888-902.
- Breidenbach M, Rein DT, Everts M et al.** Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther*. 2005;12:187-193.
- Breidenbach M, Rein DT, Schondorf T et al.** A new targeting approach for breast cancer gene therapy using the heparanase promoter. *Cancer Lett*. 2006;240:114-122.
- Breidenbach M, Rein DT, Wang M et al.** Genetic replacement of the adenovirus shaft fiber reduces liver tropism in ovarian cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2004;15:509-18.
- Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY et al.** A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*. 2002;9:553-566.
- Cao Y, Prescott SM.** Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol*. 2002;190:279-286.
- Casado E, Gomez-Navarro J, Yamamoto M et al.** Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications. *Clin Cancer Res*. 2001a;7:2496-504.
- Casado E, Nettelbeck DM, Gomez-Navarro J et al.** Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol*. 2001b;82:229-237.
- Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L et al.** Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol*. 2001a;3:667-674.
- Chan HM, La Thangue NB.** p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*. 2001b;114:2363-2373.
- Chartier C, Degryse E, Gantzer M et al.** Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1996;70:4805-10.

- Chen Y, DeWeese T, Dilley J et al.** CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res.* 2001;61:5453-5460.
- Chung I, Schwartz PE, Crystal RG et al.** Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Therapy.* 1999;6:99-106.
- Cobrinik D.** Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;208:31-61.
- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS et al.** Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:429-434.
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S et al.** In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 1992;256:1550-2.
- Dai Y, Zhang X, Peng Y et al.** The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005;97:96-103.
- Debbas M, White E.** Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 1993;7:546-554.
- Denkert C, Kobel M, Pest S et al.** Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 2002;160:893-903.
- Deutsche Krebsgesellschaft. www.info.krebsgesellschaft.de. 2005.**
- DeWeese TL, van der Poel H, Li S et al.** A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res.* 2001;61:7464-72.
- Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR et al.** An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol.* 1998;72:9706-13.
- Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT.** Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol.* 2002;76:6893-6899.
- Douglas JT, Kim M, Sumerel LA et al.** Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors. *Cancer Res.* 2001;61:813-817.
- Douglas JT, Rogers BE, Rosenfeld ME et al.** Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nature Biotech.* 1996;14:1574-8.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L et al.** Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J.* 1998;12:1063-73.
- Eck SL, Alavi JB, Alavi A et al.** Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Human Gene Therapy.* 1996;7:1465-82.
- Endter C, Dobner T.** Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;273:163-214.

- Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ et al.** Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res.* 1993;53:627-635.
- Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF et al.** Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications. *Br J Cancer.* 2002;87:1145-1152.
- Fontana L, Nuzzo M, Urbanelli L et al.** General strategy for broadening adenovirus tropism. *J Virol.* 2003;77:11094-11104.
- Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R et al.** A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000;19:2-12.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A.** CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med.* 2003;9:1408-1412.
- Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L et al.** Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J Virol.* 1996;70:2116-2123.
- Garber K.** China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:298-300.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., GeKiD mit dem Robert-Koch-Institut (2006). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. www.gekid.de
- Graham FL, Smiley J, Russell WC et al.** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59-74.
- Haisma HJ, Pinedo HM, Rijswijk A et al.** Tumor-specific gene transfer via an adenoviral vector targeted to the pan-carcinoma antigen EpCAM. *Gene Ther.* 1999;6:1469-1474.
- Half E, Tang XM, Gwyn K et al.** Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2002;62:1676-1681.
- Hallden G, Hill R, Wang Y et al.** Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy. *Mol Ther.* 2003;8:412-424.
- Hamada K, Kohno S, Iwamoto M et al.** Identification of the human IAI.3B promoter element and its use in the construction of a replication-selective adenovirus for ovarian cancer therapy. *Cancer Res.* 2003;63:2506-2512.
- Hamid O, Varterasian ML, Wadler S et al.** Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:1498-1504.
- Hasenburg A, Tong XW, Fischer DC et al.** Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy in combination with topotecan for patients with recurrent ovarian cancer: 2.5-year follow-up. *Gynecol Oncol.* 2001;83:549-54.
- Hasenburg A, Tong XW, Rojas-Martinez A et al.** Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:839-44.
- Hashiro G, Loh PC, Yau JT.** The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch Virol.* 1977;54:307-315.

- Hatfield L, Hearing P.** Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology*. 1991;184:265-276.
- The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication in vivo and is functionally redundant with adjacent sequences. *J Virol*. 1993;67:3931-3939.
- Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ et al.** Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*. 2002;76:4612-4620.
- Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A et al.** Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res*. 2002;62:4273-4281.
- Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL et al.** A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9:555-561.
- Heise C, Hermiston T, Johnson L et al.** An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Med*. 2000;6:1134-9.
- Hemminki A, Alvarez RD.** Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs*. 2002;16:77-87.
- Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E et al.** In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Human Gene Therapy*. 1999;10:1239-49.
- Hernandez-Alcoceba R, Pihajla M, Qian D et al.** New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther*. 2002;13:1737-1750.
- Hirschowitz E, Hidalgo G, Doherty D.** Induction of cyclo-oxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells by infection with DeltaE1, DeltaE3 recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther*. 2002;9:81-84.
- Hitt MM, Addison CL, Graham FL.** Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol*. 1997;40:137-206.
- Hoffmann D, Jogler C, Wildner O.** Effects of the Ad5 upstream E1 region and gene products on heterologous promoters. *J Gene Med*. 2005;7:1356-1366.
- Hong SS, Magnusson MK, Henning P et al.** Adenovirus stripping: a versatile method to generate adenovirus vectors with new cell target specificity. *Mol Ther*. 2003;7:692-699.
- Huang Q, Liu D, Majewski P et al.** The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*. 2001;294:870-875.
- Huang TG, Savontaus MJ, Shinozaki K et al.** Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther*. 2003;10:1241-1247.
- Huard J, Lochmuller H, Acsadi G et al.** The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*. 1995;2:107-15.
- Inoue H, Yokoyama C, Hara S et al.** Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem*. 1995;270:24965-24971.

- Jee YS, Lee SG, Lee JC et al.** 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.* 2002;22:2629-2634.
- Kanerva A, Bauerschmitz GJ, Yamamoto M et al.** A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma. *Gene Ther.* 2004a;11:552-559.
- Kanerva A, Hemminki A.** Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer.* 2004b;110:475-480.
- Kanerva A, Mikheeva GV, Krasnykh V et al.** Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2002a;8:275-80.
- Kanerva A, Raki M, Hemminki A.** Gene therapy of gynaecological diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7:1347-1361.
- Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ et al.** Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther.* 2002b;5:695-704.
- Kanerva A, Zinn KR, Chaudhuri TR et al.** Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol Ther.* 2003;8:449-58.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ et al.** Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* 1995;55:2556-2559.
- Kawakami Y, Li H, Lam JT et al.** Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* 2003;63:1262-1269.
- Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I et al.** a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Med.* 2000;6:879-85.
- Kim J, Kim JH, Choi KJ et al.** E1A- and E1B-Double mutant replicating adenovirus elicits enhanced oncolytic and antitumor effects. *Hum Gene Ther.* 2007;18:773-786.
- Kirby TO, Rivera A, Rein D et al.** A novel ex vivo model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8697-8703.
- Kleeff J, Fukahi K, Lopez ME et al.** Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* 2002;9:522-532.
- Koeneman KS, Kao C, Ko SC et al.** Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J Urol.* 2000;18:102-10.
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H et al.** Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem.* 1994;221:889-897.
- Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N et al.** Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibrin. *J Virol.* 2001;75:4176-4183.
- Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT et al.** Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *Journal of Virology.* 1996;70:6839-46.
- Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ.** A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem.* 1980;104:118-123.

Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I et al. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest.* 2000;106:763-71.

Kutchera W, Jones DA, Matsunami N et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4816-4820.

Lam JT, Hemminki A, Kanerva A et al. A three-dimensional assay for measurement of viral-induced oncolysis. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:421-430.

Lam JT, Kanerva A, Bauerschmitz GJ et al. Inter-patient variation in efficacy of five oncolytic adenovirus candidates for ovarian cancer therapy. *J Gene Med.* 2004;6:1333-1342.

Lea JS, Sheets EE, Wenham RM et al. Stage IIB-IVB cervical adenocarcinoma: prognostic factors and survival. *Gynecol Oncol.* 2002;84:115-9.

Lee TW, Matthews DA, Blair GE. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J.* 2005;387:1-15.

Li Y, Yu DC, Chen Y et al. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.* 2001;61:6428-6436.

Lichtenstein DL, Wold WS. Experimental infections of humans with wild-type adenoviruses and with replication-competent adenovirus vectors: replication, safety, and transmission. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:819-829.

Lieber A, He CY, Meuse L et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol.* 1997;71:8798-8807.

Liu TC, Hallden G, Wang Y et al. An E1B-19 kDa gene deletion mutant adenovirus demonstrates tumor necrosis factor-enhanced cancer selectivity and enhanced oncolytic potency. *Mol Ther.* 2004;9:786-803.

Liu TC, Kirn D. Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions. *Cancer Res.* 2007;67:429-432.

Lorence RM, Rood PA, Kelley KW. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1305-1312.

Marttila M, Persson D, Gustafsson D et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol.* 2005;79:14429-14436.

Maxwell IH, Terrell KL, Maxwell F. Autonomous parvovirus vectors. *Methods.* 2002;28:168-181.

Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN et al. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res.* 1998a;58:5738-48.

-----Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res.* 1998b;58:5738-5748.

Miralles VJ, Cortes P, Stone N et al. The adenovirus inverted terminal repeat functions as an enhancer in a cell-free system. *J Biol Chem.* 1989;264:10763-10772.

Missero C, Calautti E, Eckner R et al. Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:5451-5455.

Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 1999;59:4356-4362.

Mulvihill S, Warren R, Venook A et al. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Therapy.* 2001;8:308-315.

Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther.* 2001;8:746-59.

Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C et al. Novel Oncolytic Adenoviruses Targeted to Melanoma: Specific Viral Replication and Cytolysis by Expression of E1A Mutants from the Tyrosinase Enhancer/Promoter. *Cancer Res.* 2002;62:4663-70.

Ni S, Bernt K, Gaggar A et al. Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons. *Hum Gene Ther.* 2005;16:664-677.

Ni S, Gaggar A, Di Paolo N et al. Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:1072-1081.

Nicklin SA, White SJ, Watkins SJ et al. Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation.* 2000;102:231-7.

Nicklin SA, Wu E, Nemerow GR et al. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol Ther.* 2005;12:384-393.

Nieto Y, Cagnoni PJ, Nawaz S et al. Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2000;18:2070-80.

O'Shea CC, Johnson L, Bagus B et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 2004;6:611-623.

Okegawa T, Pong RC, Li Y et al. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* 2001;61:6592-600.

Ortiz-Sanchez E, Chavez-Olmos P, Pina-Sanchez P et al. Expression of the costimulatory molecule CD86, but not CD80, in keratinocytes of normal cervical epithelium and human papillomavirus-16 positive low squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17:571-580.

Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:227-238.

- Peng XY, Won JH, Rutherford T et al.** The use of the L-plastin promoter for adenoviral-mediated, tumor-specific gene expression in ovarian and bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* 2001;61:4405-4413.
- Peng Z.** Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1016-1027.
- Pereboev A, Pereboeva L, Curiel DT.** Phage display of adenovirus type 5 fiber knob as a tool for specific ligand selection and validation. *J Virol.* 2001;75:7107-7113.
- Post DE, Van Meir EG.** A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene.* 2003;22:2065-2072.
- Rancourt C, Rogers BE, Sosnowski BA et al.** Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2455-61.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS et al.** Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80:148-58.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N et al.** A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther.* 2002;13:163-75.
- Reid T, Galanis E, Abbruzzese J et al.** Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther.* 2001;8:1618-26.
- Reid T, Galanis E, Abbruzzese J et al.** Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res.* 2002;62:6070-6079.
- Reid TR, Freeman S, Post L et al.** Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin. *Cancer Gene Ther.* 2005;12:673-681.
- Rein DT, Breidenbach M, Kirby TO et al.** A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1327-1335.
- Reynolds P, Dmitriev I, Curiel D.** 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.* 1999;6:1336-9.
- Ries SJ, Brandts CH.** Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today.* 2004;9:759-768.
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H et al.** Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* 1997;57:1276-1280.
- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J et al.** Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:632-635.

- Rivera AA, Davydova J, Schierer S et al.** Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells. *Gene Ther.* 2004;11:1694-1702.
- Roder G, Keil O, Prisack HB et al.** Novel cGMP liposomal vectors mediate efficient gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:312-7.
- Rommelaere J, Cornelis JJ.** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods.* 1991;33:233-251.
- Rowe WP, Huebner RJ, GILMORE LK et al.** Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;84:570-573.
- Rushmere NK, Knowlden JM, Gee JM et al.** Analysis of the level of mRNA expression of the membrane regulators of complement, CD59, CD55 and CD46, in breast cancer. *Int J Cancer.* 2004;108:930-936.
- Russell WC.** Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81:2573-2604.
- Saban SD, Nepomuceno RR, Gritton LD et al.** CryoEM structure at 9A resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells. *J Mol Biol.* 2005;349:526-537.
- Sandmair AM, Loimas S, Puranen P et al.** Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2000;11:2197-205.
- Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J et al.** Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol.* 2004;22:1389-1397.
- Schuler M, Herrmann R, De Greve JLP et al.** Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: Results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol.* 2001;19:1750-1758.
- Segerman A, Arnberg N, Erikson A et al.** There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J Virol.* 2003;77:1157-1162.
- Shayakhmetov DM, Li ZY, Ni S et al.** Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res.* 2002;62:1063-8.
- Shayakhmetov DM, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G et al.** Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J Virol.* 2000;74:2567-2583.
- Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS et al.** Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology.* 2000;118:487-496.
- Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y et al.** Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* 2004;322:349-359.
- Short JJ, Vasu C, Holterman MJ et al.** Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res.* 2006;122:144-153.
- Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M et al.** The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol.* 2004;78:4454-4462.

- Small EJ, Carducci MA, Burke JM et al.** A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther.* 2006;14:107-117.
- Smith BF, Curiel DT, Ternovoi VV et al.** Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. *Cancer Biother Radiopharm.* 2006;21:601-606.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D et al.** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* 2000;89:2637-45.
- Stallwood Y, Fisher KD, Gallimore PH et al.** Neutralisation of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther.* 2000;7:637-43.
- Stampfer M. Review of the HMEC culture system; www.lbl.gov/mrgs/mindex.html. 2004.
- Steer SA, Moran JM, Maggi LB, Jr. et al.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by macrophages in response to double-stranded RNA and viral infection. *J Immunol.* 2003;170:1070-1076.
- Stevenson SC, Rollence M, Marshall-Neff J et al.** Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J Virol.* 1997;71:4782-4790.
- Stevenson SC, Rollence M, White B et al.** Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol.* 1995;69:2850-2857.
- Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Le LP et al.** Employment of liver tissue slice analysis to assay hepatotoxicity linked to replicative and nonreplicative adenoviral agents. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:606-618.
- Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Nedeljkovic-Kurepa A et al.** Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control. *Breast Cancer Res Treat.* 2007.
- Subbaramaiah K, Dannenberg AJ.** Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res.* 2007;67:3976-3985.
- Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A et al.** CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Res.* 2006;26:4943-4948.
- Takafuji ET, Gaydos JC, Allen RG et al.** Simultaneous administration of live, enteric-coated adenovirus types 4, 7 and 21 vaccines: safety and immunogenicity. *J Infect Dis.* 1979;140:48-53.
- Teh BS, Aguilar-Cordova E, Kernen K et al.** Phase I/II trial evaluating combined radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in the treatment of prostate cancer--a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:605-13.
- The Journal of Gene Medicine.** www.wiley.co.uk/genemed/clinical. 2007.
- Tippetts MT, Varum BC, Lim RW et al.** Tumor promoter-inducible genes are differentially expressed in the developing mouse. *Mol Cell Biol.* 1988;8:4570-2.
- Tomko RP, Xu R, Philipson L.** HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3352-6.

Toth K, Spencer JF, Tollefson AE et al. Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2005;16:139-146.

Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E et al. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther.* 2000;1:195-203.

Tringler B, Liu W, Corral L et al. B7-H4 overexpression in ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2006;100:44-52.

Tringler B, Zhuo S, Pilkington G et al. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1842-1848.

Tumorzentrum München. Manual Maligne Ovarialtumore. 2004.
W.Zuckschwerdt-Verlag GmbH.

Ulasov IV, Rivera AA, Han Y et al. Targeting adenovirus to CD80 and CD86 receptors increases gene transfer efficiency to malignant glioma cells. *J Neurosurg.* 2007;107:617-627.

van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y et al. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther.* 1998;5:451-8.

Vasey PA, Shulman LN, Campos S et al. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20:1562-9.

Vigne E, Dedieu JF, Brie A et al. Genetic manipulations of adenovirus type 5 fiber resulting in liver tropism attenuation. *Gene Ther.* 2003;10:153-162.

Vigne E, Mahfouz I, Dedieu JF et al. RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J Virol.* 1999;73:5156-5161.

Volk AL, Rivera AA, Kanerva A et al. Enhanced Adenovirus Infection of Melanoma Cells by Fiber-Modification: Incorporation of RGD Peptide or Ad5/3 Chimerism. *Cancer Biol Ther.* 2003;2:511-515.

Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist.* 2002;7:46-59.

Wang Y, Hallden G, Hill R et al. E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1328-1335.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993;73:309-319.

Wickham TJ, Roelvink PW, Brough DE et al. Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnology.* 1996a;14:1570-3.

Wickham TJ, Segal DM, Roelvink PW et al. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol.* 1996b;70:6831-6838.

Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer.* 2000;82:1138-1144.

- Wolf JK, Bodurka DC, Gano JB et al.** A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;94:442-448.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S et al.** Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58:4997-5001.
- Wood M, Perrotte P, Onishi E et al.** Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther.* 1999;6:367-72.
- Xia H, Anderson B, Mao Q et al.** Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol.* 2000;74:11359-11366.
- Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y et al.** Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther.* 2001;3:385-94.
- Yamamoto M, Davydova J, Takayama K et al.** Transcription initiation activity of adenovirus left-end sequence in adenovirus vectors with e1 deleted. *J Virol.* 2003a;77:1633-1637.
- Yamamoto M, Davydova J, Wang M et al.** Infectivity enhanced, cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2003b;125:1203-1218.
- Yoshimura R, Sano H, Masuda C et al.** Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer.* 2000;89:589-596.
- Yu DC, Chen Y, Seng M et al.** The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts [published erratum appears in Cancer Res 2000 Feb 15;60(4):1150]. *Cancer Research.* 1999;59:4200-3.
- Zabner J, Chillon M, Grunst T et al.** A chimeric type 2 adenovirus vector with a type 17 fiber enhances gene transfer to human airway epithelia. *J Virol.* 1999;73:8689-8695.
- Zhang WW.** Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy.* 1999;6:113-38.
- Zhao H, Granberg F, Elfineh L et al.** Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol.* 2003;77:11006-11015.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA et al.** Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59:198-204.

8. Abkürzungsverzeichnis

ε	molarer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
μm	Micrometer
AK	Antikörper
A.L.F.	Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer
Abb.	Abbildung
Ad3	Adenovirus des Serotyp 3
Ad5	Adenovirus des Serotyp 5
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CeCa	Zervixkarzinom
CMV	immediate early Promotor des Cytomegalovirus
Cox2	Cyclooxygenase-2
CRAd	konditional replizierendes Adenovirus
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Extinktion
E1A	adenovirales <i>immediate early</i> E1A-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
evtl.	eventuell
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
h	Stunde
HS	Pferde-Serum
HSV-TK	Thymidin-Kinase aus Herpes simplex-Virus
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Luc	Luziferase
MaCa	Mammakarzinom

MDR	multiple drug resistance
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MTS	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-2yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OvCa	Ovarialkarzinom
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	Plaque forming unit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
s.	siehe
SCID	<i>Severe Combined Immune Deficiency</i>
SDS	Natrium-dodecyl-Sulfat
t	Zeit
Taq	Taq-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	tumorspezifischer Promotor
U	Unit (Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
vergl.	vergleiche
VP	Virus Partikel
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.G. Bender danke ich für die Möglichkeit, im molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können und für die Übernahme des Referates dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Wagner danke ich für die Übernahme des Koreferates, das Interesse an meiner Arbeit und deren Vertretung vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

Herrn Dr. D. Niederacher möchte ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine freundliche Unterstützung während meiner Promotionsarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. P. Dall danke ich für die Überlassung dieses spannenden Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Ganz besonders danke ich Herrn Dr. G. Bauerschmitz für zahlreiche wertvolle Anregungen und seine engagierte Unterstützung. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. D. Rein und Frau Dr. Isabell Herrmann für den fachlichen Austausch danken.

Ich danke Herrn Dr. G. Bauerschmitz für die Bereitstellung der Cox2-CRAds, sowie Herrn Prof. D. Curiel für die Bereitstellung der Luc-Adenoviren und Frau Dr. A. Kanerva für die Bereitstellung des Adenovirus Ad5/3 Δ 24.

Frau Dr. Beate Betz danke ich für viele gute Ratschläge und praktische Tipps. Bei Herrn Dr. H.B. Prisack und Herrn Dr. G. Röder aus dem Institut für Onkologische Chemie möchte ich mich ganz herzlich für die stete Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bedanken. Darüber hinaus danke ich Frau Grollig aus dem morphologischen Labor der Frauenklinik für ihre experimentelle Unterstützung.

Ich danke allen Laborkolleginnen und –kollegen, insbesondere Torsten, Isabell, Nora, Dagmar, Gosia, Mareike, Heike, Britta, Marius, Nicole und Ellen, für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die täglichen kulinarischen Abenteuer in der Mensa.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre umfassende und liebevolle Unterstützung während des Studium und der Promotion.

10. Erklärung

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

Düsseldorf, den 25.03.2008

Artur Menzel