

Aus der Charité Centrum für Chirurgische Medizin  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

**GENTHERAPIE DURCH EINEN  
RGD-MOTIV MODIFIZIERTEN, HUMANEN TELOMERASE REVERSE  
TRANSKRIPTASE REGULIERTEN, TUMOR NEKROSE FAKTOR-VERWANDTEN  
APOPTOSE-INDUZIERENDEN LIGAND EXPRIMIERENDEN ADENOVIRALEN  
VEKTOR**

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Charité

Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dietmar Jacob

geboren am 13.08.1970 in Bremen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 21.04.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Martin Schilling, Homburg/Saar

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Utz Settmacher, Jena

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Gentherapie</b>	<b>6</b>
1.1.1	Historie der Gentherapie	8
1.1.2	Vektoren	11
1.1.2.1	Nicht-virale Vektoren	12
1.1.2.1.1	Physikalischer nicht-viraler Gentransfer	13
1.1.2.1.2	Chemischer nicht-viraler Gentransfer	14
1.1.2.2	Virale Vektoren	16
1.1.2.2.1	RNS Viren	17
1.1.2.2.2	DNS Viren	18
1.1.3	Promotoren	24
1.1.3.1	Verstärkungsmechanismus	25
1.1.3.2	Humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)	26
1.1.4	Therapieresistenz adenoviraler Vektoren	27
1.1.5	Therapieansätze bei malignen Erkrankungen	28
1.1.5.1	Immunologische Therapieansätze	29
1.1.5.2	Molekulare Therapieansätze	30
1.1.5.2.1	Tumorsuppressorgene	30
1.1.5.2.2	Suizidgene	30
1.1.5.2.3	Anti Onkogene	31
1.1.5.2.4	Proapoptotische Gene	31
1.1.5.2.4.1	Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (TRAIL)	31
<b>1.2</b>	<b>Beschreibung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD</b>	<b>32</b>
<b>1.3</b>	<b>Tumormodelle in der Nacktmaus</b>	<b>33</b>
1.3.1	Problematik subkutaner Tumormodelle	34
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>37</b>
2.1.1	Tumorzelllinien	37
2.1.2	Mesenchymale Stammzellen	37
<b>2.2</b>	<b>Gemcitabin</b>	<b>38</b>
<b>2.3</b>	<b>Konstruktion und Charakteristik von Ad/TRAIL-F/RGD</b>	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>Zellproliferationstest (XTT)</b>	<b>42</b>
2.4.1	Testprinzip	42
2.4.2	Testung der Tumorzelllinien	43
<b>2.5</b>	<b>Kombinationsindex (CI)</b>	<b>44</b>
<b>2.6</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>45</b>
2.6.1	Testprinzip der Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid (PI)	45
2.6.2	Testung der Tumorzelllinien	46
<b>2.6.</b>	<b>Western Blot-Analyse</b>	<b>46</b>
2.6.1	Testprinzip	46
2.6.2	TRAIL und Kaspase-8 Expression	47
<b>2.7</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>49</b>

<b>2.8</b>	<b>Entwicklung von Tumormodellen in Nacktmäusen .....</b>	<b>50</b>
2.8.1	Präparation der Tumorzellen .....	50
2.8.2	Vorbereitung der Nacktmäuse .....	52
2.8.3	Vorbereitung der Tumorzellinjektion .....	53
2.8.4	Anästhesie der Nacktmäuse .....	54
2.8.5	Prozeduren .....	54
2.8.6	Orthotope chirurgische Tumorimplantation.....	55
2.8.6.1	Allgemein .....	55
2.8.6.2	Experiment I.....	56
2.8.7	Direkte Leberinjektion von Tumorzellen .....	58
2.8.7.1	Allgemein .....	58
2.8.7.2	Experiment II.....	59
2.8.8	Direkte Pankreasinjektion von Tumorzellen .....	60
2.8.9	Portalveneninjektion von Tumorzellen.....	61
2.8.10	Schwanzveneninjektion von Tumorzellen.....	63
<b>2.9</b>	<b>Mikro-Computertomografie .....</b>	<b>64</b>
<b>2.10</b>	<b>Messung der Leberenzyme ASAT und ALAT .....</b>	<b>64</b>
<b>2.11</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse (Experiment I) .....</b>	<b>66</b>
3.1.1	Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD unter dem Lichtmikroskop.....	66
3.1.2	Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD im XTT-Test.....	67
3.1.2.1	Pankreaskarzinomzelllinien .....	68
3.1.2.2	Hepatozelluläre Karzinomzelllinien.....	69
3.1.2.3	Kolonkarzinomzelllinien.....	70
3.1.2.4	Lungenkarzinomzelllinien .....	72
3.1.3	Vergleich des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD mit dem Vorgängervektor Ad/gTRAIL .....	73
3.1.4	Apoptoseinduktion durch Ad/TRAIL-F/RGD in der Durchflusszytometrie.....	75
3.1.4.1	Pankreaskarzinomzelllinien .....	76
3.1.4.2	Hepatozelluläre Karzinomzelllinien.....	77
3.1.4.3	Kolonkarzinomzelllinien.....	78
3.1.4.4	Lungenkarzinomzelllinien .....	79
3.1.5	Wirkung von Ad/TRAIL-F/RGD auf mesenchymale Stammzellen.....	80
3.1.5.1	Keine Transduktion mesenchymaler Stammzellen durch Ad/TRAIL-F/RGD.....	80
3.1.5.2	Keine Apoptoseinduktion in mesenchymalen Stammzellen durch Ad/TRAIL-F/RGD .....	83
3.1.6	Kaspase-8-Aktivierung und TRAIL-Expression im Western Blot.....	83
3.1.7	Ad/TRAIL-F/RGD induziert eine Tumorstillstandshemmung <i>in vivo</i> .....	85
3.1.7.1	Tumornachweis in der Mikrocomputertomografie .....	85
3.1.7.2	Ad/TRAIL-F/RGD führt zu einem signifikant reduzierten Tumorstillstand orthotoper Pankreastumoren <i>in vivo</i> .....	86
3.1.7.3	Ad/TRAIL-F/RGD führt zu großen intratumoralen Nekrosen.....	89
3.1.7.4	Ad/TRAIL-F/RGD zeigt keine Anzeichen einer Lebertoxizität <i>in vivo</i> .....	90
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse (Experiment II) .....</b>	<b>91</b>
3.2.1	Deutlich gesteigerter zelltötender Effekt von Gemcitabin in der Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD unter dem Lichtmikroskop .....	91

3.2.2	Nachweis eines Synergismus in der Kombinationstherapie zwischen Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin durch den Kombinationsindex	93
3.2.3	Nachweis eines deutlich erhöhten zelltötenden Effektes der Kombinationstherapie im XTT-Test	95
3.2.4	Nachweis einer synergistisch erhöhten Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie	96
3.2.5	Suppression des Tumorwachstums in der Leber durch die systemische Applikation von Ad/TRAIL-F/RGD und Verstärkung des Effektes durch die Kombinationstherapie mit Gemcitabin	97
3.2.6	Keine Lebertoxizität durch Gemcitabin alleine und in Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD	101
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	103
<b>4 Diskussion</b>		<b>106</b>
4.1	<b>Experiment I</b>	<b>106</b>
4.2	<b>Experiment II</b>	<b>110</b>
4.3	<b>Aussichten</b>	<b>114</b>
4.4	<b>Gentherapie in klinischen Studien 1989-2005</b>	<b>117</b>
4.4.1	Pankreaskarzinom	121
4.4.2	Hepatozelluläres Karzinom	122
4.4.3	Kolorektale Tumoren	123
4.4.3.1	Kolonkarzinom	123
4.4.3.2	Kolorektale Lebermetastasen	124
4.5	<b>Nachwort</b>	<b>127</b>
<b>5 Literatur</b>		<b>129</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>		<b>147</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>149</b>
<b>8 Danksagung</b>		<b>151</b>

## 1 Einleitung

Trotz großer Fortschritte auf den Gebieten der Viszeralchirurgie und Onkologie in den vergangenen Dekaden ist eine erhöhte Anzahl solider Tumoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht resektabel und dadurch nur noch palliativ behandelbar. So betreffen z.B. die gegenwärtig vorhandenen Palliativkonzepte bei den nicht operablen Hepatozellulären Karzinomen (HCC) und intrahepatischen Cholangiozellulären Karzinomen (CCC) nur eine lokale Tumorbehandlung wie Radiofrequenzablation und Laser-Induzierte Thermoablation, wobei diese Verfahren nur zur Behandlung kleinerer Tumoren einsetzbar sind. Die Chemoembolisation hat bisher keinen Effekt auf das Langzeitüberleben gezeigt, und eine Erfolgversprechende Radio/Chemotherapie ist gegenwärtig noch nicht etabliert (1).

Ebenso problematisch ist die Behandlung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas, welches in den westlichen Industrieländern vermehrt auftritt und von denen sich nur 10% bis 15% zum Zeitpunkt der Diagnose in einem resektablen Stadium befinden (2). Zusätzlich beträgt selbst nach erfolgreicher Resektion das 5-Jahres-Überleben der Patienten nur 10% bis 30% (3). Bei nicht resektablen Tumoren liegt das 1-Jahr-Überleben zusammengefasst in allen Stadien bei 19% (4). Ursprünglich haben diese soliden Tumoren als chemoresistent gegolten (5), jedoch hat die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin ein signifikant erhöhtes Überleben und eine verbesserte Lebensqualität im Vergleich zu keiner chemotherapeutischen Behandlung gezeigt (6-8). Dennoch ist das Überleben im Median, wie eine der größten Studien mit 3000 Patienten betreffend Gemcitabin in der Behandlung des Pankreaskarzinoms gezeigt hat, nur um 5 Monate verlängert, verglichen mit keiner Behandlung.

Daher werden bei den nicht resektablen bzw. metastasierten Tumoren neue Therapiekonzepte dringend gesucht und gentherapeutische Ansätze zur Tumorbehandlung könnten dabei eine Alternative darstellen. In der tumorassoziierten Gentherapie sind dieses insbesondere die Einbringung proapoptotischer Gene, die Immunomodulation oder eine Enzym-Prodrug-Therapie.

### **1.1 Gentherapie**

Gentherapie ist das gezielte Einbringen eines funktionsfähigen Gens in Körperzellen oder –Gewebe mit therapeutischer Zielstellung (Gentransfer). Dabei ist der Ansatz der Therapie entweder eine defekte Zellfunktion wiederherzustellen (z.B. bei der Substitutionstherapie monogenetischer Erkrankungen), oder aber der Zelle eine zusätzliche therapeutische Funktion zu vermitteln (z.B. bei der Übertragung toxischer/pro-apoptotischer Gene). Daraus resultiert, dass prinzipiell alle Erkrankungen, bei denen Proteine eine entscheidende pathogenetische Rolle spielen oder eine therapeutische Funktion haben, Ziel einer gentherapeutischen Behandlung sein können (9). Der Gentransport kann dabei mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt werden.

1. *In vitro*: Die Zielzellen werden vom eigentlichen Organismus isoliert und die Transfektion des genetischen Materials und deren Folgen werden nur in der Zellkultur durchgeführt bzw. analysiert.

2. *In vivo*: Der nicht-virale oder virale Vektor wird mit dem therapeutischen Gen verbunden und danach als nun rekombinierter Vektor direkt verabreicht. Dieses geschieht entweder als direkte (z.B. intratumorale) oder systemische Injektion.
3. *Ex vivo*: Zellen oder Gewebe werden dem Körper entnommen, im Labor kultiviert und mit dem zu therapierenden Gen verbunden und multipliziert. Danach werden die genetisch veränderten Zellen wieder dem Ursprungsort zugeführt.

Der Prozess des Gentransportes und der nachfolgenden Genexpression wird als Transduktion bezeichnet. Um das Gen in die Zielzelle zu transportieren werden in den meisten Fällen so genannte Vektoren benötigt, die nicht-viraler oder viraler Natur sein können. Bei den nicht-viralen Vektoren wird „nackte“ DNS z.B. mit Hilfe von Injektionen oder Liposomen in die Zelle transportiert. Obwohl diese Vektoren in einer großen Anzahl produziert werden können, und nur eine geringe Zelltoxizität aufweisen bzw. eine Immunreaktion hervorrufen, ist die Effektivität des Gentransfers gegenwärtig noch unzureichend. Dagegen weisen virale Vektoren, bestehend aus RNS oder DNS Genomen (Gesamtheit der Gene eines Organismus), eine deutlich höhere Effizienz auf und werden in den meisten gentherapeutischen Studien verwendet. Ein Nachteil sind die in klinischen Studien nachgewiesenen Nebenwirkungen, die bisher zu einem Todesfall geführt haben.

### **1.1.1 Historie der Gentherapie**

1966-1982

Die Überlegung des Transfers rekombinanter DNS zur Therapie von Krankheiten war erst durch die Erkenntnis von Avery et al. möglich geworden, dass Nukleinsäuren genetische Information vermitteln und durch die Strukturaufklärung der DNS durch Watson und Crick 1953. Des Weiteren war die Entschlüsselung des genetischen Kodes durch den ersten Nachweis einer Übertragung genetischer Information mittels Viren auf Zellen durch Zinder und Lederberg 1952 für die Entwicklung bedeutsam (9). Die nachweislich erste Diskussion über die Möglichkeit einer Therapie durch die Modifikation humaner Gene wurde vor 40 Jahren auf dem Symposium „Reflections on Research and the Future of Medicine“ an der Columbia Universität in New York im Mai 1966 geführt. Joshua Lederberg und Edward Tatum legten dabei die wesentlichen Grundsätze fest, die später als Gentherapie bezeichnet wurden (10).

Es folgte 1970 durch Stanfield Rogers der erste klinische Versuch an zwei Mädchen mit der angeborenen Stoffwechselstörung Argininämie, der erfolglos blieb. Dabei sollte durch die Verabreichung des Papilloma Virus, welches ein Gen beinhaltet, das das Serum-Arginin senkt, der Arginase-Mangel ausgeglichen werden. Nennenswerte Fortschritte in der Methode des Gentransfers gab es allerdings erst in den späten 1970er Jahren, als verbesserte Transfektionstechniken und Selektionsmethoden in der Zellkultur mit den Fortschritten der rekombinanten DNS-Technologie verbunden werden konnten. Dadurch gelang es in größerem Maßstab verschiedenste Gene in Säugetierzellen einzubringen (9).

Erst gegen Ende der 1970er Jahre folgten mehrere wichtige Einzelschritte als Basis für eine Gentherapie. So konnten Wigler et al. 1977 ein Thymidinkinase (TK)



exprimierendes Gen erfolgreich in Mäusezellen einschleusen (11) und 1979 erfolgte der erste Transfer einer Kopie eines funktionierenden Gens (TK) in Mauszellen, wodurch der bestehende Gendefekt therapiert wurde (12). Auf Grund der Frage nach einem klinischen Nutzen der neuen Therapie und der daraus entstehenden ethischen Bedenken, griffen Anderson und Fletcher diese Thematik auf und veröffentlichten Ihre Diskussion über die ethischen Bedenken in der Gentherapie 1980 im „New England Journal of Medicine“ (13).

#### 1983-1989

Für die Schaffung realistischer Möglichkeiten zur Gentherapie waren in erster Linie die Entwicklung viraler Vektoren und entsprechender Verpackungszelllinien zur Herstellung dieser Vektoren eine Voraussetzung (9). Der Aufschwung der Gentherapie begann 1983, als mehrere Wissenschaftler mit einem retroviralen Vektor funktionelle Gene in Maus-Knochenmarkzellen und das Enzym Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT) in B-Lymphoblasten transferierten. Es folgten die Entwicklung einer helferfreien Retrovirus Verpackungszelllinie durch Howard Temin mit dem Avian Retrovirus und durch Richard Mulligan mit dem Mäuse Retrovirus (10). 1984 entwickelten Gluzman et al. den bisher erfolgreichsten Vektor für den Gentransport, das Adenovirus und Carter et al. sowie Muzyczka et al. führten das Adeno-assoziierte Virus ein (10). Der erste Beweis einer *in vivo* Expression eines transferierten Gens in einem Mausmodell gelang Eglitis et al. 1985 mit dem Retrovirus N2, der das *NeoR* Markergen beinhaltet (14). Es folgte 1989 durch Rosenberg et al. die erste klinische Studie der Gentherapie, wobei der retrovirale Vektor das Markergen *NeoR* trug, um genetisch tumorinfiltrierende Lymphozyten bei Melanom Patienten zu markieren (15).

1990-2000

Das erste gentherapeutische Journal, „Human Gene Therapy“, wurde 1990 gegründet und im selben Jahr erfolgte der erste genehmigte gentherapeutische Versuch in den USA. Dabei wurden einem vier Jahre alten Mädchen mit Adenosin-Deaminase-Mangel (ADA) und einer daraus resultierenden schweren Immunschwäche ihre eigenen T-Lymphozyten injiziert. Vorher wurden diese *ex vivo* mit einem, das normale ADA-Gen tragenden, Retrovirus behandelt. Obwohl die Patientin danach vermehrt ADA synthetisierte, blieb es jedoch unklar, ob die Gentherapie oder die Begleittherapie für diesen Effekt verantwortlich war. Es folgte 1992 durch Wilson et al. der erste Versuch zur Behandlung eines parenchymatösen Organs (Leber) bei familiärer Hypercholesterinämie. Dabei wurden *ex vivo* mit einem Retrovirus behandelte autologe Hepatozyten, die LDLr cDNS beinhalteten, mittels einer Portalveneninfusion reinjiziert (16). Zusätzlich wurde im selben Jahr der erste nicht-virale klinische Gentransfer durch Nabel et al. durchgeführt, wobei DNS/Liposomen Komplexe (das DNS Plasmid trug das *HLA-B7*-Gen) direkt in HLA-B7<sup>+</sup> Tumoren injiziert wurden (10).

1995 folgte die erste klinische Studie mit einem adenoviralen Vektor bei Patienten mit Zystischer Fibrose (17) und die erste Studie an Neugeborenen mit ADA-Mangel, wobei deren Stammzellen aus dem Nabelvenenblut, welche ein funktionierendes ADA-Gen besitzen, via einem retroviralen Vektor injiziert wurden (18).

Mitte der 1990er Jahre wurde die erste Phase-III-Studie durchgeführt, wobei ein retroviraler Vektor das *Herpes Simplex TK*-Gen zur Behandlung von Hirntumoren beinhaltete. Einen Rückschritt erlitt die Gentherapie 1999 durch den Tod des 18 jährigen Jesse Gelsinger, der nach der intrahepatischen Infusion eines adenoviralen Vektor als Teil eines Phase-I/II-Toxizitätsversuches an einem durch das Virus verursachten

„Systemischen inflammatorischen Response-Syndrom“ (SIRS) verstarb. Bis heute ist er der einzige Patient, der als direkte Folge eines gentherapeutischen Versuches verstarb. Von der ersten gentherapeutischen Heilung wurde im Jahre 2000 berichtet, als Fischer et al. Kinder mit der Immunschwäche SCID-X1 durch die retrovirale Behandlung der eigenen Stammzellen mit dem  $\gamma$ c-Gen erfolgreich therapierten (19). Allerdings wurde der anfängliche Erfolg durch die Ausbildung eines Leukämie ähnlichen Syndroms bei 2 von 10 Kindern nach ca. 30 Monaten getrübt (10). Es hat sich danach in mehreren Experimenten gezeigt, dass das  $\gamma$ c-Gen selbst als ein kooperierender Faktor in dem Transformationsprozess integriert ist, wenn es von einem retroviralen Promoter exprimiert wird (10). Von der ersten erfolgreichen Tumorthherapie wurde 2000 in einer Phase-II-Studie bei rezidivierenden Pharynx Adenokarzinomen berichtet, die mit einer Kombination aus einem onkolytischen Adenovirus und Chemotherapie behandelt wurden (20).

### **1.1.2 Vektoren**

Die Problematik der Gentherapie ist, dass DNS nicht unverpackt appliziert werden kann, da sie nur zu einem geringen Teil von Zellen aufgenommen wird und eine rasche Inaktivierung durch Nukleasen des Blutes eintritt. Daher sind Vektorsysteme als Transportvehikel für DNS in eine Zelle (Gentransfer) zur Steigerung der Effizienz des Gentransfers und zum Schutz der DNS vor enzymatischen Abbau entwickelt worden. Durch Einbau eines fremden Gens in den Vektor wird ein rekombiniertes DNS-Molekül konstruiert, welches sich in der Zelle repliziert (9). Idealbedingungen für einen erfolgreichen Vektor in der Gentherapie sind:

- Verfügbarkeit in hohen Konzentrationen
- Herstellbarkeit in großen Mengen
- Zelltypspezifischer Gentransfer (besonders *in vivo*)
- Effektive Übertragung von DNS in Zellen
- Regulierbare und ausreichende Expression des Fremdgens
- Keine Immunreaktion
- Keine unerwünschten Nebenwirkungen
- Keine Produktion von Wildtypviren (falls viraler Vektor)
- Gentransfer in sich nicht teilende Zellen
- Hohe Aufnahmekapazität von Genen

Gegenwärtig erfüllt noch keiner der in der klinischen Gentherapie verwendeten Vektoren alle genannten Voraussetzungen. Die am häufigsten verwendeten Vektoren lassen sich in die Hauptgruppen der nicht-viralen und viralen Vektoren einteilen.

#### **1.1.2.1 Nicht-virale Vektoren**

Diese Vektoren lassen sich je nach der Art des Transfers in physikalische und chemische Gruppen unterscheiden. Ihre Effizienz ist gegenwärtig noch nicht so hoch wie die der viralen Vektoren. Vorteilhaft sind dagegen keine bzw. nur sehr geringe Nebenwirkungen, keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen zur Herstellung und Therapie und es können Antikörper und RNS transportiert werden (21).

### 1.1.2.1.1 Physikalischer nicht-viraler Gentransfer

Ein großer Schwachpunkt der physikalischen Verfahren ist die geringe Transfereffizienz aufgrund der geringen Eindringtiefe. Solide Tumoren lassen sich dadurch kaum behandeln. Ein Schwerpunkt dieser Verfahren könnte aber in Haut- und Muskeltumoren liegen, die nur einer relativ geringen Eindringtiefe benötigen.

#### *Mikroinjektion*

Bei der Mikroinjektion wird die DNS als Plasmid, ssDNS (einzelsträngige DNS) oder dsDNS (doppelsträngige DNS) direkt in den Zellkern bzw. in die Zelle injiziert. Das Verfahren ist sowohl apparativ sehr aufwendig als auch technisch sehr anspruchsvoll.

#### *Elektroporation*

Bei dieser Transfektionsmethode werden die Zellmembranen durch einen kurzen elektrischen Puls vorübergehend permeabel gemacht. Auf diese Weise kann im Medium vorhandene, zellfremde DNS durch Diffusion in die Zellen gelangen. Ein Teil der DNS gelangt bis in den Zellkern und wird dort exprimiert. Dabei wird eine 10 bis 100fach erhöhte Genexpression gegenüber der nackten DNS beschrieben. Dieses Verfahren ist *in vitro* sehr populär und wird bei *in vivo* Versuchen hauptsächlich in der Therapie von Haut- und Muskelerkrankungen angewandt. Ein Nachteil ist der eventuell auftretende Gewebeschaden bei hohen Spannungen (21).

#### *Ultraschall*

Eine für *in vivo* Versuche bevorzugte Methode ist der Ultraschall. Dabei wird die DNS mit einem Kontrastmittel gemischt (Optison oder Levovist), wodurch Mikrobubbles

gebildet werden. Durch den Ultraschall werden diese Mikrobläschen mit der DNS in dem Bereich der Zielzellen zum Platzen gebracht und dadurch der Gentransfer ermöglicht (21).

#### *Partikelbombardement*

Dabei werden 1–3 µm große Gold- oder Tungsten-Partikel mit Plasmid-DNS beschichtet und diese Partikel durch eine Art Schockwellengenerator in einem elektrischen Spannungsfeld beschleunigt und auf das Zielgewebe gefeuert. Dadurch wird die Barriere der Zellmembran durch den physikalischen Einschlag durchbrochen und die DNS intrazellulär freigesetzt (9).

#### *Jetinjektion*

Bei diesem Verfahren werden Flüssigkeitskügelchen unter hohem Druck gesetzt und der Strom durchbricht die Zellmembran, wobei die zugefügte DNS in die Zelle eintreten kann (9).

#### **1.1.2.1.2 Chemischer nicht-viraler Gentransfer**

Hierbei wird die gereinigte Plasmid-DNS mit dem therapeutischen Transgen zu einem Komplex verbunden, der über Endozytose in die Zielzelle eintritt.

#### *Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation*

Dieses Verfahren wurde in den frühen 1970er Jahren entwickelt und war die erste Methode mit dem die zelluläre Aufnahme von DNS substantiell gesteigert werden konnte. Dabei bindet Plasmid-DNS an naszierende Kalziumphosphat-Kristalle bindet.

Die DNS-Kalzium-Phosphat-Kopräzipitate adsorbieren auf der Zelloberfläche adhärenente Zellen und werden durch Endozytose aufgenommen. Von Vorteil sind die geringere Mutationsrate und eine dadurch bedingte stabilere Expression, von Nachteil hingegen die Toxizität der Kalzium-Phosphat Präzipitate. Da diese Methode nur *in vitro* einsetzbar ist, ist sie in der klinischen Anwendung nicht weiterverfolgt worden (9).

### *Liposomen*

Hierbei gibt es zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze. Zum einen den Einschluss der DNS in das Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel und zum anderen die Komplexierung der DNS an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel. Der Gentransfer der Lipoplexe (Liposom/DNS-Komplex) beruht auf den elektrischen Ladungseigenschaften der DNS (negativ aufgrund des Phosphatrückgrads der Doppelhelix), kationischer Lipide (positiv) und der Zelloberfläche (insgesamt negativ). Dabei verschmelzen die Lipoplexe mit der Zellmembran (Endozytose) und geben die DNS frei (9, 21). Vorteil dieses Verfahrens ist die deutlich gesteigerte Transfektionsrate gegenüber den anderen chemischen Verfahren und keine Größenbegrenzung der zu transportierenden Gene. Von Nachteil ist, dass nicht alle Zellen transfizierbar sind, die Genexpression nur vorübergehend ist und eine hohe Lipidkonzentration toxisch sein könnte.

### *Polymere*

Komplexierung von Plasmid-DNS mit positiv geladenen, stark verzweigten Polymeren. Derartige Polykationen bilden mit DNS-Molekülen in wässrigen Medien lösliche Komplexe, die das Einschleusen des Genmaterials in die Zelle ermöglichen. Die

Methode ist recht zellverträglich und erzielt hohe Transfektionseffizienzen von bis zu 30%, erlaubt aber nur eine transiente Transfektionen. Die neueren Verfahren benutzen kationische Dendrimere. Diese komplexieren die Plasmid-DNS und werden von den Zielzellen aufgenommen. Die Methode ist in der Regel besser zellverträglich als die kationische Lipofektion. Vorteil dieser Methode ist die geringe Toxizität und dass eine wiederholte Transfektion möglich ist. Ein Nachteil ist die Abhängigkeit von der Rezeptordichte und der lysosomale Abbau der Plasmid-DNS (21).

#### **1.1.2.2 Virale Vektoren**

Eine Langzeitexpression eines Transgens bei einem *in vivo* Gentransfer erfordert die Stabilität des Vektors im eingebrachten Körperkompartiment, die starke Bindung an die Zielzellen, die problemlose Durchdringung der Zellmembran, den sicheren Transport zum Zellkern und die Integration in das Genom. Am ehesten entsprechen diese Anforderungen dem Gentransport mit viralen Vektoren (Transduktion), die daher in den meisten *in vivo* Studien verwendet werden. Dabei wird das Grundprinzip der viralen Infektion zum Transport des genetischen Materials übernommen. Allerdings darf dabei der virale Vektor nicht replikationsfähig sein und das pathogene (virale) Gen tragen. Die Konversion eines Virus in einen rekombinanten (gentechnologisch durch genetischen Umbau hergestelltes Produkt) Vektor beinhaltet dadurch zuerst die Identifikation der viralen Sequenzen, die für die Replikation, den Zusammenbau des viralen Genoms und den infektiösen Transportmechanismus zuständig sind. Danach werden überflüssige Gene entnommen, wodurch die Replikationsfähigkeit und Pathogenität vermindert wird (je geringer der eigene virale Genomanteil, desto schwächer die Immunantwort des Wirtskörpers). Anschließend werden die therapeutischen- oder Marker- Gene in das



Vektorkonstrukt mit Hilfe von Verpackungszellen (packaging cells) inseriert (22). Es folgt eine Beschreibung der am häufigsten verwendeten nicht-onkolytischen viralen Vektoren in der aktuellen Gentherapie.

#### **1.1.2.2.1 RNS Viren**

##### *Retrovirus*

Retroviren bestehen aus 2 Kopien einer Einzelstrang RNS von 7-10 kb, haben einen Durchmesser von ca. 100nm und sind umhüllt. Die virale RNS enthält 3 essentielle Gene *gag*, *pol* und *env* für den viralen Aufbau. Nach Bindung an den Zellrezeptor wird die RNS in das Zytoplasma freigegeben und dort via dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNS umgewandelt. Danach wird die DNS in den Nukleus transferiert und in das Genom der Wirtszelle durch das Enzym Integrase aufgenommen. Retroviren infizieren keine sich nicht teilenden Zellen, können maximal Strukturen von 8kb aufnehmen und zeichnen sich durch ein stabiles Expressionsmuster aus (22, 23).

Von Vorteil sind der persistierende Gentransfer und das niedrige Entzündungspotential, nachteilig hingegen, dass nur sich teilende Zellen infiziert werden, die Induktion einer malignen Transformation möglich ist und relativ niedrige Titer bestehen ( $10^6$ - $10^7$ ).

##### *Lentivirus*

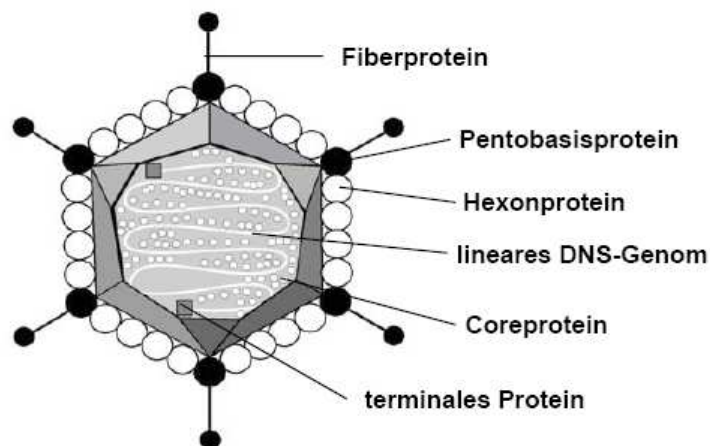
Im Gegensatz zu den Retroviren kodiert das Lentivirus neben den essentiellen Genen (*gag*, *pol* und *env*) noch bis zu 6 weitere virale Proteine, die für die Virusreplikation und –Persistenz verantwortlich sind. Ein Vorteil ist die mögliche Infektion von sich nicht

teilenden Zellen. Von Nachteil ist wie bei dem Retrovirus die mögliche Induktion einer malignen Transformation (22, 23).

#### 1.1.2.2 DNS Viren

##### *Adenovirus*

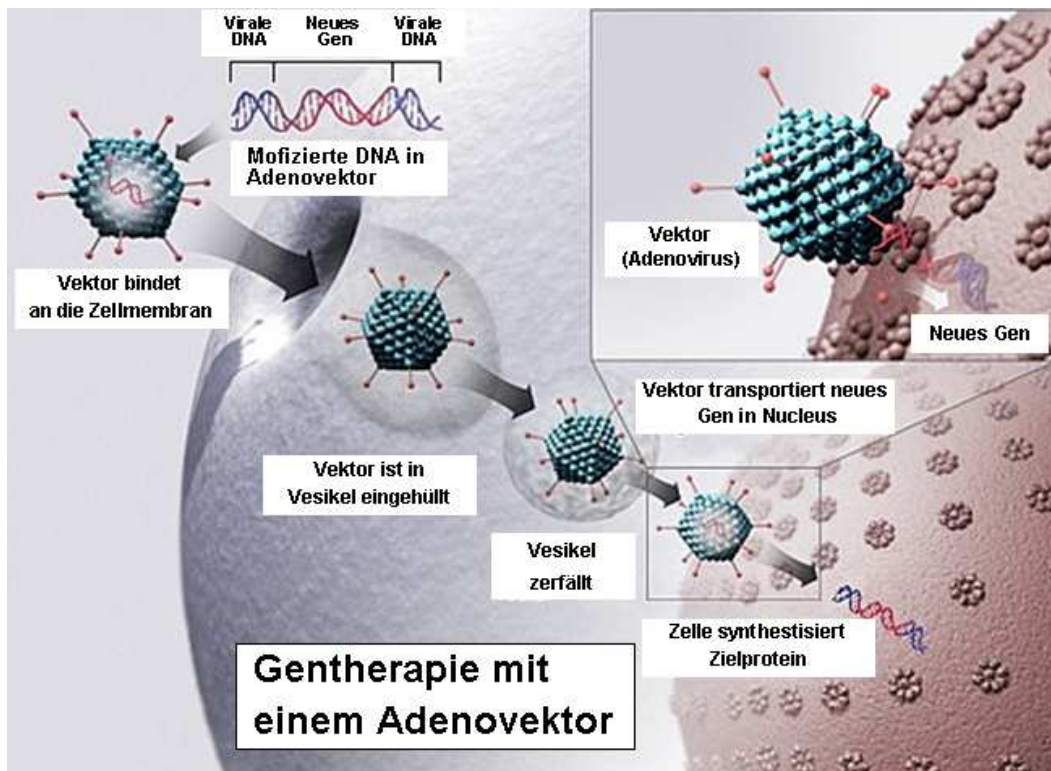
Adenoviren sind Viren aus der Familie der *Adenoviridae*. Erstmals wurden sie aus menschlichen Rachenmandeln (Adenoiden) isoliert, woraus sich auch der Name ableitet. Adenoviren sind unbehüllt und haben einen Durchmesser von 70-100nm. Als Genom besitzen sie eine doppelsträngige lineare DNS, bestehend aus 36kb, die in 100 map units (mu) unterteilt wird. An jedem Genomende liegen die „*inverted terminal repeats*“ (ITR's), die für die Verpackung und Replikation des Virusgenoms in Virionen wichtig sind. Am 5'-Ende ist zudem kovalent ein terminales Protein gebunden. Morphologische Charakteristika des Adenovirus sind ein ikosaedrisches Kapsid mit 252 Untereinheiten (UE). Dieses besteht aus Hexonproteinen (240 UE), Pentobasisproteinen (12 UE) und Fiberproteinen.



**Abb.1:** Darstellung eines Adenovirus mit den Proteinstrukturen.

Im Gegensatz zu Retroviren können sich nicht teilende Zellen infiziert werden und die maximale Größe der einzubauenden Gensequenz kann 8kb bei E1/E3 defizienten Viren betragen. Die meisten adenoviralen Vektoren bestehen aus dem Serotyp 5, es gab jedoch in der Vergangenheit auch Studien mit den Serotypen 2, 4 und 7. Die Expression beträgt in Tierversuchen 3-4 Wochen, kann aber unter Immunsuppression bis zu mehreren Monaten anhalten. Adenoviren verursachen hauptsächlich Erkrankungen des Respirationstraktes, können jedoch abhängig vom jeweiligen Serotyp auch eine Gastroenteritis, Konjunktivitis, Zystitis, Rhinitis oder Pharyngitis verursachen. Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem können ernsthafte Komplikationen wie zum Beispiel das „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“ (ARDS) entstehen.

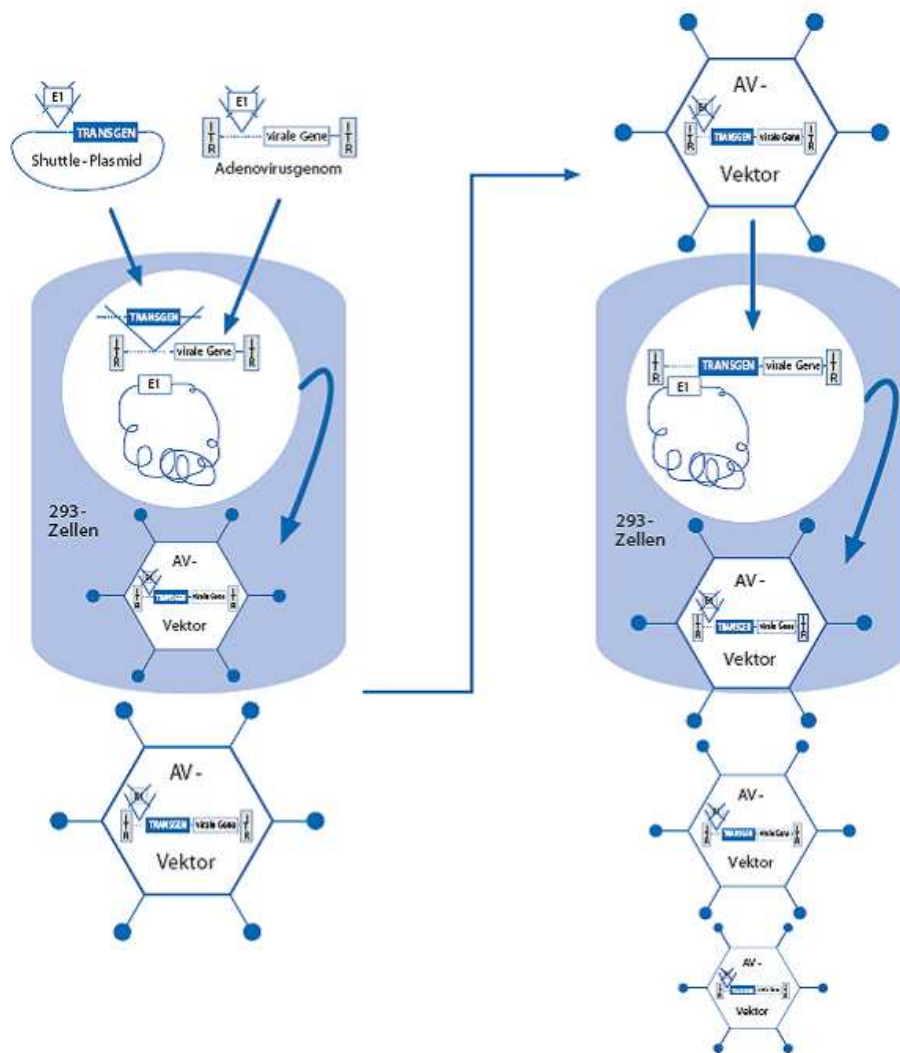
Der Vorgang der Infektion wird mit der initialen Bindung des Adenovirus an die zu infizierende Zelle eingeleitet. Dabei bindet das Virus durch sein Fiberprotein an ein zelluläres Oberflächenprotein, den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). Zusätzlich bindet das Viruskapsid („penton base“) über  $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ -Integrine, die eine Clathrin-vermittelte Einstülpung der Zellmembran (Endozytose) bewirken, wodurch Signale erzeugt werden, die unter anderem die Dynamik des Zytoskeletts verändern und das Zellwachstum stimulieren. Durch die virale Protease L3/p23 wird das Viruskapsid danach angedaut und so durch die Kernporen in den Nukleus transportiert, wo die virale DNS als Episom (Plasmide, welche in das Wirtsgenom integriert sind) bestehen bleibt und die Transkription bzw. Translation der Gene gestartet wird.



**Abb.2:** Methode der Gentherapie mit einem viralen Vektor (Adenovirus). Der mit einer modifizierten DNS hergestellte adenovirale Vektor bindet an die Zellmembran und gibt nach Eintritt in Zytoplasma das Gen in den Nucleus ab, wo das therapeutische Protein synthetisiert wird.

Die adenoviralen Gene können nach dem zeitlichen Ablauf ihrer Expression während der Replikation in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Die frühe Gruppe, bestehend aus E1A, E1B, E2, E3 und E4, die verspätete Gruppe, bestehend aus IX und IVa2 und die späte Transkriptionseinheit, bestehend aus L1-L5. Dabei ist die erste Gruppe für die Konstruktion eines rekombinanten Vektors am wichtigsten, da hier die Veränderungen vorgenommen werden. So kodiert die E2 Region Proteine für die Replikation, inklusive der viralen Polymerase, die E1 und E4 Region kodiert Proteine für die DNS-Replikation

und die E3 Region ist an der Immunsuppression beteiligt. Um das therapeutische Gen in den adenoviralen Vektor einzubinden und dieser replikationsdefizient wird, wurde in den Anfängen die Kodierungsregion E1, welche für die Replikation des Virus zuständig ist, mit dem Transgen ausgetauscht. Durch die frei gewordene Region konnte ein Transgen von 4.7-4.9kb integriert werden. Zur Herstellung dieser Vektoren werden spezielle Zelllinien (humane embryonale 293 Zelllinie) verwendet, die das E1 Gen beinhalten. Zusätzlich kann die Kapazität des Vektors durch die Entnahme der E3 Region auf 8.3kb gesteigert werden. Die Zukunft liegt dabei in der Entwicklung von „guttet vectors“, die keine viralen Sequenzen außer den „*inverted terminal repeats*“ (ITR) und den *cis* Packungssignalen mehr enthalten und dadurch in der Theorie keine (viralen) Nebenwirkungen mehr auslösen können.



**Abb.3:** Herstellung adenoviraler rekombinierter Vektoren. E1-deletierte (dadurch replikationsunfähige) Adenovirengenome werden durch Kotransfektion mit dem transgenen Shuttle-Plasmid in humanen 293-Zellen Verpackungszellen rekombiniert. Die Gene der zur Replikation essentiellen E1-Region werden von der 293-Verpackungszelllinie bereitgestellt. Da die E1-Region nicht mit verpackt wird, sind die entstehenden Viren replikationsdefizient. Zur Vervielfältigung der rekombinierten Viren, werden in einem zweiten Schritt wiederum 293-Zellen verwendet (9) (Bild entnommen

aus „Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie“. Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2. Berlin: Springer-Verlag; 1998).

Zusammengefasst zeigen die adenoviralen Vektoren eine hohe Expression des therapeutischen Gens in Zellen verschiedenster Organe 1-2 Wochen nach dem Gentransfer. Dabei ist die Infizierung sich nicht teilender Zellen ein großer Vorteil gegenüber den retroviralen Vektoren. Die aufgrund des aktivierten Immunsystems verkürzte Expression des Transgens betrifft am ehesten die monogenetischen Erberkrankungen als die Therapie maligner Tumoren. Nachteilig ist jedoch, dass es durch den Adenovirus zu einer ausgelösten Immunreaktion mit überschießender Reaktion im Sinne eines „Systemischen inflammatorischen Response-Syndrom“ (SIRS) und eventueller multipler Organschädigungen kommen kann (22-24).

#### *Adeno-assoziiertes Virus*

Adeno-assoziierte Viren (AAV) bestehen aus einer 4.7kb Einzelstrang DNS, sind 18-26nm im Durchmesser und besitzen keine Hülle. Eine Infektion sich nicht teilender Zellen ist möglich und die maximale Größe für das Transgen beträgt <4.5kb. Außerdem ist eine stabile Expression beschrieben worden, teilweise bis zu 1 Jahr. Sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen konnte keine isolierte Pathogenität des Virus nachgewiesen werden, obwohl 90% aller Menschen nachweislich eine AAV Infektion durchgemacht haben. Eine Infektion kann nur durch die Kooperation mit Helferviren (Adenovirus, Herpesvirus) entstehen. Ein Nachteil des AAV als Vektor ist die geringe Transportkapazität von nur <4.5kb. Aufgrund der nicht vorhandenen viralen Kodierungsregionen, besteht keine mit der Genexpression zusammenhängende

Toxizität, jedoch ist das Kapsid sehr allergen und kann bei wiederholter Applikation zu einer starken Immunantwort führen (22-24).

### *Herpesvirus*

Das Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) ist ein 152kb großes doppelsträngiges DNS Virus mit einem Durchmesser von 110nm. Es beinhaltet über 81 virale Proteine und kann sich nicht teilende Zellen infizieren. Es können Transgene von über 25kb aufgenommen werden und die Expression ist stabil. Bei Menschen verursacht es Ulzerationen an den Schleimhäuten und im Gesichtsbereich sowie Meningitis und Enzephalitis. Das verwandte HSV-2 verursacht dagegen Ulzerationen im Genitalbereich. Der Einsatz des Vektors in der Gentherapie bezieht sich auf Grund seiner Neutrophilie auf Hirn- und Rückenmarkserkrankungen. Ein Risiko ist jedoch der eigene Toxizitätseinfluss des Virus, der *in vivo* noch nicht weitgehend geklärt ist.

### **1.1.3 Promotoren**

#### *Allgemein*

Als Promoter wird der Abschnitt auf der DNS bezeichnet, an dem die Polymerase erkennt, wo der Startpunkt eines Gens liegt, sodass die Transkription des Zielproteins erfolgen kann. Dabei werden für die Regulation des viral eingeschleusten Transgens verschiedenste Promotoren verwendet wie z.B. der „Cytomegalievirus“ (CMV), der „Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeats“ (RSV-LTR) oder der „Simian Virus 40“ (SV40) Promoter. Um dabei nicht transformierte Zellen zu schützen, werden tumorspezifische Promoter verwendet, da multiple Tumorentitäten spezifische zelluläre



Antigene ausbilden, deren regulatorische Elemente für die Steuerung der Genexpression genutzt werden können. Darunter sind z.B. für das kolorektale- und Lungenkarzinom der carcinoembryonale Antigen (CEA)-Promoter, für Melanome der Tyrosinase-Promoter und für Brustkrebs der MUC1-Promoter (25).

Ein limitierender Effekt der meisten tumorspezifischen Promoter ist jedoch deren schwache Transkriptionsaktivität und folglich geringe Genexpression, welche bei den meisten Promotoren unterhalb der Aktivität der nicht tumorspezifischen liegt. Eine Möglichkeit, die Effektivität der transgenen Expression zu steigern, liegt daher in der Entwicklung von Verstärkungsmechanismen tumorspezifischer Promotoren.

#### **1.1.3.1 Verstärkungsmechanismus**

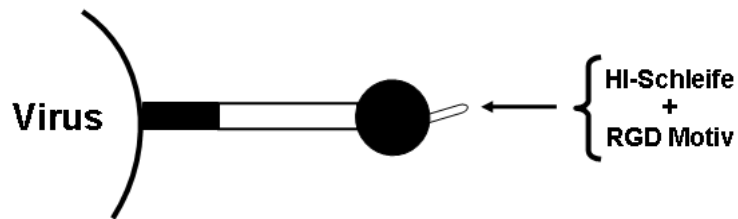
Im Jahre 1998 haben Fang et al. *in vivo* demonstriert, dass der synthetische GAL4-responsive Promoter GAL4/TATA (GT) eine sehr geringe Basalaktivität in verschiedensten Organen aufzeigt, jedoch durch die Zugabe des Proteins GAL4-VP16 (GV16) stark induzierbar ist (26). Dieser Effekt ist in einer Folgestudie mit einem tumorspezifischen Promoter kombiniert worden, sodass ein schwacher tumorspezifischer Promoter (CEA) einen Transaktivator synthetisiert (GV16), der wiederum den synthetischen Promoter GT aktiviert. Es hat sich dabei eine 20fach erhöhte Genexpression gegenüber der nicht verstärkten Kontrollgruppe gezeigt (25). Zusätzlich sind die meisten Promoter zellspezifisch, sodass eine eventuelle Therapie in den meisten Fällen nur für eine Tumorentität entwickelt werden kann. Daher wäre die Entwicklung eines Promoters, der in multiplen Tumorzellen aktiv ist, sinnvoll.

### **1.1.3.2 Humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)**

Telomere sind aus repetitiven DNS-Sequenzen und Proteinen bestehende Strukturen am Ende von Chromosomen und für deren Stabilität erforderlich. Das Enzym Telomerase ist eine für die Replikation der chromosomalen Enden zuständige Polymerase und besteht aus mehreren Ribonukleoprotein Komplexen. Es verlängert die telomere DNS und kompensiert damit den physiologischen Prozess der zellteilungsabhängigen Verkürzung von Telomeren. Die als Schablone dienende Region der humanen Telomerase-RNS (hTR) ist 11 Basen lang und komplementär zum Telomerstrang aufgebaut. Die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) arbeitet als reverse Transkriptase und ist für die Nukleotidaddition an den 3'-Enden der chromosomalen DNS verantwortlich (27). Eine Verbindung zwischen der Telomeraseaktivität und malignen Tumoren ist erstmalig durch Kim et al. 1994 beschrieben und danach in mehr als 85% der verschiedensten Tumorarten beobachtet worden, bei einer nicht gesteigerten Aktivität in normalen somatischen Zellen. Zusätzlich hat sich in weiteren Studien ein direkter Zusammenhang zwischen der Tumorgenese und der hTERT-Expression gezeigt (27). Auf Grund der bestehenden Aktivität in multiplen Tumorzelllinien, scheint der hTERT-Promoter ideal für die virale tumorzellspezifische Therapie zu sein. Erste Ergebnisse eines adenoviralen Vektors mit dem hTERT-Promoter und LacZ als Transgen haben eine 100fach gesteigerte Expression des LacZ in Tumorzellen im Vergleich zu dem CMV-Promoter nachgewiesen, bei einer ausbleibenden Expression in nicht-transformierten Geweben (27). Dagegen hat die Verwendung des hTC-Promoters neben der Tumorspezifität auch eine Expression in Telomerase negativen Zellen gezeigt, sodass der Einsatz zur gerichteten Tumorbehandlung eher kritisch zu bewerten ist.

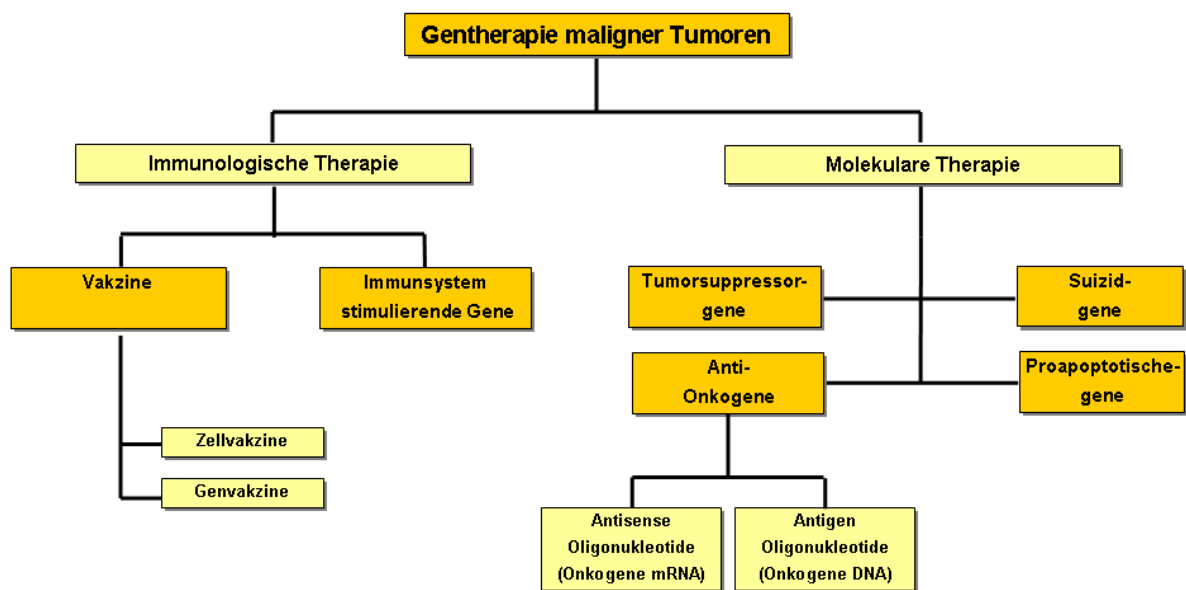
#### 1.1.4 Therapieresistenz adenoviraler Vektoren

Die Verwendung adenoviraler Vektoren in gentherapeutischen Studien hat gezeigt, dass eine wiederholte Applikation zu einer Expansion resistenter Zellen führen kann und dieser Effekt am wahrscheinlichsten auf einer verringerten Expression des initialen Virusbindungsrezeptor, Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) oder der Rezeptoren  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , und  $\alpha v\beta 1$  (28-30) beruht. Zusätzlich ist eine initial reduzierte CAR-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien und in Tumoren von Patientenproben beschrieben worden (31), sodass alternative Bindungsmechanismen für adenovirale Vektoren zur Resistenzumgehung und Erhöhung der Effizienz benötigt werden. Unter den verschiedenen Strategien zur Steigerung der Transduktionseffizienz ist die simpelste Variante eine Konzentrationssteigerung der viralen Vektoren, die jedoch zu den gefürchteten Immunreaktionen führen kann. Es hat sich gezeigt, dass eine virale Dosis über  $10^{12}$  pfu (plaque-forming units) zu einer Lebertoxizität und Hypotension führt. Ein weiterer Ansatz liegt in der Umgehung des CA-Rezeptors durch einen alternativen Bindungsweg, welcher erstmalig 1998 durch Krasnykh et al. beschrieben worden ist (32). Dabei hat sich gezeigt, dass die Modifikation des adenoviralen Kapsids durch Inkorporation einer RGD-4C Tripeptidsequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) in die HI Schleife des adenoviralen Fiber-Proteins zu einer signifikant gesteigerten Transduktion gegenüber nicht modifizierten adenoviralen Vektoren führt. Dieser Effekt ist von mehreren Autoren in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (33), Zervixkarzinomen (34), Rhabdomyosarkomen (34), Ovarialkarzinomen (35), Melanomen (36) und Gliomen beschrieben worden (37). Es ist daher in Zukunft davon auszugehen, dass die neue Generation von adenoviralen Vektoren diese Modifikation (oder eine alternative Form) beinhalten werden.



**Abb.4:** Darstellung des Fiber-Endes mit der HI-Schleife, in der die RGD Sequenz integriert ist.

### 1.1.5 Therapieansätze bei malignen Erkrankungen



**Abb.5:** Darstellung der verschiedenen Therapieansätze in der Gentherapie maligner Tumoren, ausgehend von der immunologischen und molekularen Therapie.

### 1.1.5.1 Immunologische Therapieansätze

#### *Vakzine*

Bei dem Verfahren der *Zellvakzinierung* werden *in vitro* Tumorzellen dahingehend manipuliert, dass sie das Tumorantigen verstärkt exprimieren und dadurch dem Immunsystem zugänglich sind. Besonders erfolgreich ist dieses bei dendritischen Zellen, die das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) exprimieren und akuten Leukämiezellen gelungen (38). Daneben gibt es auch die Möglichkeit der *direkten genetischen Vakzination*, bei der Antigen-kodierende Gene transduziert werden und dadurch die gewünschte (im Vergleich zur Zellvakzinierung verlängerte) Expression eingeleitet wird (38).

#### *Das Immunsystem stimulierende Gene*

Tumorzellen können der Vernichtung des Immunsystems durch die Sekretion von immunsuppressiven Faktoren, Herunterregelung der Antigenexpression oder des „major histocompatibility complexes“ (MHC) entgehen. Eine immuntherapeutische Strategie ist es daher durch eingeschleuste Gene die Immunabwehr deutlich zu verstärken. Dabei hat sich in der vergangenen Dekade die Forschung auf das Interleukin-12 fokussiert, welches mehrere Komponenten der Immunabwehr aktiviert, insbesondere zelluläre T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (38).

## **1.1.5.2 Molekulare Therapieansätze**

### **1.1.5.2.1 Tumorsuppressorgene**

Tumorsuppressorgene induzieren Apoptose oder die Unterbrechung des Zellzyklus in malignen Zellen. Das bekannteste Gen dieser Gruppierung ist das *p53*, welches das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung reguliert und in 40% aller Tumoren verändert ist. Obwohl der *wild type p53 (wt p53)* zu der Familie der Tumorsuppressorgene gehört, können mutierte Formen auch als Onkogene fungieren. Neben der erfolgreichen Behandlung in Tumorzelllinien und im Kleintiermodell ist diese Form der Gentherapie bereits in der klinischen Erprobung. Dabei zeigt allerdings die Kombination mit einer Chemotherapie oder Radiotherapie deutlich bessere Ergebnisse (38).

### **1.1.5.2.2 Suizidgene**

Bei diesem Verfahren (auch Enzym-Prodrug-Therapie genannt) infiziert ein viraler Vektor, der ein Gen beinhaltet, das für ein bestimmtes Enzym kodiert, die Empfängerzelle. Die Zelle startet die Produktion des Enzyms, welches eine zugeführte nicht-toxische Substanz (Prodrug) in eine aktive Form überführt, die einen supprimierenden Effekt auf das Tumorwachstum hat. Eines der bekanntesten Gen/Prodrug Systeme ist das Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-tk)/Ganciclovir (GCV) System. HSV-tk ist ein Herpesenzym, das die Phosphorylierung eines Nukleosidanalogs (wie Ganciclovir) katalysiert. Die phosphorylierte Form des Ganciclovirs ( $\rho$ -GCV) vermittelt dann den zelltötenden Effekt über apoptotische Mechanismen. Eine Verstärkung erhält das System durch einen so genannten „Bystander-Effekt“, wodurch sich eine deutlich höhere Transduktion erreichen lässt (38).

### **1.1.5.2.3 Anti Onkogene**

#### *Antisense Oligonukleotide*

Die biologische Aktivität von Onkogenen kann auf der RNS oder DNS Ebene unterbunden werden. Antisense Oligonukleotide binden die mRNA und inhibieren die Translation in der Proteinbiosynthese. Diese Methode ermöglichte die Hemmung des bekanntesten Onkogens, dem Apoptoseinhibitor *bcl-2*, durch das antisense Oligonukleotid G3139.

#### *Antigen Oligonukleotide*

Hierbei bindet das Oligonukleotid an die DNS, sodass eine nicht funktionierende Helix entsteht. Dabei wird auf der Ebene der Transkription die Proteinsynthese unterbunden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem antisense Oligonukleotid liegt in der geringeren Anzahl der Ziele (zwei im Vergleich zu >100 bei der RNS).

### **1.1.5.2.4 Proapoptotische Gene**

Gegenwärtig liegt der Fokus der gentherapeutischen Tumorbehandlung in der Einschleusung proapoptotischer Gene in die Tumorzelle, wodurch Proteine synthetisiert werden, die direkt oder indirekt zum Zelltod führen.

#### **1.1.5.2.4.1 Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose induzierender Ligand (TRAIL)**

Darunter hat der Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (*TRAIL*) (oder auch als Apo-2L bezeichnet) aufgrund seiner starken Toxizität eine

besondere Bedeutung und Verbreitung erlangt. Dieses Gen wird in den meisten humanen Zellen synthetisiert und kodiert das Typ-II-transmembran Protein TRAIL, welches zu der TNF Zytokin Superfamilie TNF- $\alpha$ , FasL/CD95/Apo1L, TRAIL/Apo2L, und TWEAK/DR3L/Apo3L gehört (39). Die TRAIL getriggerte Apoptose in verschiedenen Tumorzellen wird durch Interaktion mit den „Todesrezeptoren“ DR4/TRAIL-R1 und DR5/TRAIL-2 an der Zelloberfläche und einer weitergeleiteten Kaspase-8 Aktivierung durch FADD eingeleitet (28). Der hierbei beobachtete proapoptotische Effekt zeigte sich nur in transformierten, aber nicht in normalen Zellen, was durch die antagonistischen Rezeptoren DcR1, DcR2 und Osteoprotegerin vermittelt wird, die um die TRAIL Bindung konkurrieren und somatische Zellen schützen (28). Allerdings haben sich bei der Behandlung von Zellen mit dem löslichen TRAIL-Protein bei hoher systemischer Dosierung systemische Leber- und Gehirnschäden gezeigt (40, 41). Es ist daher wichtig bei der systemischen Gabe die normalen Zellen durch eine spezifische Applikation des TRAIL in die Tumorzelle zu schützen. Durch die Einschleusung des *TRAIL* Gens durch einen adenoviralen Vektor in humane Tumorzellen ist in mehreren Studien eine deutliche Apoptoseinduktion *in vitro* und eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums *in vivo* ohne Toxizität gegenüber nicht transformierter Zellen nachgewiesen worden (42-44).

## **1.2 Beschreibung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD**

Gegenwärtig sind die Techniken der Gentherapie aufgrund der systemischen Toxizität viraler Vektoren und ihrer Genprodukte sowie der immer noch geringen Transduktion für *in vivo* Experimente limitiert. In dieser Studie ist daher ein neu konstruierter adenoviraler Vektor getestet worden, der den tumorspezifischen humane Telomerase



Reverse Transkriptase (hTERT) Promoter beinhaltet, welcher in über 85% aller humanen Karzinome aktiv ist bei gleichzeitiger Inaktivität in den meisten somatischen Zellen (43, 45). Das Problem der schwachen Genexpression eines tumorspezifischen (hTERT) Promotors wurde durch den Einbau eines Verstärkungssystems umgangen. Dabei exprimiert ein schwacher tumorspezifischer Promoter (hTERT) das GAL4/GV16 Fusionsprotein in den Tumorzellen, durch den der GAL4/TATA (GT) Promoter mit niedriger Basalaktivität aktiviert wird und eine stark erhöhte Expression des TRAIL Proteins auslöst (25). Zusätzlich wurde in den neuen Vektor, bezeichnet als Ad/TRAIL-F/RGD, eine RGD Sequenz in der HI Schleife des Fiber-Proteins zur verbesserten Transduktion integriert.

Um die therapeutische Aktivität des neuen adenoviralen Vektors *in vivo* zu testen, sind zuerst als Vorarbeiten mehrere orthotope- und Metastasentumormodelle etabliert worden, um ein optimales und vor allem reproduzierbares Modell zu gewährleisten.

### **1.3 Tumormodelle in der Nacktmaus**

Die Transplantation und das Wachstum von xenogenen Tumormodellen in immundefizienten Mäusen sind eine etablierte Methode, um in präklinischen Studien das zytotoxische Potential antitumoröser Wirkstoffe *in vivo* zu testen.

Die dabei gebräuchlichsten Tumormodelle entstehen durch das Wachstum von Tumorzellen, die subkutan, intraperitoneal, intravaskulär oder direkt in das Organ wie Leber, Pankreas oder Milz, injiziert werden (44, 46-52). Daneben ist die chirurgische orthotope Implantation („surgical orthotopic implantation“, SOI) ein seit Langem etabliertes Verfahren, wodurch kleine Tumorfragmente von subkutanen Tumoren unterschiedlicher Genese in das Zielorgan implantiert werden (53-62).

### **1.3.1 Problematik subkutaner Tumormodelle**

Gegenwärtig werden bei Kleintierversuchen die subkutanen Tumormodelle auf Grund ihrer einfachen Produzierbarkeit bevorzugt in der Wissenschaft verwendet. Es bedarf keiner Narkose, die Tumoren sind gut reproduzierbar und der Erfolg des Anwachsens nach wenigen Tagen ist gut sichtbar. Ein Hauptkritikpunkt sind jedoch die unrealistischen Wachstumsbedingungen im subkutanen Gewebe, die das Tumorwachstum und besonders die Ausbreitung entscheidend beeinflussen können.

Subkutane Tumoren streuen nur selten Metastasen (63, 64), neigen teilweise durch eine Behandlung zu verstärkter Regression (65) und exprimieren andere Zelloberflächenmoleküle als das Ursprungsparenchym (64). Daher ist die Aussage von gewonnenen Daten subkutaner Tumormodelle in der präklinischen Tumorforschung eher kritisch zu bewerten.

Dagegen können intravaskuläre- und Organinjektionen metastatische und orthotope Tumormodelle produzieren. Orthotope Tumormodelle zeigen in den meisten Fällen ein gesteigertes metastatisches Potential, wodurch eine deutlichere Aussage in Bezug auf die Wirksamkeit einer antitumorösen Substanz und deren Nebenwirkungen im Tiermodell, insbesondere im Langzeitverlauf, möglich ist (66).

### **1.4 Zielsetzung**

Im Rahmen von Vorarbeiten bezüglich der Etablierung geeigneter Tumormodelle und zwei nachfolgend aufeinander aufbauenden Experimenten sollten folgende Fragestellungen erarbeitet werden:

### *Vorarbeiten*

- Entwicklung von orthotopen- und Metastasentumormodellen verschiedener Tumorzelllinien zur nachfolgenden Testung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD *in vivo*.

### *Experiment I*

1. Testung des adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD in humanen Tumorzelllinien verschiedener Entitäten bezüglich seiner Toxizität *in vitro*.
2. Testung eines toxischen Effektes von Ad/TRAIL-F/RGD auf mesenchymale Stammzellen.
3. Überprüfung, ob ein eventueller toxischer Effekt des Ad/TRAIL-F/RGD Apoptose vermittelt ist und dieser sich über die Aktivierung der initialen Kaspase-8 nachweisen lässt.
4. Testung der antitumorösen Wirkung Ad/TRAIL-F/RGD *in vivo* in einem zuvor etablierten orthotopen Pankreastumormodell durch intratumorale Injektionen nach Relaparotomie.
5. Eventueller Nachweis des Pankreasschwanztumors in einer Mikrocomputertomografie und Vergleich zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe.
6. Überprüfung, ob die wiederholte intratumorale Injektion von Ad/TRAIL-F/RGD lebertoxisch ist.

## *Experiment II*

1. Zeigt die Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin eine additive bzw. synergistische Wirkung *in vitro*?
2. Führt die systemische Applikation von Ad/TRAIL-F/RGD zu einem therapeutischen Effekt *in vivo* und kann dieser durch die Kombination mit Gemcitabin verstärkt werden?
3. Überprüfung einer eventuellen Lebertoxizität durch die systemische Gabe von Ad/TRAIL-F/RGD.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zelllinien**

#### **2.1.1 Tumorzelllinien**

Die humanen Karzinomzelllinien Capan-1, AsPC-1 und Mia PaCa-2 (Pankreas), Hep G2 und Hep 3b (Hepatozellulär), DLD-1 und SW 620 (Kolon) sowie H 358 und H 460 (Lunge) sind von dem „American Type Culture Collection“ (ATCC)(Rockville, USA) bezogen worden. Außer DLD-1 und SW 620 (RPMI 1640 von dem „Roswell Park Memorial Institute“) sind alle verwendeten Tumorzellkulturen mit „Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium“ (DMEM) kultiviert worden, welches mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum (FBS, Gibco, Life Technologies, Inc., Grand Island, USA), 1% Glutamin, und 1% Penicillin und Streptomycin versehen worden ist (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, USA).

Anzumerken ist, dass die hier präsentierten Zelllinien exemplarisch sind. Die gleichen *in vitro* Experimente sind zusätzlich an den Tumorzelllinien Panc-1, L 174, LOVO, DLD-1 BR (Bax resistant) und A 549 durchgeführt worden, wobei sich sehr ähnliche Ergebnisse gezeigt haben.

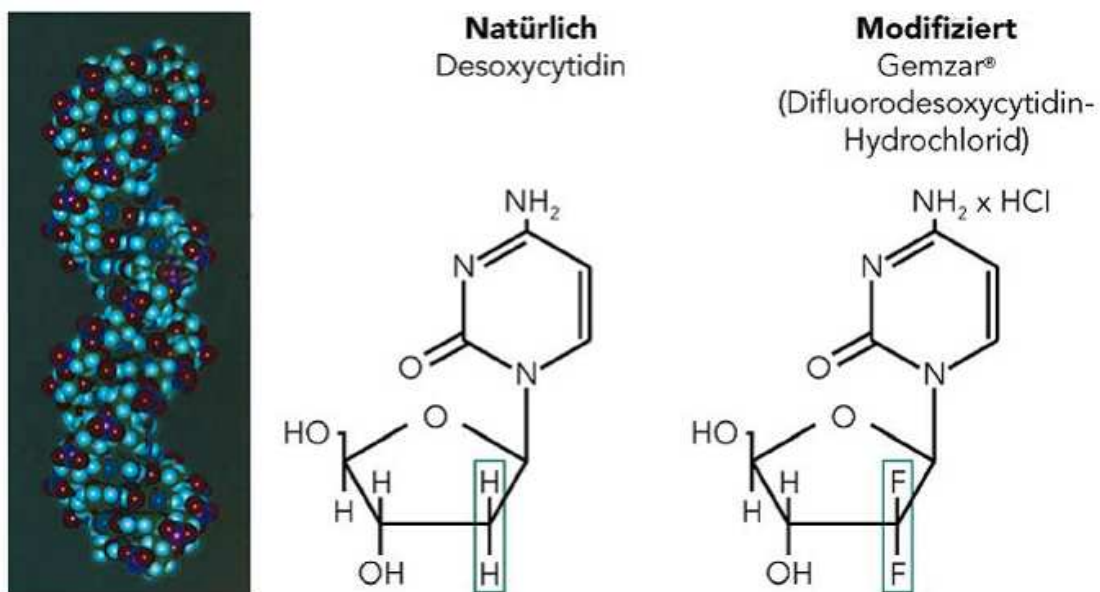
#### **2.1.2 Mesenchymale Stammzellen**

Die zur Transplantation vorgesehenen mesenchymalen Stammzellen sind aus dem Knochenmark von Knochenmarksspendern entsprechend den Institutsrichtlinien des M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA gewonnen und aufgearbeitet worden.

Danach sind die Zellen uns freundlicherweise von Dr. Frank Marini zur Verfügung gestellt worden (67). Die Zellen sind in Alpha MEM („Minimum Essential Medium“), welches mit 20% fetalen Rinderserum angereichert worden ist, bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert worden.

## 2.2 Gemcitabin

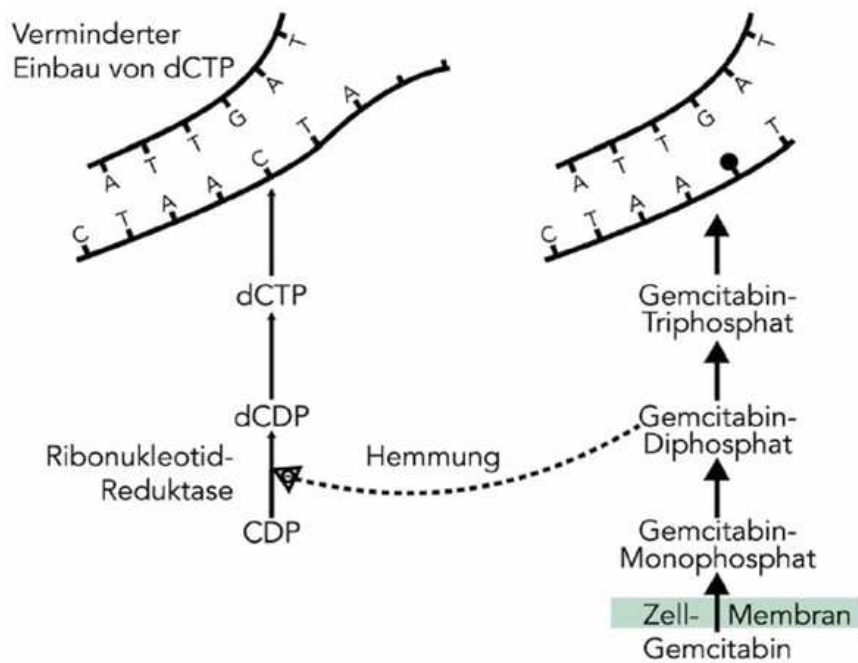
Das Chemotherapeutikum Gemcitabin (Gemzar®) (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidin monohydrochlorid) ist ein Nucleosidanalogen aus der Gruppe der Pyrimidine. Der Unterschied zum natürlichen zellulären Deoxycytidin besteht in der Substitution mit zwei Fluoratomen an der C-2'-Position des Zuckermoleküls.



**Abb.6:** Strukturformel von Gemcitabin (Gemzar®) (Bild entnommen aus dem Internet von <http://www.lilly-pharma.de>).

Der primäre Wirkmechanismus besteht im Einbau von Gemcitabin als falsches Nukleotid nach Phosphorylierung durch die Deoxycytidinkinase zur Triphosphatform (dFdCTP) in die DNS. Als falsches Nukleotid verhindert Gemcitabin so die DNS-Elongation, was zum Strangabbruch und zum Zelltod führt.

Zusätzlich wird hinter dem falschen Nukleotid eine weitere nicht veränderte Base angebaut (sog. „masked chain termination“). Dadurch werden "Reparaturenzyme" (Exonukleasen) der DNS und Reparaturmechanismen gehemmt. Besondere enzymatische Reaktionen führen zur intrazellulären Anreicherung von Gemcitabin und dadurch zur Verstärkung der zytostatischen Wirkung. Die Konkurrenz am Rezeptor durch Verdrängung des "richtigen" Nucleosids Deoxycytintriphosphat (dCTP) von der Bindungsstelle führt zudem zur kompetitiven Hemmung der DNS-Polymerasen.



**Abb.7:** Wirkungsmechanismus von Gemcitabin (Bild entnommen aus dem Internet von <http://www.lilly-pharma.de>).

Gemcitabin wirkt primär toxisch in der S-Phase der DNS-Synthese und blockiert die Zellprogression in der G1/S-Phase in soliden Tumoren wie dem Pankreas-, nichtkleinzelligen Lungen-, Blasen-, Ovar- und Brustkarzinom (68, 69).

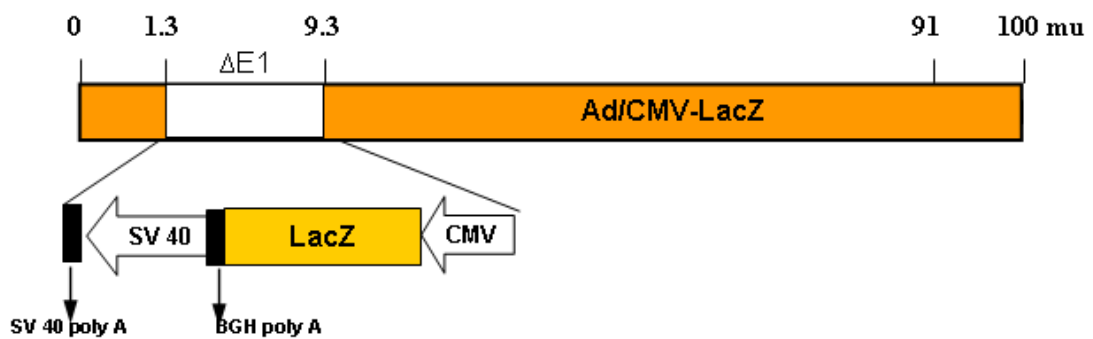
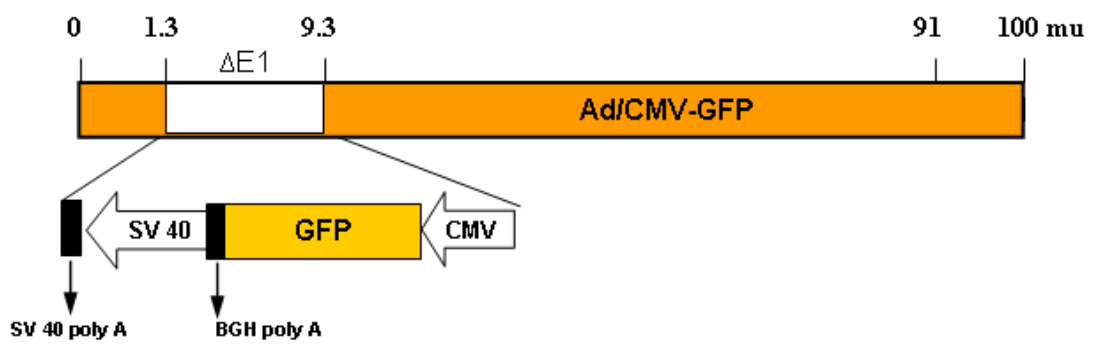
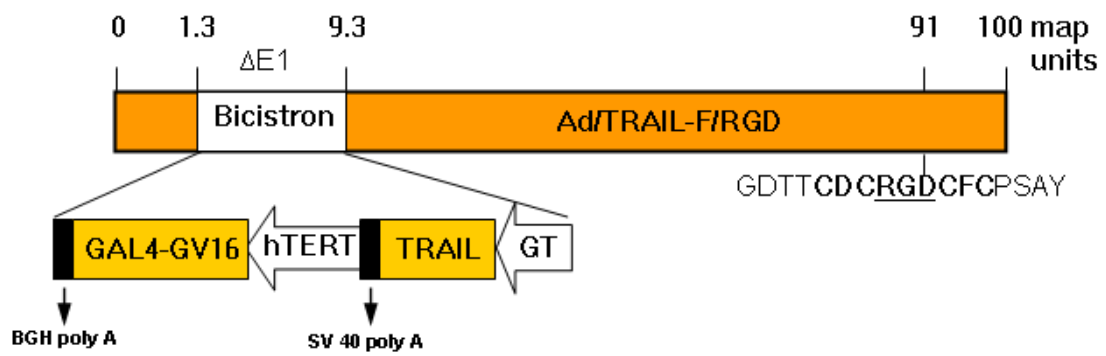
In dieser Studie ist Gemcitabin von Eli Lilly (Indianapolis, USA) bezogen und mit Phosphate-Buffered Saline (PBS) zu den entsprechenden Konzentrationen verdünnt worden.

### **2.3 Konstruktion und Charakteristik von Ad/TRAIL-F/RGD**

Die adenoviralen Vektoren Ad/CMV-GFP und Ad/CMV-LacZ sind bereits ausführlich in vorangegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe beschrieben worden (43). Der neue Vektor Ad/TRAIL-F/RGD hat die gleiche bicistronische Expressionskassette wie Ad/gTRAIL (43), außer dass Wildtyp TRAIL cDNS anstelle des *GFP/TRAIL* Konstrukts verwendet worden ist. Zusätzlich enthält Ad/TRAIL-F/RGD eine Insertion der CDC**RGD**CFC Sequenz in die HI Schleife des Fiber Proteins und eine Entfernung der Basenpaare zwischen 28599 bis 30469 in der E3 Region. Die Sequenzen der E3 Region, die Faser-Region, die humane TRAIL cDNS und das *GAL4/VP16* Fusionsgen in der E1 Region in Ad/TRAIL-F/RGD sind durch eine automatische DNS-Sequenzierung mittels reiner viraler DNS als Templates verifiziert worden.

Ad/TRAIL-F/RGD ist durch eine Ko-Transfektion von 293 Zellen mit einem Transportplasmid konstruiert worden, welches die humane Vollängen-TRAIL-Kodierungssequenz von dem hTERT-Promoter und ein 30kb Clal Fragment von Ad/LacZ-F/RGD exprimiert (70).





**Abb.8:** Schematische Darstellung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD sowie der Kontrollvektoren Ad/CMV-GFP und Ad/CMV-LacZ.

Die Titration, Purifikation und Qualitätsanalyse der drei verwendeten Vektoren ist in dem „Vector Core“ des M. D. Anderson Cancer Center, der University of Texas, Houston, USA, durchgeführt worden (45, 71). Alle viralen Produkte sind durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als frei von E1<sup>+</sup> Adenovirus befundet und durch einen „limulus amoebocyte lysate endotoxin detection kit“ (BioWhittaker, Walkersville, USA), als endotoxinfrei getestet worden (72). Die in dieser Studie verwendeten viralen Titer sind bestimmt worden durch die Absorption des dissoziierten Virus bei A<sub>260 nm</sub> (eine A<sub>260 nm</sub> Einheit = 10<sup>12</sup> Viruspartikel [VP]/ml). Partikel: Infektionseinheiten-Verhältnisse sind zwischen 30:1 und 100:1 gewesen. Daher ergibt sich eine „multiplicity of infection“ (MOI) von 1000 Viruspartikeln, welche äquivalent zu einer MOI von 10-30 Infektionseinheiten ist. In dem Experiment I ist Ad/CMV-GFP und in dem Experiment II Ad/CMV-LacZ als Vektorkontrolle sowie in beiden Experimenten PBS als Plazebokontrolle verwendet worden.

## **2.4 Zellproliferationstest (XTT)**

### **2.4.1 Testprinzip**

Um die Zellproliferation bzw. die Zellvitalität zu bestimmen, ist ein XTT-Proliferationskit (Cell Proliferation Kit II, Roche Molecular Biochemicals, USA), verwendet worden. Dabei werden die Zellen in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit dem gelben Farbstoff Tetrazolium [3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5 sulfenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)]

für 4 bis 24 Stunden inkubiert. In vitalen Zellen wird durch die aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen das Tetrazolium-Salz XTT in ein orangenes lösliches Formazan umgewandelt. Vollständig inhibierte intramitochondriale Dehydrogenasen, wie bei toten Zellen, können kein Formazan aus XTT bilden. Dabei korreliert die Anzahl lebendiger Zellen direkt mit der Menge an orangenen Zellen. Die Formazanbildung wird photometrisch über ein Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450-500 nm abgelesen und der Grad der Zytotoxizität der Testsubstanzen kann dadurch angegeben werden. Dieses Verfahren ist 1988 erstmalig von Scudiero et al. beschrieben worden und hat sich danach als sicherer Test zur Toxizitätsmessung in Zellkulturen etabliert (73).

#### **2.4.2 Testung der Tumorzelllinien**

Es sind  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch auf eine 96-Lochplatte pipettiert und 24 Std. später Ad/CMV-GFP und Ad/TRAIL-F/RGD in jedes Loch mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 500, 1000 und 2000 Viruspartikeln/Zelle hinzugefügt worden. PBS ist als Placebokontrolle verwendet und die Zellen sind bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert worden. Nach 24 Std. Behandlung ist an fünf aufeinander folgenden Tagen ein XTT-Test durchgeführt worden. Dabei ist jedes Experiment in vierfacher Ausführung durchgeführt und dreimal wiederholt worden. Die hier dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung.

## 2.5 Kombinationsindex (Combination Index, CI)

Um die zytotoxischen Konzentrationen von Gemcitabin alleine und in der Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD zu evaluieren, sind  $5 \times 10^3$  Zellen/Loch der Zelllinien AsPC-1 und Capan-1 auf eine 96-Lochplatte pipettiert und 24 Std. später mit verschiedenen MOIs von 250, 500, 1000, und 2000 VP/Zelle mit Ad/CMV-LacZ oder Ad/TRAIL-F/RGD infiziert worden. Dagegen ist Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen (0.001–500 mM) aufgetragen und die Zellen sind bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert worden. Nach 4 Behandlungstagen ist ein XTT-Test durchgeführt und der Effekt der Kombinationstherapie, eingeteilt nach Synergismus, additiver Effekt oder Antagonismus, mittels der gewonnenen Daten mit der Software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, England) analysiert worden (74). Die optimale Dosierung für einen synergistischen Effekt ist danach ausgewählt und der Versuch durch einen weiteren XTT-Test über 5 Tage, inklusive der Kontrollgruppen, erneut durchgeführt worden. In beiden Bestimmungen ist jedes Experiment in vierfacher Ausführung durchgeführt und dreimal wiederholt worden.

<b>Verteilung des CI</b>	<b>Symbol</b>	<b>Beschreibung</b>
< 0.1	+++++	Sehr starker Synergismus
0.1 – 0.3	++++	Starker Synergismus
0.3 – 0.7	+++	Synergismus
0.7 – 0.85	++	Moderater Synergismus
0.85 – 0.90	+	Schwacher Synergismus
0.90 – 1.10	±	Additiver Effekt
1.10 – 1.20	-	Schwacher Antagonismus
1.20 – 1.45	--	Antagonismus

**Tab.1:** Darstellung des Kombinationsindex (Combination Index, CI), der einen Synergismus, additiven Effekt oder Antagonismus einer Kombinationstherapie anzeigt.

## **2.6 Durchflusszytometrie**

### **2.6.1 Testprinzip der Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid (PI)**

Die Ausschlussfärbemethode dient zum Nachweis von abgestorbenen Zellen. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit einem speziellem Farbstoff angefärbt. Die lebendigen Zellen mit einer intakten Plasmamembran sind für den Farbstoff nicht permeabel, wohingegen abgestorbene oder bereits untergehende Zellen bzw. deren Zellmembranen für den Farbstoff durchgängig sind. Der am häufigsten verwendete Test ist aufgrund seiner einfachen Handhabung und geringer Kosten die Trypanblaufärbung. Um jedoch eine exakte Quantifizierung der toten Zellen zu erhalten oder die einzelnen Zellzyklusphasen differenzieren zu können, eignet sich die Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) am besten. Dabei ist in Bezug auf die Apoptosemessung neben der Annexin-V Methode die Färbung mit Propidium Iodid (PI) am etabliertesten. Dieser Farbstoff gehört zu der Klasse der interkalierenden Fluorochrome, die sich periodisch zwischen die Basenpaare der DNS einfügen. Da sie sich auch in Doppelsträngige RNS einlagern, ist eine vorherige Behandlung mit RNase notwendig. Nach Bindung des PI an die DNS der Zellen mit permeabler Membran, entsteht eine stark fluoreszierende Verbindung, die in der Durchflusszytometrie von nicht fluoreszierenden Zellen unterschieden werden kann.

## **2.6.2 Testung der Tumorzelllinien**

Hierbei sind  $1 \times 10^6$  Zellen/Platte der verwendeten Zelllinien auf 100 mm Platten kultiviert worden. Nach 24 Std. sind die Zellen mit den adenoviralen Vektoren Ad/CMV-GFP oder Ad/TRAIL-F/RGD mit einer MOI von 1000 und 2000 VP/Zelle infiziert worden. In dem Experiment II ist dabei anstatt dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP der Vektor Ad/CMV-LacZ verwendet und die Zellen mit einer MOI von 500 VP/Zelle infiziert worden. Das Chemotherapeutikum Gemcitabin ist in einer Konzentration von  $0.1 \mu\text{M}$  in der Kombinationstherapie gegeben und PBS als Placebokontrolle verwendet worden. Nach einer Inkubationszeit von 48 Std. sind die adhärenenten und im Medium gelösten Zellen geerntet und zweimal mit PBS gewaschen worden. Anschließend sind die Zellen mit 70% Ethanol über Nacht fixiert und mit Propidium-Iodid (1 ml von PI, 10  $\mu\text{l}$  von RNase, 9 ml von PBS, PI: 50  $\mu\text{g/ml}$ ) vor der Analyse gefärbt worden. Der Sub- $G_0/G_1$  DNS-Zellbestandteil als Aussage über die Anzahl der abgestorbenen Zellen ist mit der Cell Quest Software ausgewertet worden (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Angegeben ist rechts oben jeweils der prozentuale Anteil der toten Zellen.

## **2.6 Western Blot-Analyse**

### **2.6.1 Testprinzip**

Ein Western Blot (auch als Immunoblot bezeichnet) beschreibt den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (SDS-PAGE, native-PAGE, isoelektrische

Fokussierung, 2D-Gelelektrophorese, usw.) entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften aufgetrennt. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit einem Gel (in der Regel ein Polyacrylamid-Gel mit optimaler Acrylamid-Konzentration) in einzelne Proteinbanden aufgetrennt.

Anschließend werden die Proteine beim „Bloten“ vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulose, Nylon oder PVDF(Polyvinylidendifluorid)) transferiert. Dabei bleiben die Proteine an der Membranoberfläche aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur. Für diesen elektrophoretischen Transfer werden zwei unterschiedliche Systeme verwendet, das Tank-Blot-System und Semidry-Blot-System, welche sich nur im Aufbau und eingesetzten Puffermengen unterscheiden.

Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (monoklonal oder polyklonal) identifiziert werden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschritten mit Puffern, die Detergentien enthalten, wieder entfernt. Weil die Renaturierung nicht vollständig ist, können bei Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch nur ein Epitop am Protein erkennen, Probleme auftreten.

### **2.6.2 TRAIL und Kaspase-8 Expression**

Zur Bestimmung der durch Ad/TRAIL-F/RGD eingeleiteten Apoptose sind anhand einer Western Blot-Analyse die TRAIL und Kaspase-8 Expression (bzw. ihre aktivierte

Abspaltungsform) in Karzinomzellen nach 24 Std. Behandlung mit der Western Blot Methode bestimmt worden. Als Vektorkontrolle ist Ad/CMV-GFP und als Plazebo PBS verwendet worden. Die mit adenoviralen Vektoren behandelten Tumorzellen sind mit 1000 und 2000 Viruspartikeln/Zelle infiziert und danach für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert worden. Zum Ernten der Zellen sind die Schalen nach Entfernung des Mediums mit kaltem PBS gewaschen und danach mit 300µl denaturierendem Laemmli–Lyse-Puffer (25 ml 0,5M Tris pH 6.8 (Sigma, USA), 10 ml 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Pharmacia, USA), 10 ml Glycerol (Merck, USA), 50µl 10% Bromophenol Blue (Aldrich, USA) versetzt und zur Zellyse 10 Minuten auf Eis gestellt worden. Nach eingetretener Zellyse ist das Lysat mit einem Zellschaber (Costar Corporation, USA) vom Grund der Platte abgelöst, in Eppendorf-Röhrchen (1,5ml) pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren worden. Gleiche Proteinmengen des Lysates sind in eine Gelform gegeben worden mit einem 4%igen SDSPolyacrylamid-Gel (6,2 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 0,5M Tris pH 6,8, 100µl SDS 10 %, 1,3 ml Acrylamid 30 %, 50 µl APS 10 %, 5 µl TEMED). Nach der Proteinaufteilung in dem Gel sind in einer Transferkammer (TE 22 Mighty Small Transpher Tank Transfer Unit, Amersham Pharmacia Biotech, USA), mit einem Puffer bestehend aus 6,05 g Tris, 28,9 g Glycin, und 400 ml Methanol (Merck, USA), der mit Aqua destillata bis 2 Liter aufgefüllt worden ist, die Proteine bei 100 V und 400 mA über eine ¾ Stunde auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Life Science, USA) übertragen worden. Die proteinbeladenen Nitrozellulosemembranen sind danach in einer Lösung aus Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS mit 1/1000 Tween® 20 (Aldrich, USA) bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt worden. Während der Inkubation mit den Antikörpern sind die Nitrozellulosemembranen in einer Lösung aus 1x PBS mit 5% Trockenmilch (Hipp) und



1/1000 Tween® 20 auf dem Shaker (Promax 2020 von Heidolph) mit einer Geschwindigkeit von 125/min bewegt worden. Ein Wechsel der Lösung ist dabei nach 15, 20 und 25 Minuten erfolgt. Zuletzt ist eine 1%ige Trockenmilchlösung in PBS hergestellt und die Membranen mit den primären Antikörpern Kaninchen anti-Kaspase-8 und anti-TRAIL (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert worden.  $\beta$ -Actin ist als Ladungskontrolle verwendet worden. Danach sind die Membranen mit einer 1%igen Trockenmilchlösung in PBS mit dem zweiten Peroxidase-konjugiertem Antikörper inkubiert und die Banden mittels Röntgenaufnahmen sichtbar gemacht worden.

## **2.7 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Stärke der Transduktion eines adenoviralen Vektors kann durch das eingeschleuste Gen und die dadurch eingeleitete Proteinexpression des „grün fluoreszierenden Proteins“ (GFP) unter einem Fluoreszenzmikroskop direkt visualisiert werden. Um eine mögliche Infektion und nachfolgenden toxischen Effekt eines TRAIL exprimierenden adenoviralen Vektor auf mesenchymale Stammzellen zu testen, haben wir unseren Vorgängervektor Ad/gTRAIL, der das Fusionsgen *GFP/TRAIL* enthält, verwendet. Als Kontrolle zu den mesenchymalen Stammzellen ist die humane Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 verwendet worden. Die Transfektion ist mit Ad/CMV-GFP (Vektorkontrolle), Ad/gTRAIL und Ad/TRAIL-F/RGD in Dosierungen von 500-5000 VP/Zelle erfolgt. Nach 72 Std. Behandlung ist die Effizienz der Infektion durch den direkt visuellen Nachweis des GFP-Proteins aufgezeigt worden. Dazu ist ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Nikon (Nikon Eclipse TE300, Nikon, Melville, NY, USA)

verwendet und die GFP-Expression bei Ad/CMV-GFP und Ad/gTRAIL mit der „MetaMorph imaging Software“ (Universal Imaging Corp., Downington, PA, USA) analysiert worden.

## **2.8 Entwicklung von Tumormodellen in Nacktmäusen (73)**

Ein Schwerpunkt der Arbeit ist die Entwicklung von mehreren orthotopen und Metastasentumormodellen gewesen. Um die Rahmenbedingungen und Prozeduren gut nachvollziehen zu können, sind die Arbeiten detailliert beschrieben worden.

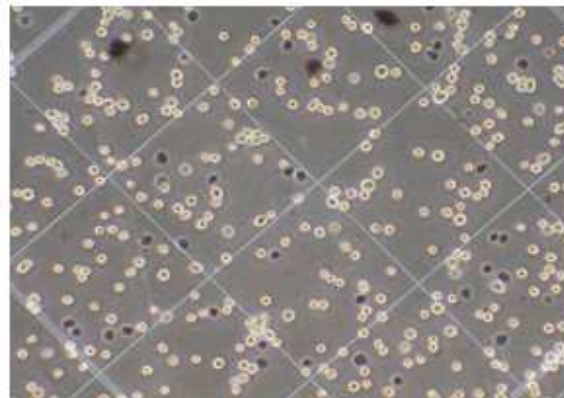
### **2.8.1 Präparation der Tumorzellen**

Voraussetzung für ein erfolgreiches Tumormodell ist eine gesunde Zellkultur. Vor dem Ernten der Zellen müssen Kontaminationen wie z.B. mit Sprosspilzen oder Mykoplasmen durch regelmäßige mikroskopische Beobachtung bzw. PCR-Analyse ausgeschlossen werden. Die Wahl des Mediums und Serums ist für die Qualität der Zellen und dem späteren Wachstum im Tier von großer Wichtigkeit. Sehr gute Ergebnisse sind in unseren Experimenten mit Zelllinien erzielt worden, die in „Dulbecco`s Modified Eagles Medium“ (DMEM) mit einem hohen Glucoseanteil oder RPMI 1640 gewachsen sind und einen Zusatz von 10% (vol/vol) hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FBS), 1% Glutamin und 1% Penicillin/ Streptomycin (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, USA) enthalten haben. Die Zellen sind bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> Anteil kultiviert worden.

Zum Erntezeitpunkt sind die Zellen zu 70-80% konfluierend gewesen. Da sie sich dabei in einer sehr aktiven Wachstumsphase befunden haben, ist ein gesteigertes Anwachsen

gewährleistet gewesen. Zwei bis drei Stunden vor dem Ernten ist das Medium komplett erneuert worden, wodurch absterbende und tote Zellen entfernt worden sind, die eventuell die Konzentration der Injektionsdosis negativ hätten beeinflussen können. Zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale sind 2-3ml Trypsin-EDTA verwendet worden (Gibco, USA).

Dabei sind die Zellen der Trypsinisation nur sehr kurz ausgesetzt gewesen (2-3 Minuten), um eine Schädigung zu vermeiden. Bei Beginn der Zellablösung, ist das Trypsin mit frischem Medium in einem 10:1 oder 5:1 Medium:Trypsin Verhältnis (inklusive Serum) antagonisiert worden. Danach hat sich eine sofortige Zentrifugation der Zellen bei 1500 U/Min für 2-5 Minuten angeschlossen, wonach eine zweimalige Waschung mit phosphat-buffered saline (PBS) und eine wiederholte Zentrifugation erfolgt ist, um Trypsinspuren und Zelldetritus zu beseitigen. Anschließend sind die Zellen sofort auf Eis gelagert worden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen mit einem Hämozytometer gezählt worden, wobei eine möglichst hohe Anzahl an vitalen Zellen vor der Injektion zu gewährleisten ist, da der Erfolg des Tumormodells proportional von dem Anteil vitaler Zellen abhängt. Daher sollten vor dem Zählen die Zellen mit Trypanblau angefärbt werden, um die toten Zellen zu identifizieren und nicht mitzuzählen. Die Injektionslösung, besonders bei Metastasenmodellen, sollte mehr als 90% lebendige Zellen enthalten, da letztendlich weniger als 0.1% der injizierten Zellen Metastasen produzieren (66, 75).



**Abb.9:** Färbung der zu injizierenden Zellen mit Trypanblau vor dem Zählen, um die toten Zellen (hier dunkle Punkte) zu identifizieren.

Zur Herstellung der Injektionslösung ist PBS verwendet worden. Die Zellen sollten innerhalb von 1-2 Stunden nach dem Ernten injiziert werden, wobei die optimale Konzentration kurz vor der Injektion hergestellt wird.

### **2.8.2 Vorbereitung der Nacktmäuse**

Die Tierexperimente in dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit den „*Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals*“ (National Institutes of Health publication number 85-23) und den Institutsrichtlinien der Universität von Texas, M.D. Anderson Cancer Center, USA, durchgeführt worden. Es sind in den Experimenten ausschließlich weibliche, athymische Nacktmäuse (Nu/Nu) verwendet worden. Es wird empfohlen, sehr junge Tiere zu verwenden (4-6 Wochen), da diese eine geringe Aktivität an natürlichen Killerzellen (NK) aufweisen (66, 75) und eine inverse Korrelation zwischen der NK-Aktivität und der Ausbildung von Metastasen besteht (76, 77). Zusätzlich verändern sich

im zunehmenden Alter hämodynamische Parameter wie der Gefäßdurchmesser und die Endothelstärke (78, 79), wodurch die Tumorgenese und/oder die Ausbildung von Metastasen negativ beeinflusst werden kann. Um einen Stresseinfluss auf die Tiere zu vermeiden, sind die Experimente frühestens 5 Tage nach der Ankunft begonnen worden, da ein negativer Einfluss von Stress auf die Ausbildung von Metastasen beobachtet worden ist (80, 81). Kontrovers wird die Bestrahlung der Tiere vor der Tumorinokulation diskutiert, die eine Unterdrückung des noch verbliebenen Immunsystems bewirken soll. Alle hier verwendeten Tiere sind 2-5 Tage vor der Zellinjektion einer Ganzkörperbestrahlung durch  $\text{Cs}^{137}$  mit 3.5 Gy in einem Nasatron (US Nuclear, Burbank, USA) ausgesetzt gewesen.

### **2.8.3 Vorbereitung der Tumorzellinjektion**

Die Inzidenz der Tumoren und/oder Metastasenausbildung ist proportional zu dem Anteil der vital injizierten Zellen (82). Jedoch führt eine Erhöhung der vitalen Zellanzahl nicht automatisch zu mehr Metastasen oder einem größeren Tumolvolumen (83). Von größter Bedeutung ist die konsistente Durchmischung der Zellen, damit jede Injektion die gleiche Zellzahl und den gleichen Anteil vitaler Zellen beinhaltet. Bei der Injektionsvorbereitung sollte das Aufziehen der Zellen in die Spritze ohne Nadel geschehen, da die Nadel einen starken Unterdruck verursacht, der zu Zellschäden führen kann. Zusätzlich sollte die Nadel nicht zu groß sein, da bei einem großen Stichkanal in Organe die Injektionslösung in die freie Bauchhöhle zurückfließen und zu unerwünschten Tumorabsiedlungen führen kann. Schließlich ist es von größter Wichtigkeit, die Zellen in der Spritze regelmäßig und besonders vor der Injektion durchzumischen. Die in PBS gelösten Zellen sinken schnell auf den Grund der Spritze

oder des Röhrchens und kleben aneinander, wodurch Zellklumpen gebildet werden. Diese Zellklumpen behindern die Ausbreitung und damit das metastatische Potential und können bei Gefäß- oder Organinjektionen zu einem embolischen Gefäßverschluss mit plötzlichem Tod des Tieres führen. Zusätzlich sollten die Zellen direkt vor der Injektion auf Raumtemperatur erwärmt werden und das verwendete Injektionsvolumen sollte nicht kleiner als 50 µl sein, um eine Gleichheit der Zellanzahl zu gewährleisten.

#### **2.8.4 Anästhesie der Nacktmäuse**

Die in den Experimenten verwendeten Tiere sind mit einer intraperitonealen Injektion eines Ketamin-HCL (150mg/Kg/KG) und Xylazin (10mg/kg/KG)-Gemisches narkotisiert worden. Dabei ist die intraperitoneale Injektion in einem flachen Winkel in den Unterbauch durchgeführt worden, um Leber- und Darmverletzungen zu vermeiden. Zusammen mit dem Operationstrauma ist wegen der bestehenden Neigung der Nacktmäuse zur Hypothermie, die zu einem letalen Verlauf führen kann, eine Heizplatte während der Operation bis zur Rekonvaleszenz der Tiere eingesetzt worden.

#### **2.8.5 Prozeduren**

Die Injektions- oder Inzisionsstellen sind vor dem Eingriff mit Ethanol desinfiziert worden. Für den Hautverschluss ist ein Klammergerät (MikRon Autoclip; Becton Dickinson, Sparks, USA) benutzt worden. Fünf Tage nach der letzten Behandlung in dem Experiment I und der intrahepatischen Zellinjektion in dem Experiment II sind die Klammern entfernt worden. Kein Tier hat dabei eine Wundheilungsstörung oder -infektion gezeigt.

## **2.8.6 Orthotope chirurgische Tumorimplantation**

### **2.8.6.1 Allgemein**

Dieses Tumormodell wird auch als „surgical orthotopic implantation“ (SOI) bezeichnet und ist eines der ältesten Verfahren zur Tumoretablierung in Tierversuchen und kann in den meisten Organen erfolgreich durchgeführt werden. Ziel der SOI ist es, größenkonstante und gut reproduzierbare Tumoren zu bilden. Die Implantationen können mit einem Mikro-Nadelhalter und einem resorbierbaren Faden der Stärke 6-0 bis 8-0 durchgeführt werden.

Bei der Methode werden initial Tumoren produziert, die als Grundstock für die SOI dienen. Zu diesem Zweck sind ca.  $4-8 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS gelöst und in die dorsalen Flanken einer 4-8 Wochen alten Nacktmaus injiziert worden. In unseren Experimenten haben die Tumoren den gewünschten Durchmesser von 1 cm nach 10-16 Tagen erreicht. Ist der Tumordurchmesser zu groß ( $>2$ cm) kommt es zur verstärkten Ausbildung von zentralen Tumornekrosen, die die Qualität des zu zerkleinernden Tumors negativ beeinflussen können. Nach Exstirpation des Tumors unter sterilen Bedingungen, ist der Tumor in einer Petrischale gründlich mit PBS gewaschen worden. Das zentrale, oft nekrotische Tumorgewebe ist exzidiert und der verbleibende Tumor mit dem Skalpell in Schnitten von etwa  $1.5 \text{ mm}^3$  Größe aufgearbeitet worden.

Für die Operation müssen die Mäuse narkotisiert und (im Falle einer Pankreasimplantation) in Rechtsseitenlagerung gebracht werden. Danach sollte eine kleine linksseitige Flankeninzision durchgeführt und der Pankreasschwanz aus dem Abdomen mit einem kleinen Wattestäbchen vorsichtig herausgezogen werden. Bei der Implantation des Tumorstückchens muss darauf geachtet werden, dass der Knoten nicht zu fest angezogen wird, da es hierbei zur Ausbildung von Pankreasnekrosen

kommen kann. Insgesamt sind nur wenige, locker sitzende Knoten zu legen. Im Gegensatz zu anderen Autoren haben wir das Pankreas nicht zusätzlich inzidiert, um das Anwachsen des Tumors zu fördern. Nach erfolgreicher Implantation des Tumorgewebes wurden die Organe rückverlagert und die Wunde verschlossen.

*Verwendete Zelllinien: Capan-1, MiaPaCa-2, AsPC1.*

### Surgical Orthotopic Implantation (SOI)



**Abb.10:** Darstellung der SOI am Beispiel einer Pankreastumorimplantation (hier Capan-1) in den Pankreasschwanz einer Nacktmaus. Bild 1: Implantation des Tumorstücks in den Pankreasschwanz. Bild 2: Invasives Einwachsen des Tumors nach 14 Tagen makroskopisch und mikroskopisch (Bild 3).

#### 2.8.6.2 Experiment I (83)

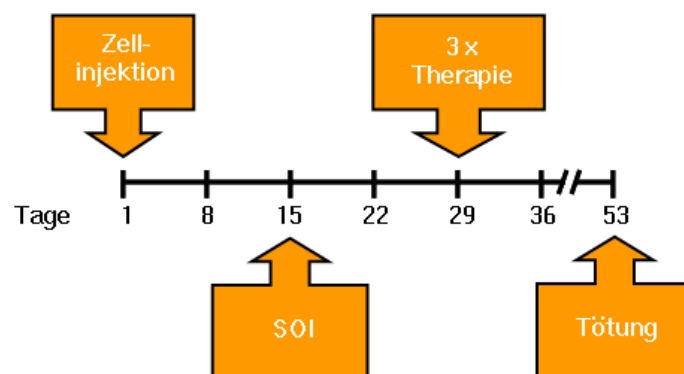
Zur Etablierung eines orthotopen Pankreastumormodels sind bei 3 Tieren  $4 \times 10^6$  Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 in 4 bis 6 Wochen alte nu-nu Nacktmäuse (Charles River Laboratories Inc., Washington, USA) subkutan in die Flanken injiziert worden. Nach 2 Wochen sind die Tumoren aseptisch reseziert und in  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  mm große Stücke geschnitten worden. In gleicher Sitzung ist bei den



Mäusen die Haut 1cm direkt über der Milz inzidiert und das Tumorstück an dem Pankreasschwanz mit einer PDS Naht 6-0 (Ethicon, USA) fixiert worden (83).

Nach 2 Wochen sind die Tiere in 3 Gruppen zu 5 je Tieren randomisiert worden (Gruppe 1: PBS (Kontrolle); Gruppe 2: Ad/CMV-GFP (Viruskontrolle); Gruppe 3: Ad/TRAIL-F/RGD. Die Behandlung der Studientiere ist am 14, 16 und 18 Tag nach der chirurgischen orthotopen Implantation (SOI) durchgeführt worden. Jede Behandlung hat aus einer Relaparotomie und einer intratumoralen Injektion von  $5 \times 10^{10}$  Viruspartikel in 50  $\mu$ l PBS in den beiden Virusgruppen und 50  $\mu$ l PBS in der Kontrollgruppe bestanden (83).

Fünf Wochen nach der Tumorumplantation sind die Tiere mit einer Mikro-Computer-Tomografie untersucht und einen Tag danach getötet worden. Das Tumolvolumen der resezierten Tumoren ist mit der Formel:  $a \times b^2/2$  (a= längster Durchmesser, b= kürzester Durchmesser) berechnet worden (84).



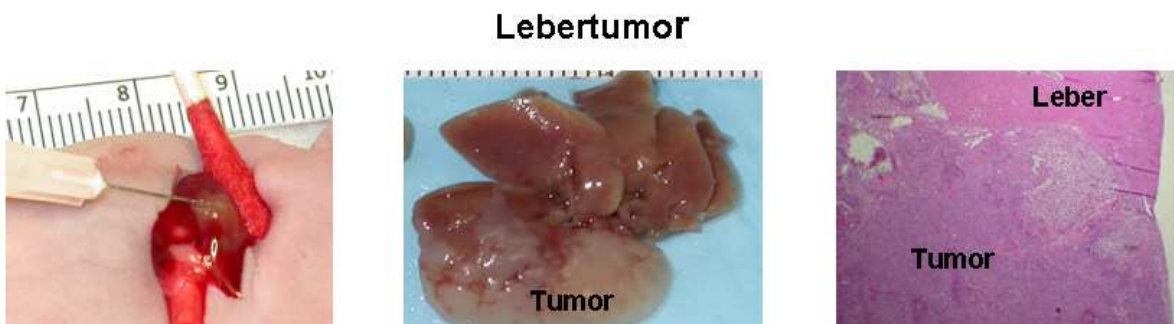
**Abb.11:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des orthotopen Pankreastumormodells (Experiment I).

## 2.8.7 Direkte Leberinjektion von Tumorzellen

### 2.8.7.1 Allgemein

Bei diesem Tumormodell bietet sich der linkslaterale Leberlappen auf Grund seiner Größe und guten Darstellbarkeit besonders an. Bei der Injektion sollte eine direkte Berührung der Leber mit einer Pinzette aufgrund des fragilen Gewebes vermieden werden. Initial wird eine 2,5 cm lange transversale Inzision, direkt über dem Xyphoid beginnend, durchgeführt. Die Zellsuspension sollte lappenrandnah, direkt subkapsulär, injiziert werden. Dadurch verringert sich die Gefahr einer direkten Injektion in größere Gefäße mit nachfolgender Embolisation. Die erfolgreiche Injektion lässt sich zeitnah durch eine Braun- bzw. Gelbfärbung des Gewebes erkennen. Dieses Phänomen tritt bereits nach Applikation von 25 µl auf und persistiert für etwa 1-2 Minuten. Nach Entfernung der Nadel sollte die Injektionsstelle für ca. 1 min. mit einem Tupfer komprimiert werden, um die Blutung zu stoppen und eine Tumorzellverschleppung in die Bauchhöhle zu vermeiden. Typischerweise kommt es nach 1-3 Wochen zur Ausbildung eines lokalen Tumors im Bereich der Injektionsstelle.

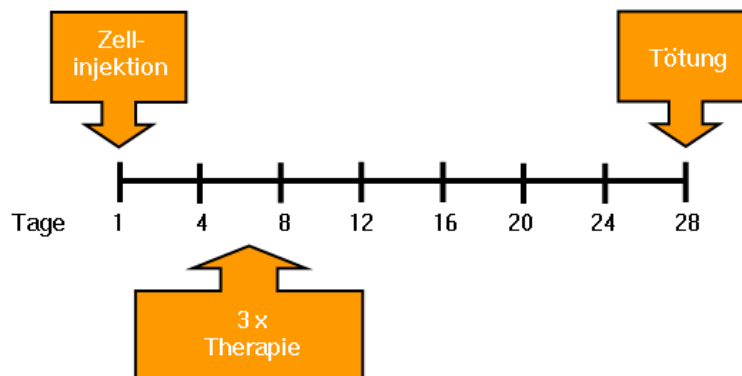
*Verwendete Zelllinien: Capan-1, Mia PaCa-2, AsPC-1, Hep 3b.*



**Abb.12:** Darstellung der direkten Tumorzellinjektion (hier Capan-1) in die Leber in einer Nacktmaus. Bild 1: Subkapsuläre Injektion. Bild 2: Isoliertes Tumorwachstum in den mit Tumorzellen behandelten Leberlappen nach 28 Tagen makroskopisch und mikroskopisch (Bild 3).

### **2.8.7.2 Experiment II (84)**

Zur Etablierung dieses Pankreasmastasentumormodels sind  $1 \times 10^6$  Capan-1 Pankreaskarzinomzellen in den links-lateralen Leberlappen von 4 bis 6 Wochen alten nu-nu Nacktmäusen (Charles River Laboratories Inc., Washington, USA) injiziert worden. Vor der Behandlung sind die Mäuse randomisiert und in fünf Gruppen mit je fünf Tieren eingeteilt worden (Gruppe 1: Ad/CMV-LacZ; Gruppe 2: Ad/TRAIL-F/RGD; Gruppe 3: Gemcitabin 25 mg/kg/KG; Gruppe 4: Ad/CMV-LacZ + Gemcitabin 25 mg/kg/KG; Gruppe 5: Ad/TRAIL-F/RGD + Gemcitabin 25 mg/kg/KG). Vier Tage nach der Zellinjektion ist die Therapie begonnen worden. Dabei sind  $5 \times 10^{10}$  VP Ad/CMV-LacZ oder Ad/TRAIL-F/RGD über die Schwanzvene und je nach Versuchsgruppe Gemcitabin mit 25 mg/kg/KG (in 500  $\mu$ M PBS aufgelöst) intraperitoneal injiziert worden. Die Behandlungen sind dreimal in einem Abstand von zwei Tagen wiederholt worden. Nach 28 Tagen ist die Tötung aller Tiere erfolgt und die Leber, Milz, Pankreas, Lungen, Nieren und das Gehirn sind entnommen und auf Metastasen hin untersucht worden. Dabei ist jede Leber in 3 Schnitte mit einem Abstand von 20  $\mu$ M unterteilt und die sichtbare Tumorfläche mit der Software Optimas (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA) vermessen worden.



**Abb.13:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Pankreaskarzinommetastasenmodells in der Leber (Experiment II).

### 2.8.8 Direkte Pankreasinjektion von Tumorzellen

Bei der direkten Tumorzellinjektion in das Pankreas führen die Injektionen im Gegensatz zu direkter Zellapplikation in die Leber und Milz kaum zu vaskulären Embolisierungen. Empfohlen wird eine 27-G-Nadel für die Injektion mit einem maximalen Injektionsvolumen von 50  $\mu$ l. Bei der Injektion wird der Pankreasschwanz vorsichtig mit einer Kompresse aus dem Situs gezogen und mit 2 Wattestäbchen aufgespannt. Danach folgt der vorsichtige Vorschub der Nadel in das Parenchym auf ca. 2 cm Länge. Die Injektion der Tumorzellen sollte langsam erfolgen. Im Falle der erfolgreichen Injektion lässt sich nach 25  $\mu$ l appliziertem Volumen eine kleine Blasenbildung nachweisen.

Nach Entfernung der Nadel sollte auch bei diesem Verfahren für ca. 10-20 Sek. eine leichte Kompression mit einem Tupfer auf die Injektionsstelle ausgeübt werden, um eine

Tumorzellaussaat in die Bauchhöhle zu vermeiden. Danach erfolgt die Rückverlagerung der Organe und der Verschluss des Situs mit Klammern oder einer Naht (73).

*Verwendete Zelllinien:* Capan-1, Mia PaCa-2, AsPC-1, Panc-1.



**Abb.14:** Darstellung der direkten Tumorzellinjektion (hier AsPC-1) in das Pankreas in einer Nacktmaus. Bild 1: Herausziehen des Pankreasschwanzes mit Milz und direkte Injektion der Tumorzellen. Bild 2: Tumorwachstum in dem Pankreasschwanz nach 14 Tagen makroskopisch und mikroskopisch (Bild 3).

### 2.8.9 Portalveneninjektion von Tumorzellen

Zur Durchführung der Portalveneninjektion wird die Maus auf dem Rücken gelagert und die Extremitäten mit Tape umwickelt und das Tier auf einem Styroporbrett fixiert. Danach folgt eine quere Oberbauchlaparotomie von ca. 2 cm Länge, beginnend 0,5 cm unterhalb des Xyphoids. Nach vorsichtiger Verlagerung der die Portalvene überdeckenden Dünndarmschlinge mit einem Wattestäbchen stellt sich die Portalvene zwischen den Leberlappen dar. Vor der Injektion wird ein sehr leichter Zug auf die Portalvene ausgeübt, damit diese sich anspannt und dadurch einen gut sichtbaren Durchmesser zeigt. Eine erfolgreiche Injektion zeichnet sich neben einer geringen

Nachblutung aus der Injektionsstelle durch eine direkt nach der Injektion einsetzende Braun- oder Gelbfärbung der Leberlappen aus. Dieser Vorgang dauert ungefähr 30 Sekunden. Das Injektionsvolumen sollte 100 µl nicht überschreiten. Nach unserer Erfahrung hat es sich nicht bewährt, mehr als 1 Mio. Tumorzellen zu applizieren, da es ansonsten in etwa 50% der Fälle zu letalen Verläufen auf Grund einer akuten Gefäßembolie. Eine Gesamtzahl von 250.000-500.000 Zellen scheint die bestverträglichste Zellmenge zu sein, die mit ausreichend großer Sicherheit ein Tumorwachstum in allen Lappen hervorrufen kann. Nach erfolgreicher Blutstillung wird der Situs nach Rückverlagerung aller Organe vorsichtig über eine Hautnaht geschlossen werden (73).

*Verwendete Zelllinien: Capan-1, Mia-PaCa-2, MDA-MB-231, DLD-1*



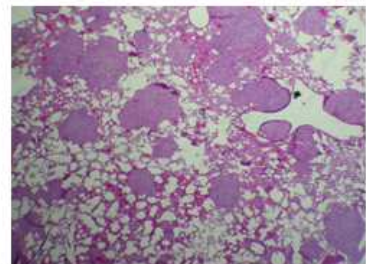
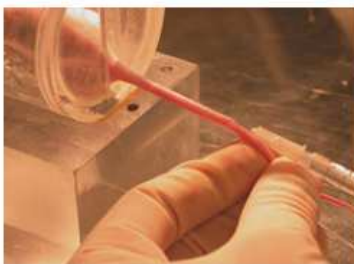
**Abb.15:** Darstellung der Portalveneninjektion (hier Mia PaCa-2) in einer Nacktmaus. Bild 1: Injektion in die Pfortader. Bild 2: Tumorwachstum in allen Leberlappen nach 10 Tagen makroskopisch. Bild 3: Mikroskopische Darstellung von Tumorzellnestern nach 7 Tagen.

### 2.8.10 Schwanzveneninjektion von Tumorzellen

Ziel der Schwanzveneninjektion ist es, Tumormetastasen in der Lunge zu produzieren. Von Vorteil ist bei diesem Modell, dass keine Analgosedierung erforderlich ist. Neben einer Wärmequelle zur Gefäßdilatation der Schwanzvene (warmes Wasser oder Rotlichtlampe) ist eine Halterung zur Fixierung der Maus, in der der Schwanz zum Operateur zeigt, notwendig. Ist der Schwanz erwärmt und die Venen sind sichtbar erweitert, kann die Injektion vorsichtig direkt in eine der lateralen Schwanzvenen erfolgen. Dabei sollte so weit distal wie möglich begonnen werden. Bei korrekter Lage der Nadel ist die Injektionslösung gut sichtbar. Für die Injektion von Viren, Medikamenten oder anderen Substanzen hat sich gezeigt, dass ein Applikationsvolumen von 50-300µl einer isotonen Lösung keinen wesentlichen hämodynamischen Effekt auf die Maus hat. Wegen der Gefahr eines embolischen Verschlusses empfiehlt es sich bei Zelinjektionen, nicht mehr als 2 Mio. Zellen zu applizieren, die in einem Volumen von 200-300 µl gelöst sind (85).

*Verwendete Zelllinien:* Mia PaCa-2, MDA-MB 231

#### Lungenmetastasen



**Abb.16:** Darstellung der Schwanzveneninjektion (hier Mia PaCa-2) in einer Nacktmaus.

Bild 1: Injektion in die Schwanzvene. Bild 2: Tumorwachstum in allen Lungenlappen nach 7 Tagen makroskopisch und mikroskopisch (Bild 3).

## **2.9 Mikro-Computertomografie**

Zur Bestimmung des Tumorwachstums in lebenden Tieren sind Untersuchungen an einem Mikro-Computertomogramm (General Electric Medical Systems, model RS-9, London, Kanada) in dem Institut für Veterinärmedizin des M.D. Anderson Cancer Center Houston, USA durchgeführt worden (83).

## **2.10 Messung der Leberenzyme ASAT und ALAT**

Zur Untersuchung einer vektorbedingten Lebertoxizität sind die Transaminasen Aspartat Aminotransferase (ASAT) und Alanin Aminotransferase (ALAT) von allen Tieren vor der Behandlung, 3 Tage nach der letzten Behandlung und am Ende des Experiments durch die Entnahme aus der Schwanzvene bestimmt worden.



## **2.11 Statistik**

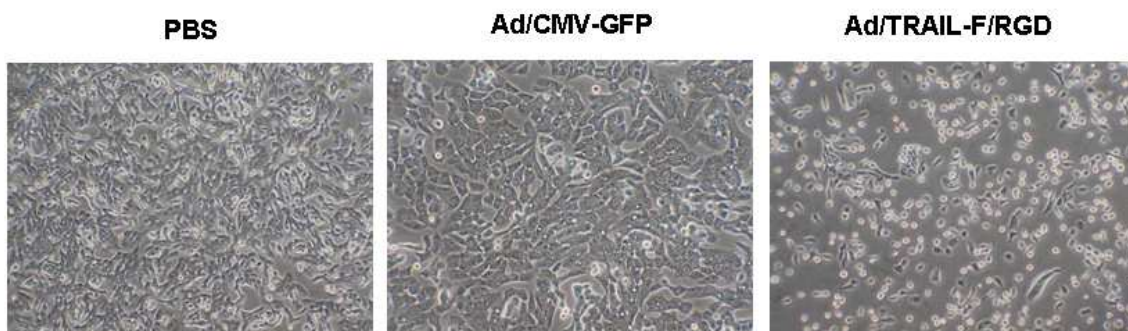
Der Effekt der Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin ist mittels der CalcSyn Software (Biosoft, Camebridge, England) berechnet worden, die einen synergistischen, additiven oder antagonistischen Effekt durch den Kombinationsindex (Combination Index, CI) angibt. Das Tumorareal der Leberschnitte ist mit der Optimas imaging analysis software (Media Cybernatics, Silver Spring, USA) gemessen und analysiert worden. Statistische Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sind dabei mit ANOVA unter Verwendung des Statistica Software Programms (StatSoft, Tulsa, OK, USA) ausgewertet worden, wobei ein  $p < 0.05$  als signifikant festgelegt worden ist.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse (Experiment I) (83)

#### 3.1.1 Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD unter dem Lichtmikroskop

Der zytotoxische Effekt des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD ist zuerst an der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 getestet worden. Die Behandlung der Tumorzellen mit Ad/TRAIL-F/RGD in einer Konzentration von 2000 Viruspartikeln/ Zelle hat dabei nach 48 Std. zu einem massiven Zelluntergang geführt, was sich an den geschrumpften und nicht mehr adhärennten Zellen gezeigt hat. Dagegen haben die Behandlung mit der Plazebokontrolle PBS sowie die Transfektion der Zellen mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP in gleicher Dosierung keine Anzeichen einer Zelltoxizität unter dem Lichtmikroskop gezeigt.

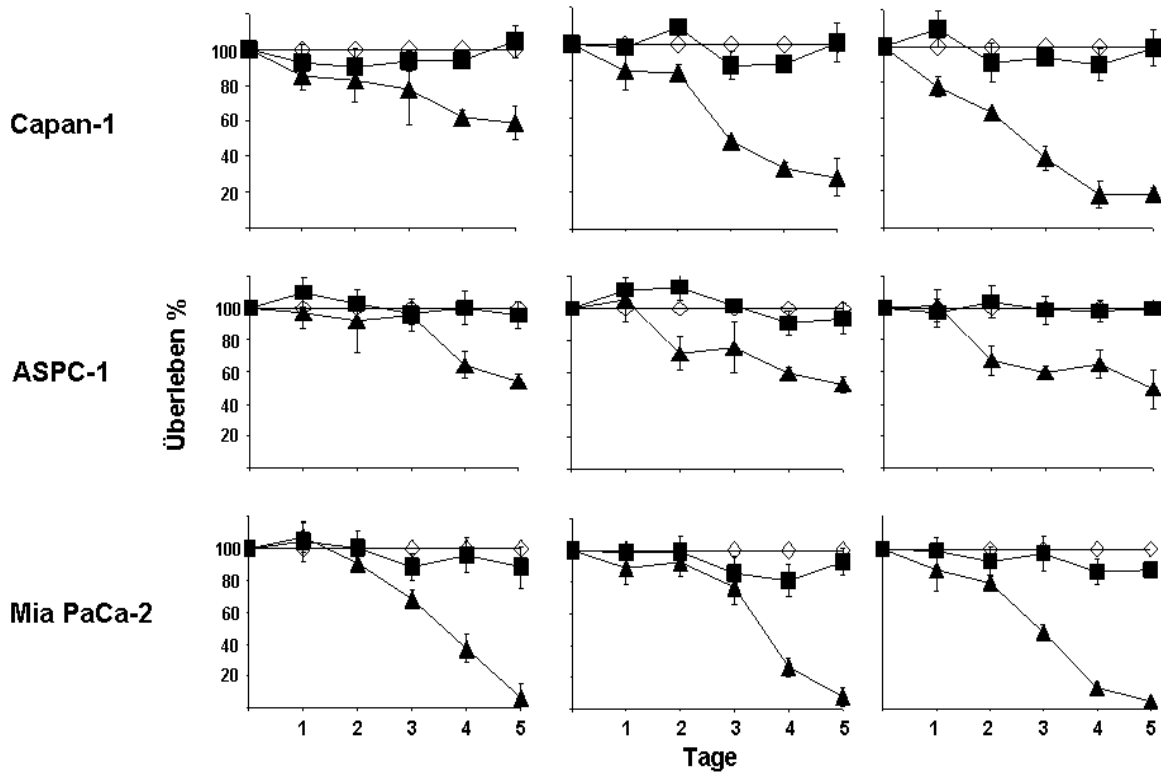


**Abb.17:** Die Behandlung der Pankreaskarzinomzellen (Capan-1) hat in der Plazebokontrolle mit PBS und Vektorkontrolle mit Ad/CMV-GFP zu keinem sichtbaren Zelluntergang geführt. Dagegen ist der Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD ein deutlicher Verlust der Zelldichte und Morphologie gefolgt.

### 3.1.2 Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD im XTT-Test

Um den zelltötenden Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD weiter zu untersuchen, sind Pankreas- (Capan-1, AsPC-1, Mia PaCa-2), Hepatozelluläre- (Hep G2, Hep 3b), Kolon- (DLD-1, SW 620) und Lungenkarzinomzelllinien (H358, H460) mit Ad/TRAIL-F/RGD und dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP in einer Dosierung von 500, 1000 und 2000 VP/Zelle behandelt worden. PBS ist als Plazebokontrolle verwendet worden. Die Ergebnisse haben eine deutliche Abnahme des Zellwachstums und damit einen Zelluntergang in allen untersuchten Tumorzelllinien und Dosierungen gezeigt. Ein Nachweis des Zelluntergangs hat in den meisten Zelllinien nach 48 Std. eingesetzt, nachdem das TRAIL-Protein synthetisiert worden ist. Interessanterweise hat die Pankreaskarzinomzelllinie Mia PaCa-2, in der eine geringe Expression des CA-Rezeptors nachgewiesen worden ist (30), einen deutlich gesteigerten toxischen Effekt bei einer niedrigen Dosierung von 500 VP/Zelle gezeigt, was auf eine gesteigerte Transduktion aufgrund des RGD-Motivs hindeutet. Des Weiteren hat die Konzentrationssteigerung von 1000 VP/Zelle auf 2000 VP/Zelle nur in wenigen Ausnahmen zu einer deutlichen Zunahme der Zelltoxizität geführt. Dieses lässt sich mit dem „Bystander-Effekt“ erklären, wobei nachgewiesen worden ist, dass mit dem *TRAIL* Gen transduzierte Zellen ihre Nachbarzellen durch Interaktionen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche beeinflussen und über Zellbotenstoffe zu einem vermehrten Zelluntergang führen (44, 86). Eine virale Dosiserhöhung erreicht somit nicht wesentlich mehr Zellen und führt daher auch nicht zu einer signifikanten Toxizitätszunahme.

### 3.1.2.1 Pankreaskarzinomzelllinien

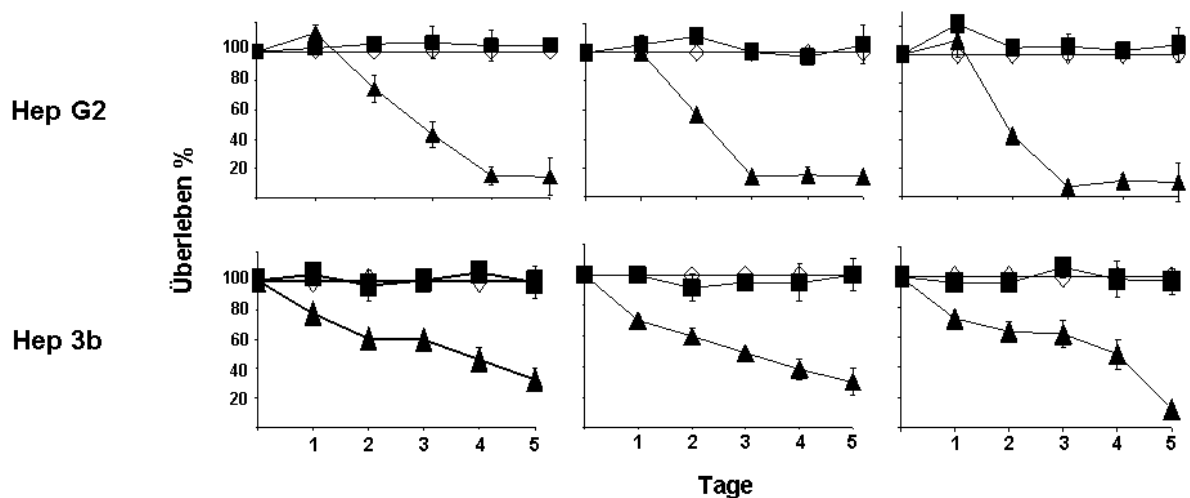


**Abb.18:** Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD *in vitro* in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1, AsPC-1 und MiaPaCa-2, gemessen mit einem XTT-Test. Mit PBS behandelte Zellen sind als Kontrolle verwendet und auf 100% Vitalität festgesetzt worden. (◇) PBS, (■) Ad/CMV-GFP, (▲) Ad/TRAIL-F/RGD. Die Zellen sind mit (von links nach rechts) 500, 1000 und 2000 VP/Zelle infiziert und der Verlauf über 5 Tage gemessen worden.

Alle drei behandelten Pankreaskarzinomzelllinien haben mit einer Vitalitätsreduzierung sensitiv auf die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD reagiert. Am frühesten ist dieser Effekt bei Capan-1 Zellen nach dem ersten Behandlungstag eingetreten, wogegen die

Zelllinien ASPC-1 und Mia PaCa-2 erst ab dem zweiten Tag eine reduzierte Zellproliferation aufgewiesen haben. Eine Dosissteigerung von 500 VP/Zelle auf 1000 VP/Zelle hat nur bei Capan-1 Zellen zu einer deutlichen Zunahme des Toxizitätseffektes geführt, der sich durch eine weitere Dosissteigerung auf 2000 VP/Zelle allerdings nur geringfügig erhöhen lassen. Dagegen sind die Kurven der Zelllinien ASPC-1 und Mia PaCa-2 fast identisch in den Dosierungen mit 500 und 1000 VP/Zelle verlaufen und haben sich in einer weiteren Dosissteigerung auf 2000 VP/Zelle nicht weiter unterschieden. Eine Eigentoxizität des Kontrollvektors Ad/CMV-GFP hat sich in den drei Pankreaszelllinien und verschiedenen Dosierungen nicht nachweisen lassen.

### 3.1.2.2 Hepatozelluläre Karzinomzelllinien

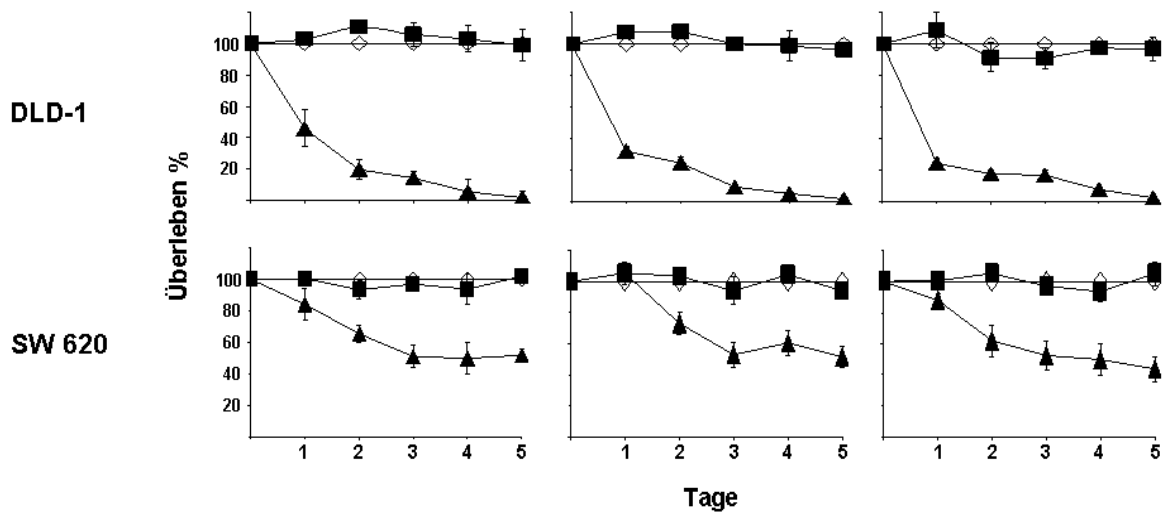


**Abb.19:** Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD *in vitro* in den humanen Hepatozellulären Karzinomzelllinien Hep G2 und Hep 3b, gemessen mit einem XTT-Test. Mit PBS behandelte Zellen sind als Kontrolle verwendet und auf 100% Vitalität festgesetzt worden. (◇) PBS, (■) Ad/CMV-GFP, (▲) Ad/TRAIL-F/RGD. Die Zellen sind

mit (von links nach rechts) 500, 1000 und 2000 VP/Zelle infiziert und der Verlauf über 5 Tage gemessen worden.

Die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD hat in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Zellproliferation geführt. Diese ist in der Zelllinie Hep 3b bereits am ersten Behandlungstag eingeleitet worden, im Gegensatz zu den Hep G2 Zellen, die erst nach zwei Tagen eine reduzierte Vitalität aufgewiesen haben. Jedoch haben die Hep G2 Zellen ab dem dritten Behandlungstag eine höhere Vitalitätsreduzierung im Vergleich zu den Hep 3b Zellen gezeigt, sodass ab dem vierten Tag nur noch 5% der Zellen vital gewesen sind. Eine Dosissteigerung auf 1000 VP/Zelle hat bei beiden Zelllinien nicht zu einer deutlichen Steigerung der Toxizität geführt. Eine Eigentoxizität des Kontrollvektors Ad/CMV-GFP hat sich bei beiden Zelllinien und in den verschiedenen Dosierungen nicht nachweisen lassen.

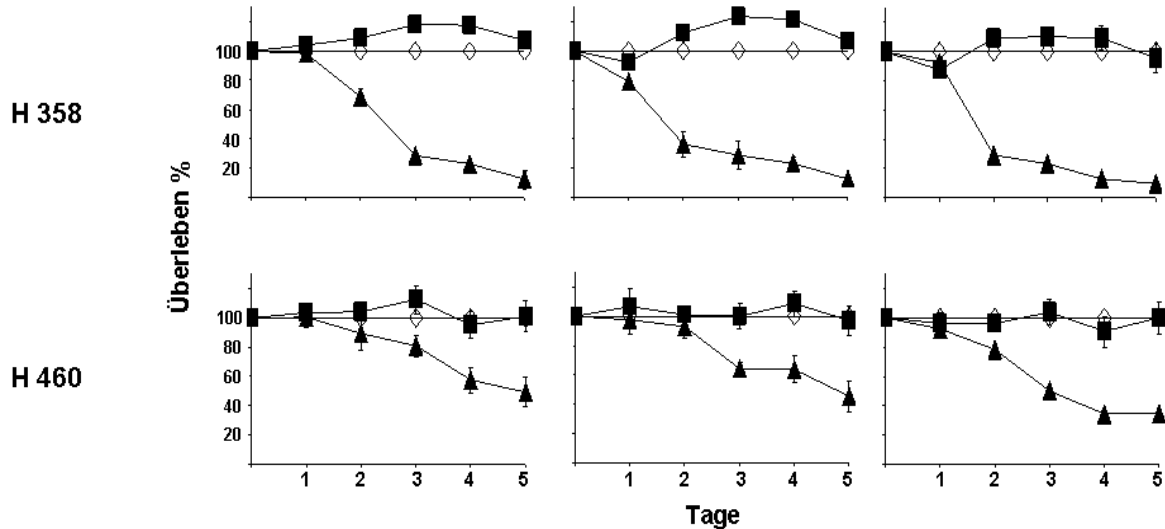
### 3.1.2.3 Kolonkarzinomzelllinien



**Abb.20:** Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD *in vitro* in den humanen Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und SW 620, gemessen mit einem XTT-Test. Mit PBS behandelte Zellen sind als Kontrolle verwendet und auf 100% Vitalität festgesetzt worden. (◇) PBS, (■) Ad/CMV-GFP, (▲) Ad/TRAIL-F/RGD. Die Zellen (von links nach rechts) sind mit 500, 1000 und 2000 VP/Zelle infiziert und der Verlauf über 5 Tage gemessen worden.

Auf die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD haben beide Tumorzelllinien mit einer deutlich einsetzenden Reduzierung der Vitalität ab dem ersten Behandlungstag reagiert. Dabei haben sich die DLD-1 Zellen als die sensitivere Zelllinie gezeigt, da bei der Dosierung von 500 VP/Zelle bereits nach 24 Std. über 50% der Zellen nicht mehr vital gewesen sind. Dagegen haben die SW 620 Zellen, die zu diesem Zeitpunkt „nur“ eine Reduktion von ca. 20% aufweisen können. Eine weitere Zunahme der Vitalitätsreduktion unter einer Dosiserhöhung bis zu 2000 VP/Zelle ist in beiden Zelllinien nicht nachgewiesen worden. Zusätzlich hat der Kontrollvektor Ad/CMV-GFP sowohl in DLD-1 als auch in SW 620 Tumorzellen keine Eigentoxizität aufgewiesen und ist beinahe identisch mit der PBS Kontrolle verlaufen.

### 3.1.2.4 Lungenkarzinomzelllinien



**Abb.21:** Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD *in vitro* in den humanen Lungenkarzinomzelllinien H358 und H460, gemessen mit einem XTT-Test. Mit PBS behandelte Zellen sind als Kontrolle verwendet und auf 100% Vitalität festgesetzt worden. (◇) PBS, (■) Ad/CMV-GFP, (▲) Ad/TRAIL-F/RGD. Die Zellen sind mit (von links nach rechts) 500, 1000 und 2000 VP/Zelle infiziert und der Verlauf über 5 Tage gemessen worden.

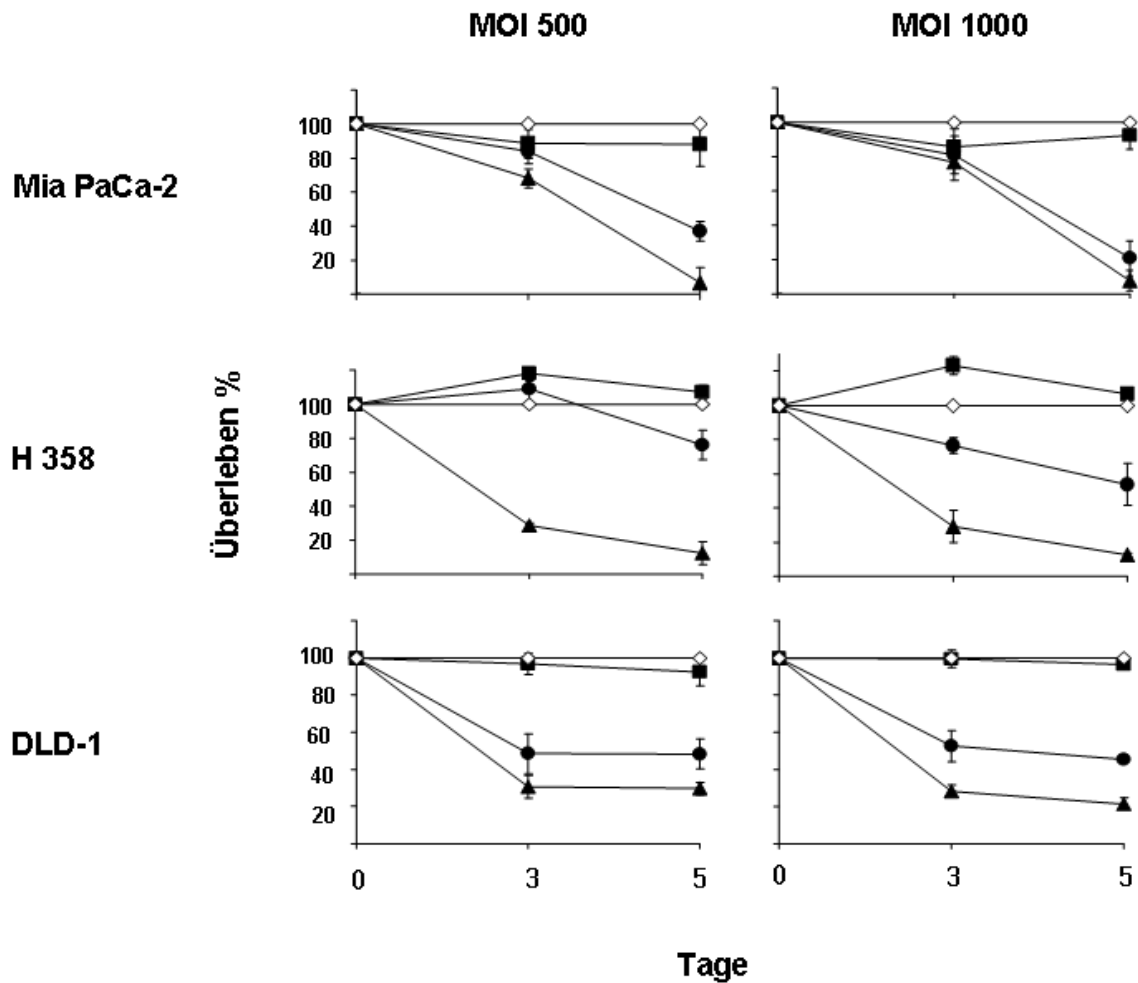
Die beiden exemplarisch dargestellten Lungenkarzinomzelllinien H 358 und H 460 haben beide sensitiv auf die Ad/TRAIL-F/RGD-Behandlung reagiert, wobei der Effekt der einsetzenden Tumorzellreduktion ab dem zweiten Tag unter einer MOI von 500 VP/Zelle bzw. ab dem ersten Tag unter der Dosierung von 1000 VP/Zelle eingetreten ist. Eine Dosissteigerung hat in der sensitiveren Zelllinie H 358 nur einen Unterschied an dem dritten Tag der Behandlung gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt sind unter der Behandlung mit 500 VP/Zelle noch 60% der Zellen vital im Vergleich zu 35% unter der



Behandlung mit 1000 VP/Zelle. Danach ist der weitere Verlauf in allen drei aufgezeigten Dosierungen beinahe identisch gewesen. Ein ähnlicher Verlauf hat sich auch bei den H 460 Zellen gezeigt. Am dritten Behandlungstag sind unter der Dosierung von 500 VP/Zelle noch 82% der Zellen vital, unter 1000 VP/Zelle 60% und mit 2000 VP/Zelle 51%. Allerdings ist der therapeutische Effekt nach fünf Tagen Behandlung in allen Dosierungen annähernd gleich bei 40%. Der Kontrollvektor Ad/CMV-GFP hat in beiden Zelllinien keine Eigentoxizität gezeigt und ist bis auf eine leicht gesteigerte Proliferation bei H 358 fast identisch mit der PBS Kontrolle verlaufen.

### **3.1.3 Vergleich des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD mit dem Vorgängervektor Ad/gTRAIL**

Nach der erfolgreichen Funktionalitätstestung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD in multiplen humanen Tumorzelllinien ist dessen antiproliferativer Effekt mit dem des nicht RGD-modifizierten Vorgängervektors Ad/gTRAIL verglichen worden, um die erwünschte Transduktionssteigerung unter niedrigeren Dosierungen zu bestätigen. Dazu sind Pankreas- (Mia PaCa-2), Lungen- (H 358) und Kolonkarzinomzellen (DLD-1) in einer Dosierung von 500 und 1000 MOI über fünf Tage behandelt und der zelltötende Effekt mit einem XTT-Test gemessen worden. Die dabei gewonnene Resultate haben in den drei untersuchten Zelllinien bei einer niedrigen Dosierung von 500 VP/Zelle zu einem deutlich gesteigerten zelltötenden Effekt des Ad/TRAIL-F/RGD gegenüber dem Vorgängervektor Ad/gTRAIL geführt. Dieser Effekt hat sich dabei sowohl bei Mia PaCa-2 Zellen mit einer sehr geringen CA-Rezeptorzell-dichte, als auch bei H 358 und DLD-1 Zellen mit noch unbekanntem CA-Rezeptorstatus gezeigt.

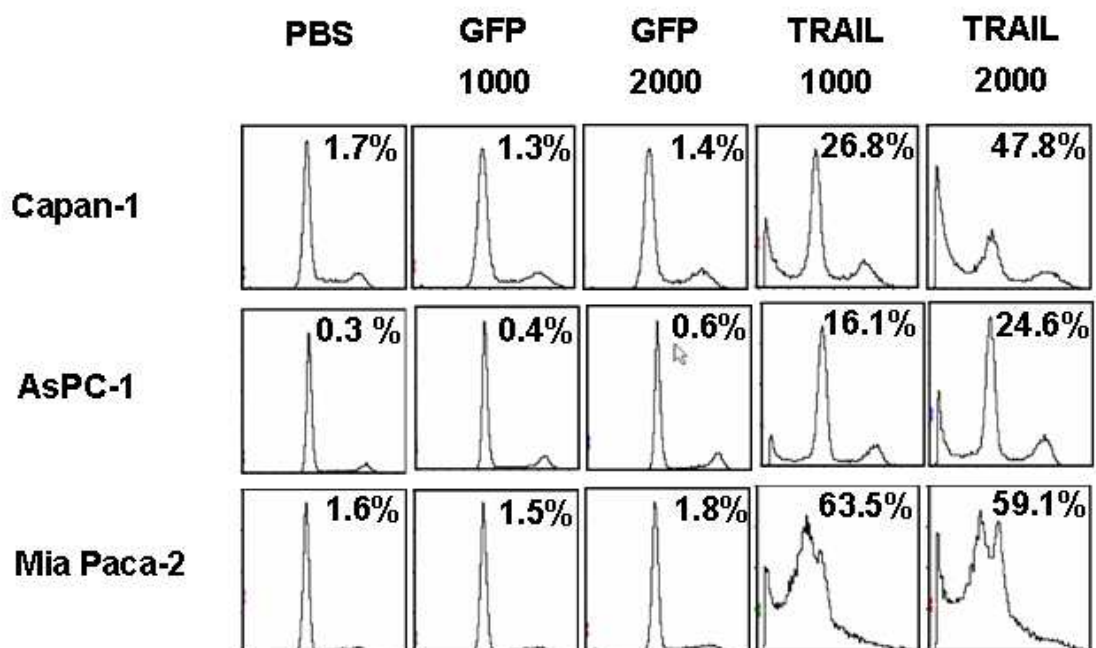


**Abb.22:** Zelltötender Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD im Vergleich zu dem Vorgängervektor Ad/gTRAIL in humanen Pankreas- (Mia PaCa-2), Lungen- (H358) und Kolonkarzinomzelllinien (DLD-1), gemessen mit einem XTT-Test *in vitro*. Mit PBS behandelte Zellen sind als Kontrolle verwendet und auf 100% Vitalität festgesetzt worden. (◇) PBS, (■) Ad/CMV-GFP, (●) Ad/gTRAIL und (▲) Ad/TRAIL-F/RGD. Die Zellen sind mit 500 (links) und 1000 (rechts) VP/Zelle infiziert und der Verlauf über 5 Tage gemessen worden.

### 3.1.4 Apoptoseinduktion durch Ad/TRAIL-F/RGD in der Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Apoptoseinduktion durch Ad/TRAIL-F/RGD ist die Sub-G<sub>1</sub> Population der verwendeten Zelllinien anhand einer durchflusszytometrischen Bestimmung quantifiziert worden. Es hat sich dabei ein deutlich erhöhter Anteil apoptotischer Zellen nach der Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD im Vergleich zu PBS und Ad/CMV-GFP behandelten Zellen gezeigt. Die mit den Kontrollen Ad/CMV-GFP und PBS aufgezeigten Apoptoseraten haben sich zwischen 0.5% und 5% befunden, was im Normbereich durch Zelltrümmer anzusehen ist.

#### 3.1.4.1 Pankreaskarzinomzelllinien

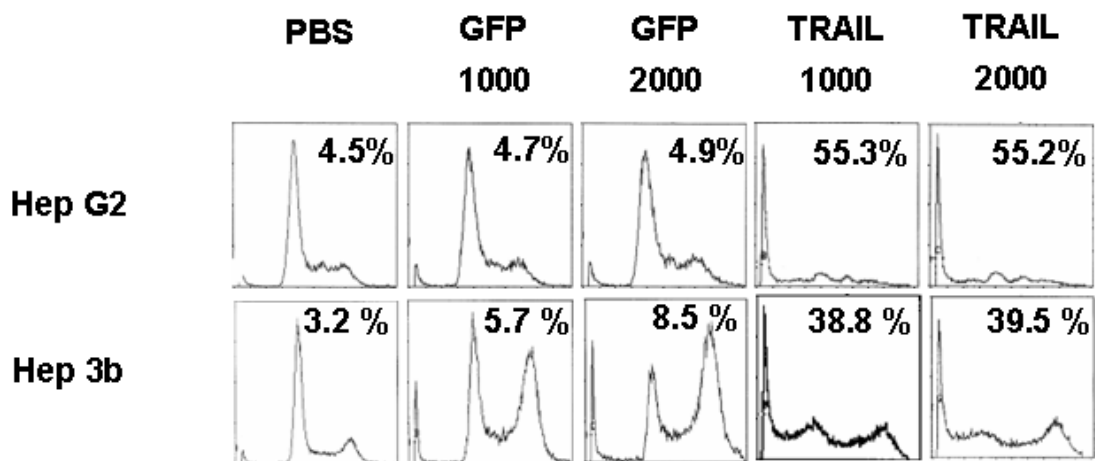


**Abb.23:** Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid mittels Durchflusszytometrie von Pankreaskarzinomzelllinien nach der Behandlung mit PBS, Ad/CMV-GFP und

Ad/TRAIL-F/RGD. Die adenoviralen Vektoren sind mit einer MOI von 1000 und 2000 VP/Zelle gegeben worden. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

Unter den verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien hat Mia PaCa-2 sehr sensitiv auf Ad/TRAIL-F/RGD reagiert, was auf Grund der geringen CA-Rezeptorzellichte zu erwarten gewesen ist. Bei einer MOI von 1000 VP/Zelle ist eine Apoptoserate von 63,5% zu verzeichnen gewesen, welche sich durch eine Dosissteigerung auf 2000 VP/Zelle nicht erhöht hat, sondern mit 59,1% konstant geblieben ist. Dagegen haben die beiden anderen Pankreaszelllinien eine deutliche Progredienz der Apoptoserate durch eine Konzentrationssteigerung aufgezeigt. So hat sich der sub-G1-Anteil der Capan-1 Zellen fast verdoppelt (von 26,8% auf 47,8%) und bei den AsPC-1 Zellen um ca. 10% gesteigert (von 16,1% auf 24,6%). Allerdings sind keine höheren Dosierungen als 2000 VP/Zellen zur Behandlung verwendet worden, da der eigene Toxizitätsanteil des adenoviralen Vektors deutlich zunimmt und daher diese Dosierungen für *in vivo* Experimente nicht mehr übertragbar sind. Die Dosissteigerung des Kontrollvektors hat dagegen nur zu einer Steigerung der Apoptoserate in den drei Zelllinien von 0,1% zu 0,3% geführt, sodass der eigene Toxizitätsanteil des Virus bei diesen verwendeten Dosierungen *in vitro* zu vernachlässigen ist.

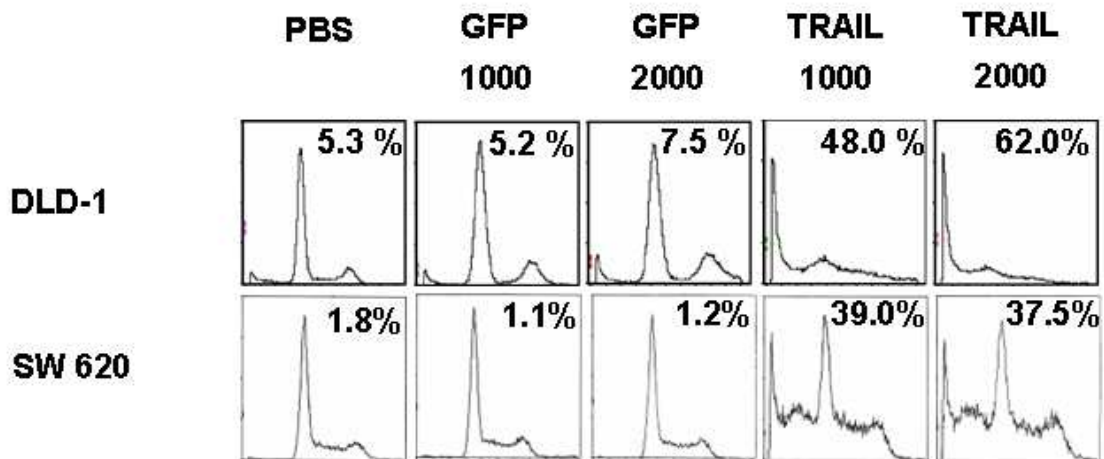
### 3.1.4.2 Hepatozelluläre Karzinomzelllinien



**Abb.24:** Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid mittels Durchflusszytometrie von Hepatozellulären Karzinomzelllinien nach der Behandlung mit PBS, Ad/CMV-GFP und Ad/TRAIL-F/RGD. Die adenoviralen Vektoren sind mit einer MOI von 1000 und 2000 VP/Zelle gegeben worden. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

Beide verwendeten hepatozellulären Karzinomzelllinien haben sehr sensitiv auf die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD reagiert. Allerdings ist durch eine Dosissteigerung keine Zunahme der Apoptoserate erreicht worden. Sowohl die sensitivere Zelllinie Hep G2 als auch Hep 3b Zellen haben ein konstantes Ergebnis von 55% bzw. 39% gezeigt. Einen Einfluss der viralen Eigentoxizität haben Hep 3b Zellen aufgezeigt. Im Vergleich zur PBS Kontrolle mit 3,2% toter Zellen, ist die Apoptoserate bei Ad/CMV-GFP auf 5,7% bei 1000 VP/Zelle angestiegen, die sich unter der Behandlung mit 2000 VP/Zelle auf 8,5% erhöht hat.

### 3.1.4.3 Kolonkarzinomzelllinien

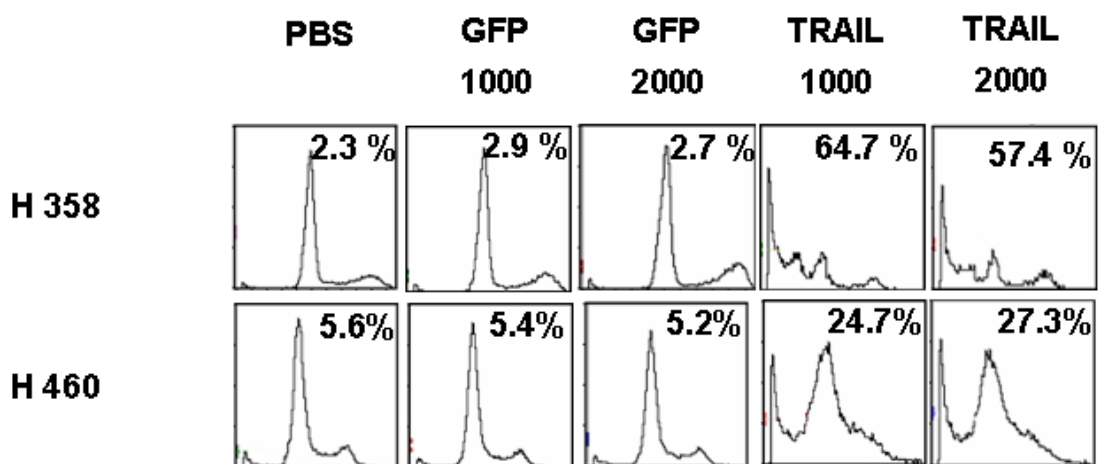


**Abb.25:** Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid mittels Durchflusszytometrie von Kolonkarzinomzelllinien nach der Behandlung mit PBS, Ad/CMV-GFP und Ad/TRAIL-F/RGD. Die adenoviralen Vektoren sind mit einer MOI von 1000 und 2000 VP/Zelle gegeben worden. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

Die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD hat in beiden Kolonkarzinomzelllinien zu einer deutlichen Zunahme der Apoptoserate geführt. Die sensitivere Zelllinie DLD-1 hat unter 1000 VP/Zelle einen sub-G1-Anteil von 48% aufgewiesen, der sich unter der Dosissteigerung auf 2000 VP/Zelle auf 62% erhöht hat. Dagegen ist bei der Zelllinie SW 620 keine Zunahme der Toxizität unter einer Dosissteigerung nachgewiesen worden, sodass es bei einer Apoptoserate von 39% bei 1000 VP/Zelle bzw. 37,5% unter der Behandlung mit 2000 VP/Zelle geblieben ist. Einen geringen adenoviralen Toxizitätseffekt des Kontrollvektors gegenüber der PBS Kontrolle (5,3%) haben die DLD-1 Zellen mit 7,5% unter 2000 VP/Zelle gegenüber 5,2% bei 1000 VP/Zelle

aufgewiesen. Dagegen sind in den Kontrollbehandlungen von SW 620 Zellen nur Apoptoseraten zwischen 1,2% und 1,8% zu verzeichnen gewesen.

### 3.1.4.4 Lungenkarzinomzelllinien



**Abb.26:** Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid mittels Durchflusszytometrie von Lungenkarzinomzelllinien nach der Behandlung mit PBS, Ad/CMV-GFP und Ad/TRAIL-F/RGD. Die adenoviralen Vektoren sind mit einer MOI von 1000 und 2000 VP/Zelle gegeben worden. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

Beide Zelllinien haben sensitiv auf die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD reagiert, mit einer stärkeren Reaktion bei H 358 Zellen. Hierbei ist unter der Behandlung mit 1000 VP/Zelle eine Apoptoserate von 64,7% erreicht worden, die sich jedoch unter einer Dosissteigerung auf 2000 VP/Zelle mit 57,4% nicht steigern lassen konnte und sogar leicht rückgängig gewesen ist. Dagegen haben die H 460 Zellen initial unter 1000 VP/Zelle einen sub-G1-Anteil von 24,7% gezeigt, der unter der Behandlung mit 2000

VP/Zelle um 3% auf 27,3% angestiegen ist. Eine Eigentoxizität des Kontrollvektors Ad/CMV-GFP hat keine der beiden Zelllinien aufgezeigt. Die Apoptoseraten der Kontrollen haben bei H 358 Zellen zwischen 2,3% und 2,7% und bei H 460 Zellen zwischen 5,2% und 5,6% gelegen.

### **3.1.5 Wirkung von Ad/TRAIL-F/RGD auf mesenchymale Stammzellen**

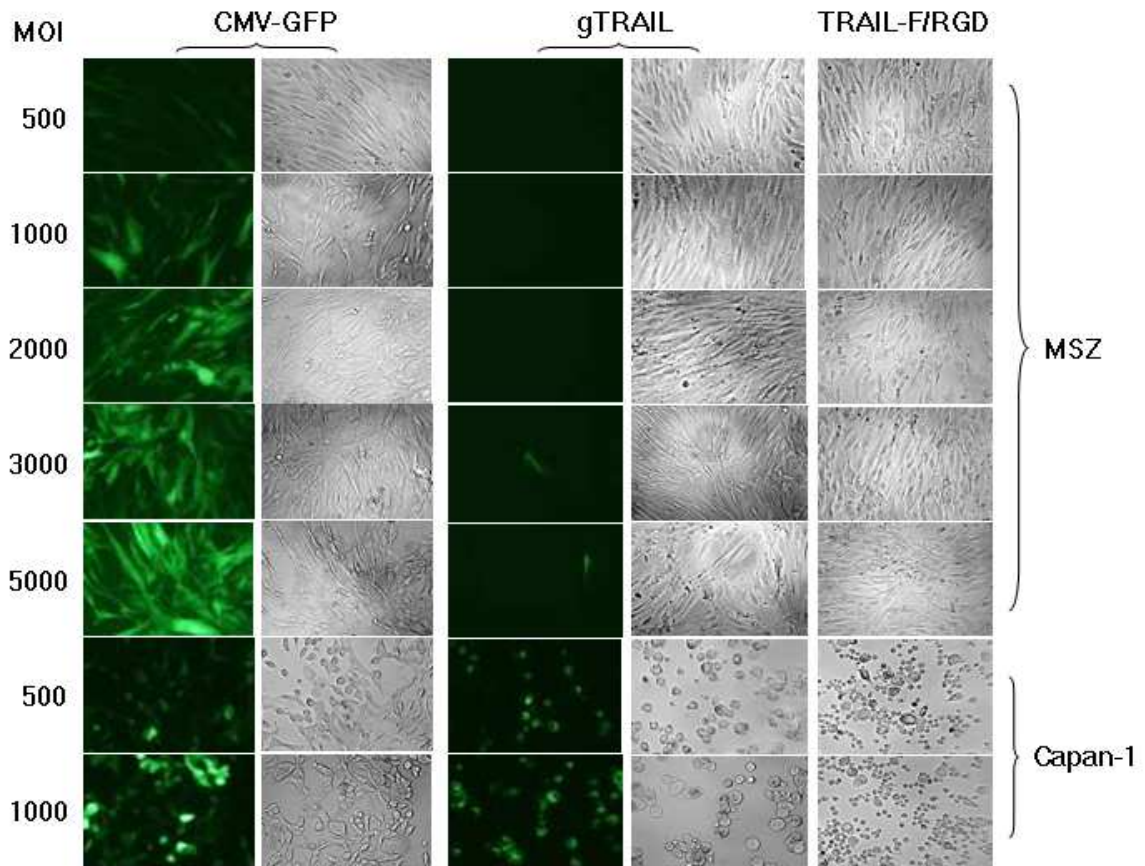
#### **3.1.5.1 Keine Transduktion mesenchymaler Stammzellen durch Ad/TRAIL-F/RGD**

Um einen toxischen Effekt von Ad/TRAIL-F/RGD und der hTERT-Promoter Aktivität in humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen (MSZ) auszuschließen, sind diese Zellen behandelt und zur Kontrolle mit der Zelllinie Capan-1 verglichen worden. Die Stammzellen sind dazu mit PBS, Ad/CMV-GFP, Ad/gTRAIL und Ad/TRAIL-F/RGD in Dosierungen von 500-5000 VP/Zelle behandelt worden. Der adenovirale Vektor Ad/gTRAIL beinhaltet den hTERT-Promoter und das TRAIL-Protein wie der neue Vektor Ad/TRAIL-F/RGD, jedoch besitzt dieser keine Modifikation mit dem RGD-Motiv. Nach der Behandlung für vier Tage haben sich unter dem Lichtmikroskop bei den Stammzellen keine morphologischen Veränderungen bzw. eine Verringerung der Zelldichte gezeigt, sodass auch unter der hohen Konzentration von 5000 VP/Zelle nicht von einer toxischen Schädigung der Stammzellen durch Ad/gTRAIL und Ad/TRAIL-F/RGD auszugehen ist. Dagegen hat die Behandlung der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 mit Ad/gTRAIL und Ad/TRAIL-F/RGD zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie und Zelldichte unter dem Lichtmikroskop geführt, welche dosisabhängig gewesen ist. Um einen sicheren Ausschluss der Transduktion von Stammzellen zu gewährleisten und dieses zu visualisieren, ist unter



einem Fluoreszenzmikroskop die Expression des „grün fluoreszierenden Proteins“ (GFP) bei Ad/CMV-GFP und des GFP/TRAIL Fusionsproteins bei Ad/gTRAIL nach Infektion analysiert worden. Eine GFP-Expression ist dabei in den Stammzellen bereits nach einer Infektion der Zellen mit Ad/CMV-GFP in einer Dosierung von 500 VP/Zelle zu verzeichnen gewesen. Diese hat sich dosisabhängig bis zu 5000 VP/Zelle gesteigert. Dagegen sind nur wenige grüne (fluoreszierende) Zellen in den Stammzellen nach der Behandlung mit einer hohen MOI von 3000 und 5000 VP/Zelle durch den Vektor Ad/gTRAIL nachgewiesen worden, wodurch von einer geringen hTERT-Promotor Aktivität in mesenchymalen Stammzellen auszugehen ist. Im Gegensatz dazu ist die transgene Expression des GFP-Proteins nach der Behandlung mit Ad/CMV-GFP und Ad/gTRAIL schon bei einer geringen MOI von 500 VP/Zelle in Capan-1 Zellen zu sehen gewesen. Dieses Ergebnis hat sich mit der vorherigen Aussage über die Beobachtung, dass die hTERT-Promoter gesteuerte transgene Expression nach adenoviralem Gentransfer gegenüber normalen Zellen in Tumorzellen stark erhöht ist, gedeckt (83).

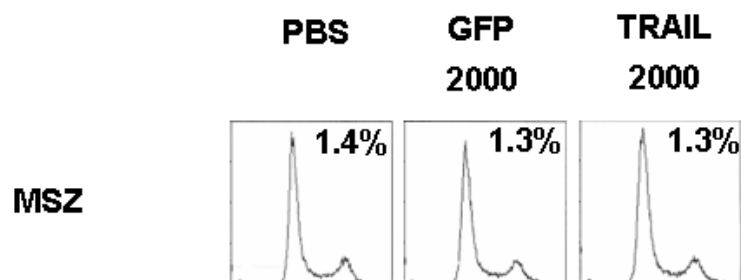
## Mesenchymale Stammzellen



**Abb.27:** Transgene Expression und zelltötender Effekt in mesenchymalen Stammzellen und Capan-1 Tumorzellen nach der Behandlung mit Ad/CMV-GFP, Ad/gTRAIL und Ad/TRAIL-F/RGD. Die GFP-Expression durch den Vektor Ad/CMV-GFP und GFP/TRAIL-Expression durch den Vektor Ad/gTRAIL sind unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert worden.

### 3.1.5.2 Keine Apoptoseinduktion in mesenchymalen Stammzellen durch Ad/TRAIL-F/RGD

In der durchflusszytometrischen Bestimmung mittels Färbung mit Propidium Iodid hat sich in den behandelten mesenchymalen Stammzellen ebenfalls keine durch den hTERT-Promoter bedingte Apoptoseinduktion nach der Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD gezeigt. Unter der MOI von 2000 VP/Zelle hat der Anteil apoptotischer Zellen in der PBS-Kontrollgruppe, Vektorkontrollgruppe (Ad/CMV-GFP) und Ad/TRAIL-F/RGD-Gruppe zwischen 1,3% und 1,4% gelegen. Aufgrund der hohen MOI von 2000 VP/Zelle ist daher nicht von einer Toxizität des adenoviralen Vektors auszugehen.

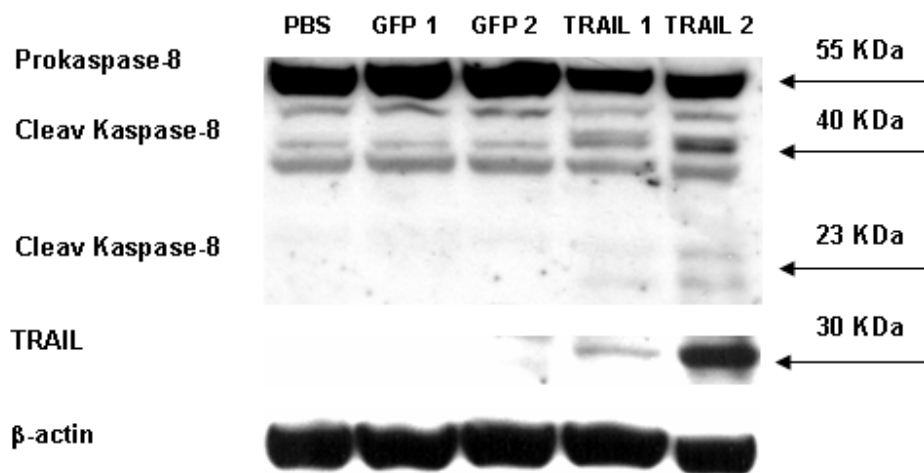


**Abb.28:** Apoptosebestimmung mittels Propidium Iodid durch Durchflusszytometrie in mesenchymalen Stammzellen (MSZ). Die mit den beiden adenoviralen Vektoren behandelten Zellen haben die gleiche Basisapoptoserate wie die mit PBS behandelte Kontrollgruppe. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

### 3.1.6 Kaspase-8-Aktivierung und TRAIL-Expression im Western Blot

Die Western Blot-Analyse zum Nachweis der Ad/TRAIL-F/RGD vermittelten *TRAIL*-Expression hat eine schwache Bande des TRAIL-Proteins bei einer MOI von 1000

VP/Zelle und eine deutliche Bande bei einer MOI von 2000 VP/Zelle in den mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Zellen gezeigt. Die durch *TRAIL* eingeleitete Kaspasen aktivierte Apoptoseinduktion ist in Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Zellen bei 1000 und 2000 VP/Zelle durch die Aktivierung der initialen Kaspase-8 nachgewiesen worden. Dagegen hat sich keine *TRAIL* bzw. aktivierte Kaspase-8 Bande in den mit PBS oder Ad/CMV-GFP behandelten Zellen nachweisen lassen.



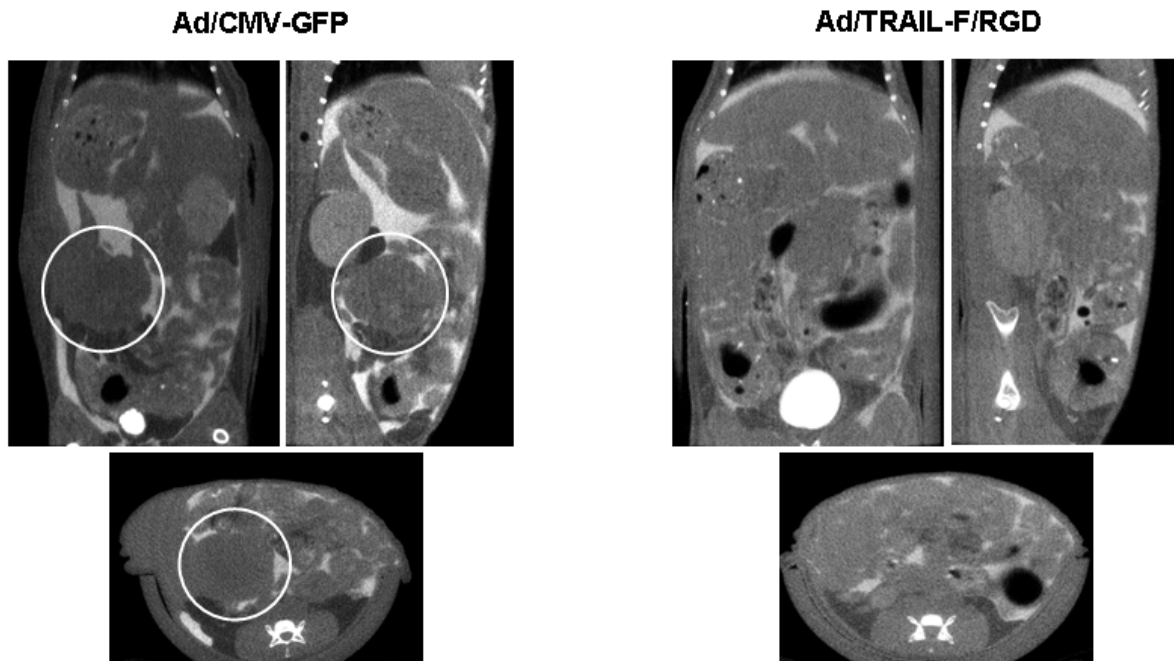
**Abb.29:** Western Blot-Analyse der *TRAIL*-Expression und Kaspase-8-Aktivierung in Tumorzellen nach 24 Std. Behandlung. Spalte 1: PBS; Spalte 2: Ad/CMV-GFP (1000 MOI); Spalte 3: Ad/CMV-GFP (2000 MOI); Spalte 4: Ad/TRAIL-F/RGD (1000 MOI); Spalte 5: Ad/TRAIL-F/RGD (2000 MOI).  $\beta$ -Actin ist als Ladekontrolle verwendet worden.

### **3.1.7 Ad/TRAIL-F/RGD induziert eine Tumorstachstumshemmung *in vivo***

Um die antitumoröse Aktivität des adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD in humanen Pankreaskarzinomzelllinien zu testen, ist ein orthotopes Tumormodel in dem Pankreasschwanz von Nacktmäusen mit der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 etabliert worden. Alle Studientiere haben nach der Tumorimplantation einen Tumor in dem Pankreasschwanz ausgebildet, jedoch keine Lebermetastasen oder eine Peritonealkarzinose. Außerdem ist kein Tier vor dem 33 Tag nach der Tumorimplantation an Kachexie verstorben oder musste vorzeitig getötet werden.

#### **3.1.7.1 Tumornachweis in der Mikrocomputertomografie**

Einen Tag vor Beendigung des Experiments durch Tötung der Tiere hat sich in der Mikrocomputertomografie bei den mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP behandelten Tieren eine deutlich größere Tumormasse im Vergleich zu den mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Tieren gezeigt. Dieses Ergebnis ist in 5 untersuchten Tieren pro Gruppe aufgezeigt worden.



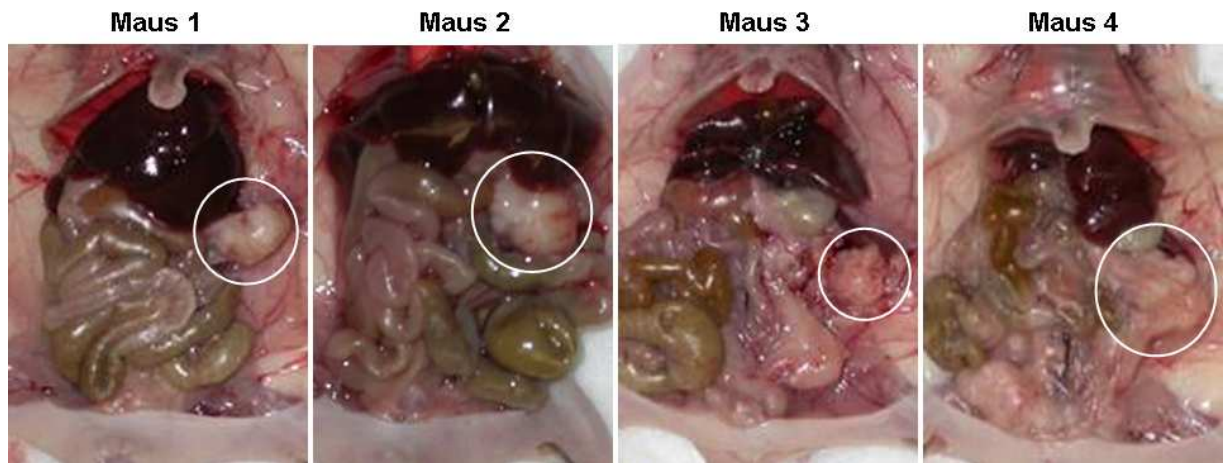
**Abb.30:** Nachweis des Tumorwachstums durch eine Mikrocomputertomografie einen Tag vor der Tötung der Studientiere. Deutlich ist die Tumormasse (Kreis) eines mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP behandelten Tieres (links) im Vergleich zu einem mit Ad/TRAIL-F/RGD (rechts) therapierten Tieres zu erkennen. Diese Untersuchung zeigt exemplarisch ein Tier von fünf untersuchten Tieren pro Gruppe.

### 3.1.7.2 Ad/TRAIL-F/RGD führt zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum orthotoper Pankreastumoren *in vivo*

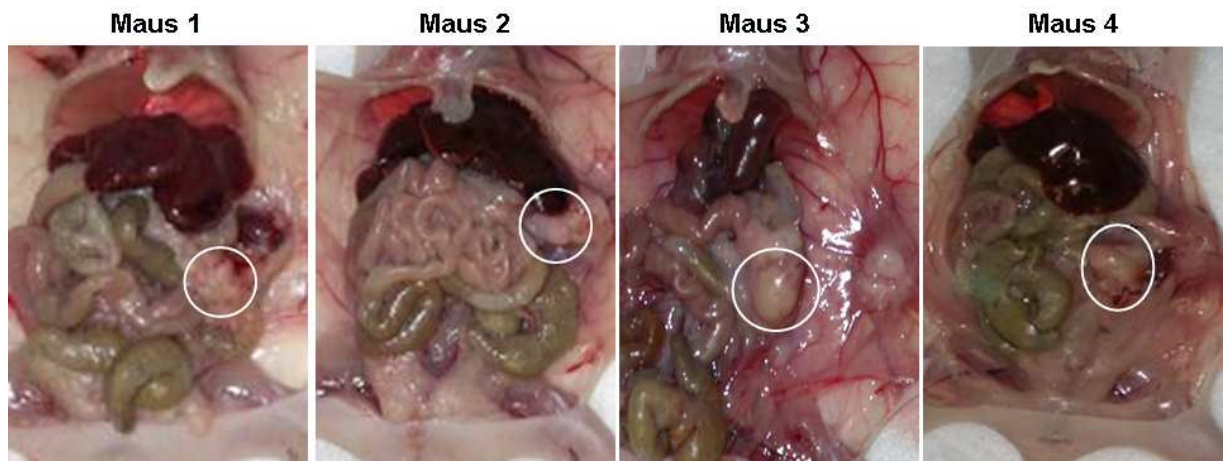
Kurz nach der Tötung der Tiere sind die Tumoren im Situs fotografiert, danach entnommen und vermessen worden. Es hat sich dabei gezeigt, dass die Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum gegenüber den Kontrollgruppen geführt hat. Zwischen den mit PBS und Ad/CMV-GFP behandelten

Tieren hat sich dagegen kein Unterschied in dem Tumorwachstum nachweisen lassen, sodass im Folgenden nur die beiden mit adenoviralen Vektoren behandelten Gruppen gezeigt werden.

### Ad/CMV-GFP



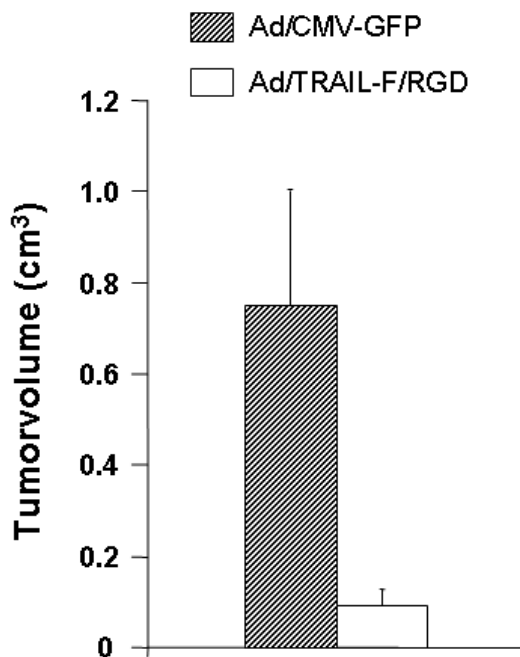
### Ad/TRAIL-F/RGD



**Abb.31:** Darstellung der Pankreastumore (Kreis) am Tag der Tötung der Versuchstiere. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen der Ad/CMV-GFP Vektorkontrollgruppe (oben) mit der Ad/TRAIL-F/RGD Therapiegruppe zu erkennen.



**Abb.32:** Darstellung der entnommenen Tumoren. Dabei zeigt sich makroskopisch ein deutlich reduziertes Wachstum der mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Tiere (unten) im Vergleich zu der mit Ad/CMV-GFP behandelten Kontrollgruppe (oben).

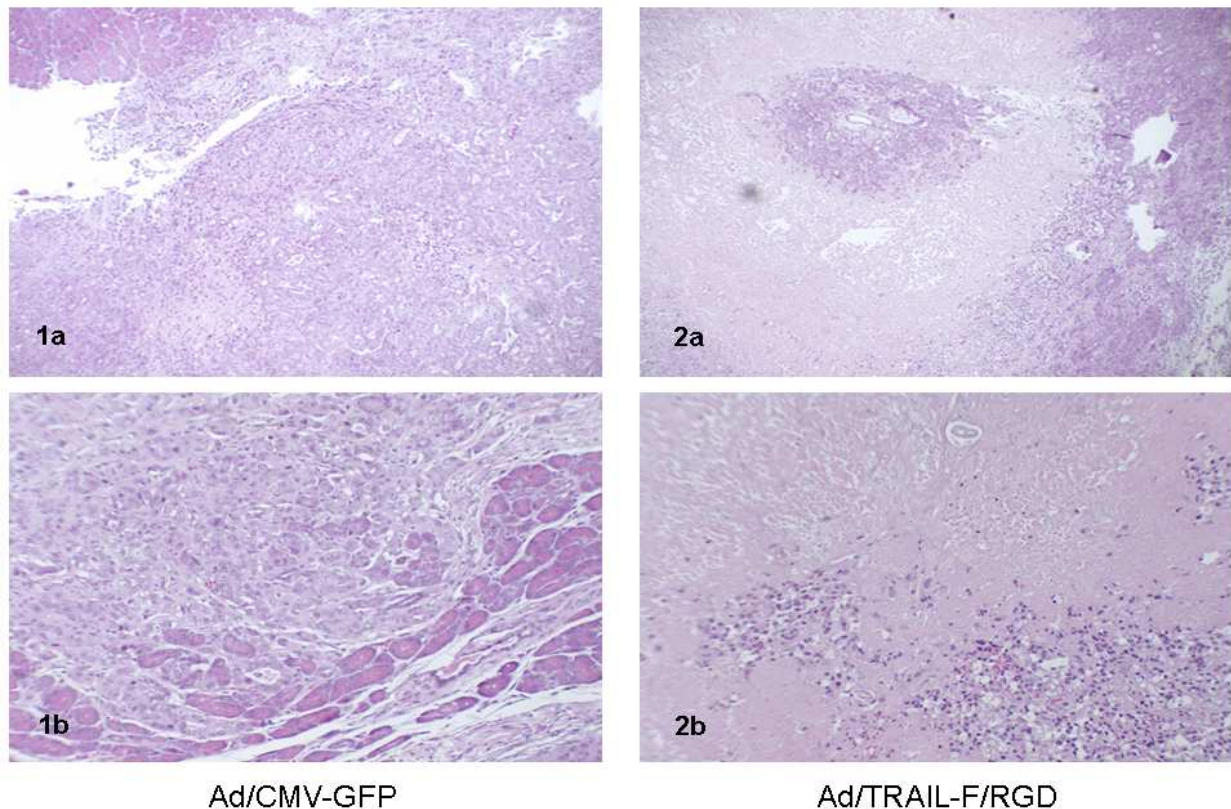




**Abb.33:** Tumorzvolumen (cm<sup>3</sup>) der mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP und Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Nacktmäuse 53 Tage nach Tumorimplantation. Die Werte zeigen den Durchschnitt mit Standardabweichung von 5 Tieren pro Gruppe. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Ad/TRAIL-F/RGD *versus* Ad/CMV-GFP) ist signifikant ( $P < 0.05$ ). Dagegen ist kein signifikanter Unterschied des Tumorwachstums zwischen den mit PBS und Ad/CMV-GFP behandelten Tieren aufgezeigt worden (nicht gezeigt).

### **3.1.7.3 Ad/TRAIL-F/RGD führt zu großen intratumoralen Nekrosen**

In den nach der Tötung der Tiere durchgeführten Hämatoxylin-Eosin (44) Färbungen der Tumorschichten sind in den mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP behandelten Tieren noch intaktes Tumorgewebe mit einzelnen Nekrosen nachgewiesen worden. Dagegen haben die Tumoren der mit Ad/TRAIL-F/RGD therapierten Tiere große Nekrosezonen in den histologischen Schnitten aufgewiesen.

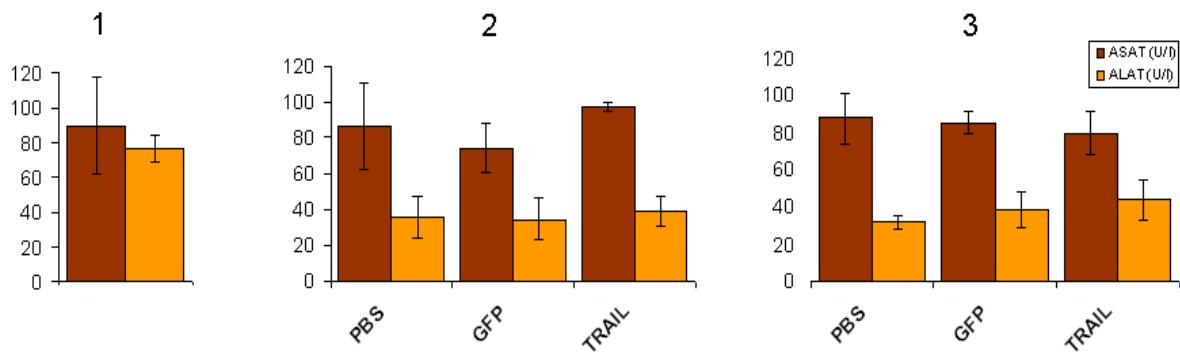


**Abb.34:** Darstellung des Tumorzerfalls *in vivo* nach Ad/TRAIL-F/RGD Applikation anhand histologischer Schnitte durch Hämatoxylin-Eosin Färbung. Die mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP behandelten Tiere (1a+1b) zeigen nur geringe intratumorale Nekrosen, wohingegen die mit Ad/TRAIL-F/RGD therapierten Tiere deutliche Nekroseareale aufzeigen (2a+2b). Die Abbildungen zeigen exemplarisch ein Tier aus den beiden Gruppen.

#### 3.1.7.4 Ad/TRAIL-F/RGD zeigt keine Anzeichen einer Lebertoxizität *in vivo*

Zur Bestimmung einer eventuellen Lebertoxizität nach der dreimaligen intratumoralen Injektion von Ad/TRAIL-F/RGD sind die Transaminasen ASAT und ALAT bestimmt worden. Dabei haben die Parameter sowohl vor als auch nach der Behandlung in den

drei Gruppen im Normbereich gelegen, sodass von einer guten Verträglichkeit ausgegangen werden kann.



**Abb.35:** Darstellung der Transaminasen ASAT und ALAT vor der Behandlung (1), 3 Tage nach der letzten Therapie (2) und 1 Tag vor Tötung der Tiere (3).

### 3.2 Ergebnisse (Experiment II) (84)

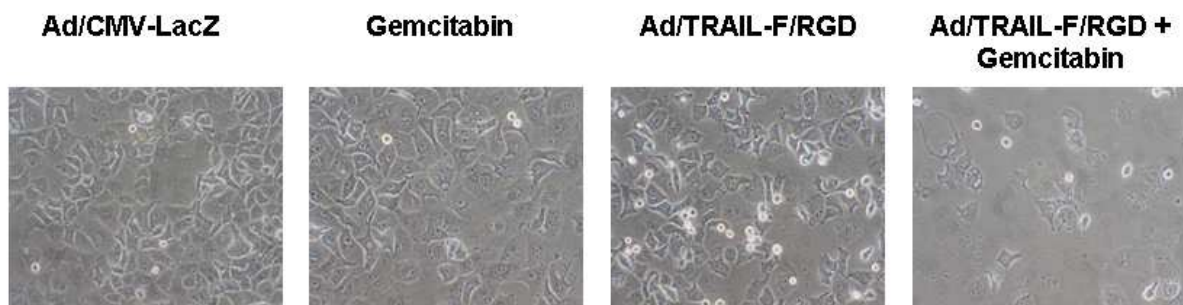
#### 3.2.1 Deutlich gesteigerter zelltötender Effekt von Gemcitabin in der Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD unter dem Lichtmikroskop

Zur Überprüfung eines gesteigerten Effektes einer Kombinationstherapie von Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD in der Behandlung von Pankreaskarzinomzelllinien, sind die humane Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 mit Ad/CMV-LacZ (Vektorkontrolle), Gemcitabin, Ad/TRAIL-F/RGD und der Kombination aus Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD behandelt worden.

Anzumerken ist, dass in Vorversuchen die Behandlung der Pankreastumorzelllinien AsPC-1, Capan-1 und Mia PaCa-2 mit PBS und den Kontrollvektoren Ad/CMV-GFP und Ad/CMV-LacZ zu gleichen Ergebnissen bezüglich der Toxizität geführt hat. Zusätzlich

hat sich in Experiment I gezeigt, dass PBS und der Kontrollvektor Ad/CMV-GFP sich in der Toxizität gegenüber multiplen Tumorzellen nicht unterschieden haben, weshalb in den weiteren Untersuchungen nur noch Ad/CMV-LacZ als einzige Kontrolle verwendet worden ist.

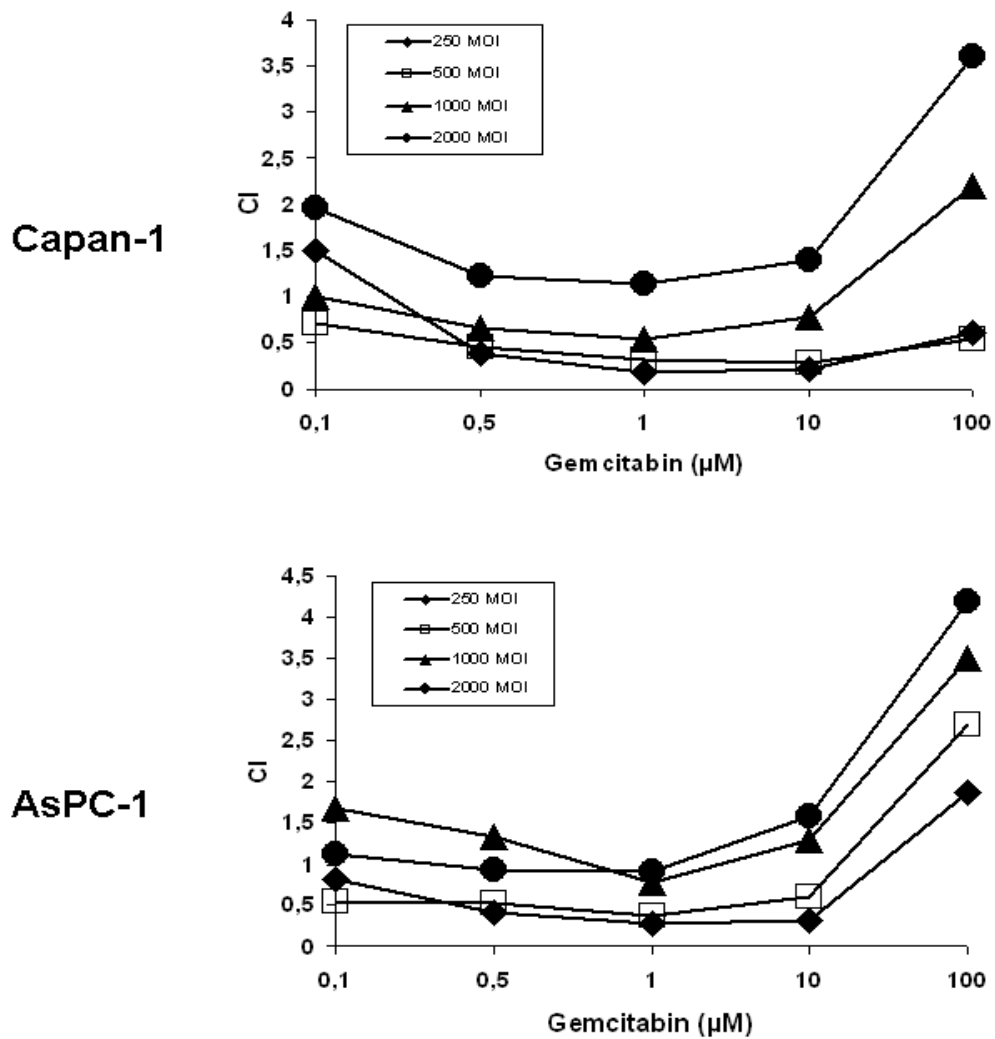
Die lichtmikroskopische Untersuchung der Kombinationstherapie nach 48 Std. Behandlung hat in der Vektorkontrolle mit Ad/CMV-LacZ zu keinem sichtbaren Zelluntergang geführt. Dagegen hat die Einzeltherapie mit Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD zu einem leichten Verlust der Zelldichte und einer veränderten Morphologie geführt. Die Kombinationstherapie hingegen hat zu einem deutlichen Zelluntergang geführt.



**Abb.36:** Die Behandlung der Pankreaskarzinomzellen (AsPC-1) hat in der Vektorkontrolle (Ad/CMV-LacZ) zu keinem sichtbaren Zelluntergang gegenüber einer leicht verringerten Zelldichte in den einzelnen Therapien (Gemcitabin, Ad/TRAIL-F/RGD) geführt. Dagegen hat die Kombinationstherapie (Ad/TRAIL-F/RGD + Gemcitabin) zu einem deutlichen Zelluntergang und Reduzierung der Zellzahl geführt.

### **3.2.2 Nachweis eines Synergismus in der Kombinationstherapie zwischen Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin durch den Kombinationsindex**

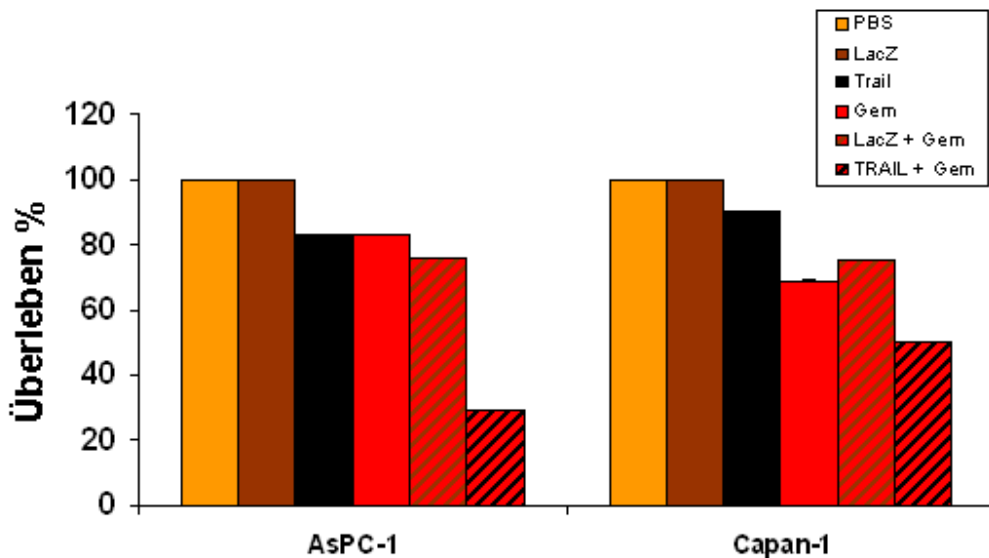
Um den tumorwachstumshemmenden Effekt der *TRAIL* Gentherapie mit der Gabe von Gemcitabin zu evaluieren, ist der Kombinationsindex (Combination Index, CI) einer Kombinationstherapie mit der CalcuSyn Software analysiert worden. Dabei hat sich ein stark synergistischer Effekt einer Kombinationstherapie in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1 und AsPC-1 gezeigt, wenn die Zellen mit einer niedrigen Dosierung von Ad/TRAIL-F/RGD behandelt worden sind. Dieses hat sich z.B. durch einem Kombinationsindex von 0.1 gezeigt, wenn die Zellen mit einer MOI von 250 VP/Zelle mit Ad/TRAIL-F/RGD und 1mM Gemcitabin behandelt worden sind. Dieser synergistische Effekt ist auch bei einer MOI von 500 VP/Zelle beobachtet worden. Dagegen hat eine Dosissteigerung des Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin jedoch nur zu einem additiven Effekt geführt. Dieses ist am ehesten durch die ansteigende Toxizität der einzelnen Therapien zu erklären, die eine hohe Anzahl an Zellen tötet, sodass eine weitere Gabe zu keiner Toxizitätssteigerung geführt hat.



**Abb.37:** Kombinationsindex (Combination Index, CI) für die Kombinationstherapie mit Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin in den Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1 und AsPC-1. Ein Synergismus ist für beide Zelllinien bei einer MOI von 250 und 500 VP/Zelle in der Kombination mit 0.1–10mM Gemcitabin nachgewiesen worden.

### 3.2.3 Nachweis eines deutlich erhöhten zelltötenden Effektes der Kombinationstherapie im XTT-Test

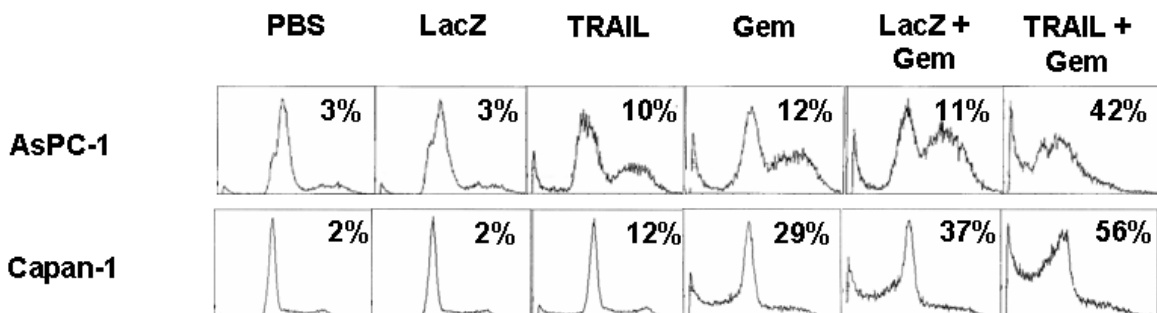
Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und Capan-1 sind zum Nachweis eines proliferationshemmenden- bzw. zelltötenden Effekts vier Tage mit PBS, Ad/CMV-LacZ, Ad/TRAIL-F/RGD, Gemcitabin und der Kombination aus Ad/CMV-LacZ + Gemcitabin bzw. Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin behandelt worden. Danach hat sich in der Bestimmung durch einen XTT-Test gezeigt, dass eine niedrige Dosierung von Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD in der Kombination gegenüber den einzelnen Therapien zu einem deutlich gesteigerten Zelluntergang geführt hat. Dagegen hat sich kein Unterschied in den mit PBS und Ad/CMV-LacZ behandelten Zellen gezeigt.



**Abb.38:** Bestimmung des zelltötenden Effektes mittels eines XTT-Test vier Tage nach der Behandlung mit der Kontrolle (PBS), Vektorkontrolle (Ad/CMV-LacZ), Ad/TRAIL-F/RGD (TRAIL) und Gemcitabin (Gem). Ad/CMV-LacZ und Ad/TRAIL-F/RGD sind mit 500 VP/Zelle und Gemcitabin mit 0.1µM gegeben worden.

### 3.2.4 Nachweis einer synergistisch erhöhten Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie

Zum Nachweis einer gesteigerten Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin, sind die humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und Capan-1 mit den adenoviralen Vektoren Ad/CMV-LacZ oder Ad/TRAIL-F/RGD mit einer MOI von 500 VP/Zelle und Gemcitabin in einer Konzentration von 0.1µM für 48 Std. behandelt worden. Danach ist die Sub-G<sub>1</sub> Fraktion mittels Färbung mit Propidium Iodid durch Durchflusszytometrie bestimmt worden. Dabei hat die Kombinationstherapie in beiden Zelllinien zu einer deutlich gesteigerten Apoptoseinduktion gegenüber den beiden einzelnen Therapien geführt, die auf eine synergistische Wirkung hingedeutet hat. Die Behandlung mit PBS und dem Kontrollvektor Ad/CMV-LacZ hat dagegen in beiden Zelllinien zu einer normalen Basisapoptoserate von 2% bis 3% geführt.



**Abb.39:** Apoptosebestimmung mit Propidium Iodid mittels Durchflusszytometrie von den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und Capan-1. Die Behandlung ist mit der Leerkontrolle (PBS), Ad/CMV-LacZ (LacZ), Ad/TRAIL-F/RGD (TRAIL) und Gemcitabin



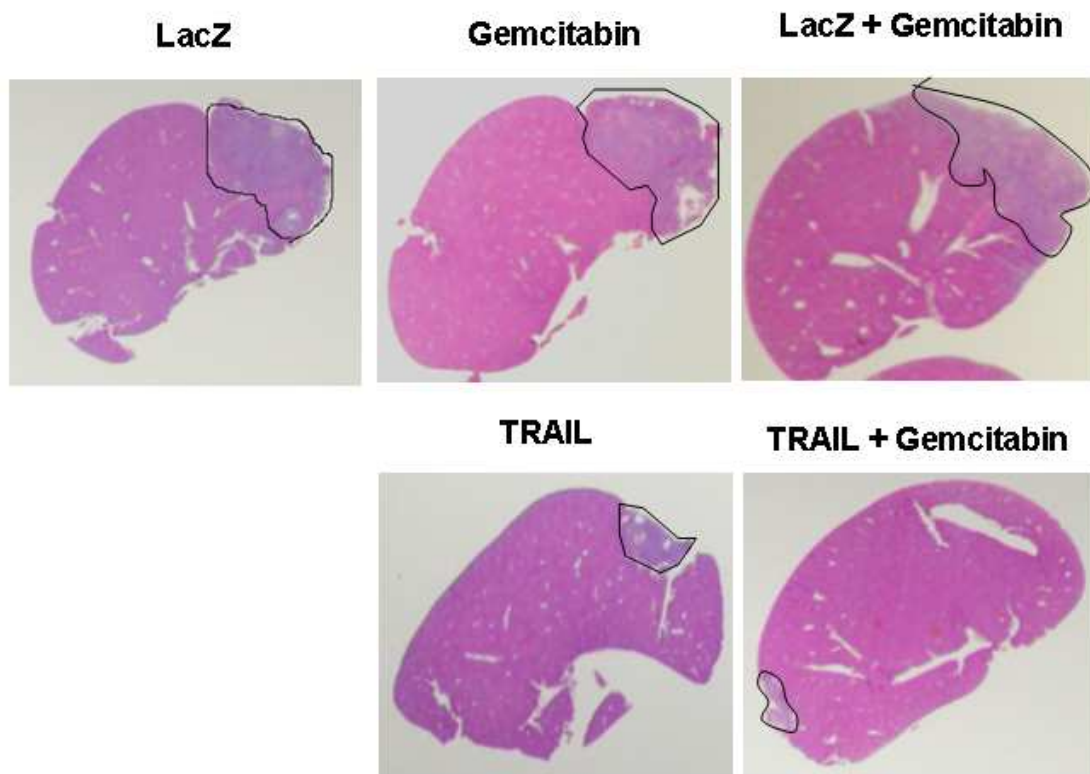
(Gem) sowie den Kombinationstherapien durchgeführt worden. Die Dosierung der adenoviralen Vektoren hat 500 VP/Zelle und bei Gemcitabin 0.1 $\mu$ M betragen. Angegeben ist der prozentuale Anteil der toten Zellen.

### **3.2.5 Suppression des Tumorwachstums in der Leber durch die systemische Applikation von Ad/TRAIL-F/RGD und Verstärkung des Effektes durch die Kombinationstherapie mit Gemcitabin**

Um den *in vitro* beobachteten Effekt *in vivo* zu bestätigen, ist ein Pankreasmetastasentumormodel in der Leber von Nacktmäusen etabliert worden. Vier Tage nach der intrahepatischen Injektion eines Leberlappens mit der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 sind die Tiere nach Randomisierung in die Behandlungsgruppen (Ad/CMV-LacZ, Gemcitabin, Ad/TRAIL-F/RGD, Ad/CMV-LacZ + Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD + Gemcitabin) eingeteilt und nach dem in Material und Methoden beschriebenen Behandlungsschema therapiert worden. Nach 28 Tagen sind alle Tiere getötet, die Lebern in Paraffin eingebettet und die Tumorareale mit der Optimas Software anhand von drei Schnitten im Abstand von 20 $\mu$ m vermessen worden. Bis auf zwei mit der Kombinationstherapie Ad/TRAIL-F/RGD mit Gemcitabin behandelten Tiere haben alle verwendeten Nacktmäuse einen Tumor in dem injizierten Leberlappen ausgebildet. Zum Tötungszeitpunkt sind keine Leber- oder Lymphknotenmetastasen oder eine Peritonealkarzinose nachweisbar gewesen. Keines der Tiere ist aufgrund einer Tumorkachexie oder –Blutung vorzeitig getötet worden. Die Auswertung des vermessenen Tumorareals hat gezeigt, dass die alleinige Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD und die Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD mit Gemcitabin zu einem signifikant reduziertem ( $p < 0.05$ ) Tumorwachstum im Vergleich

zu der Kontrollgruppe (Ad/CMV-LacZ) und der alleinigen Therapie mit Gemcitabin geführt hat. So ist die Tumorfläche in den mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Tieren sechsmal kleiner als die Fläche von Ad/CMV-LacZ mit Gemcitabin behandelte Tiere gewesen. Zusätzlich hat die Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD mit Gemcitabin zu einer deutlichen Reduzierung des Tumorwachstums gegenüber den Einzeltherapien geführt. Allerdings ist der Unterschied zwischen Ad/TRAIL-F/RGD und Ad/TRAIL-F/RGD mit Gemcitabin nicht signifikant gewesen.

Dagegen hat sich kein signifikanter Unterschied der Tumorgroße in den mit Ad/CMV-LacZ, Gemcitabin oder Ad/CMV-LacZ mit Gemcitabin behandelten Tieren gezeigt, sodass die Behandlung mit dem Kontrollvektor Ad/CMV-LacZ bei der systemischen Gabe keinen apoptotischen Effekt auf Tumorzellen aufweist. Zusätzlich hat sich kein deutlicher wachstumshemmender Effekt der alleinigen Gemcitabinbehandlung nachweisen lassen, der mit der niedrigen Dosierung von 25mg/Kg/KG begründet werden kann.



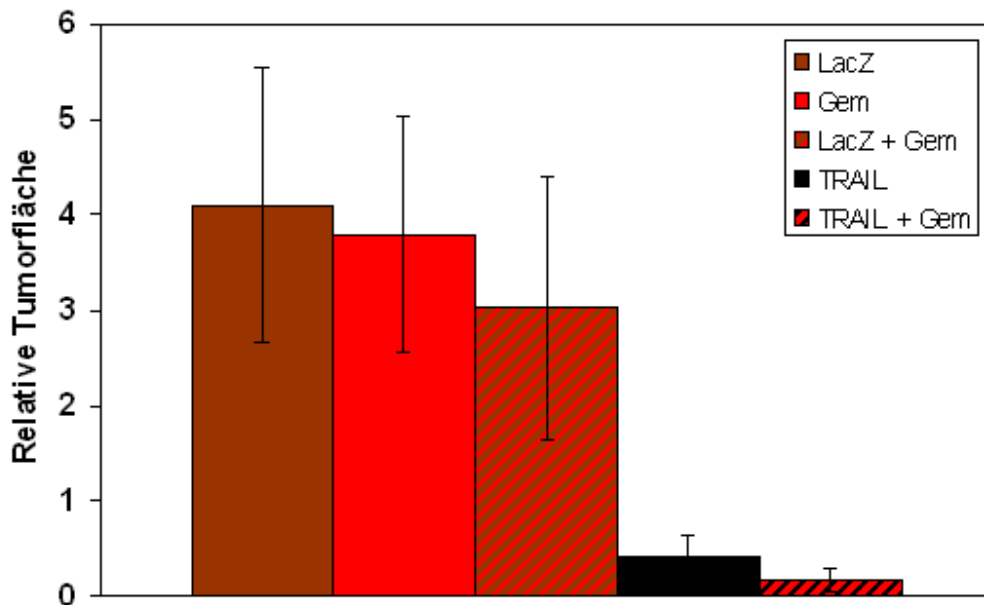
**Abb.40:** Suppression des Tumorwachstums von Capan-1 Pankreastumoren in der Leber. Hämatoxylin-Eosin Färbung von Leberschnitten nach der Behandlung mit der Kontrolle (Ad/CMV-LacZ), Ad/TRAIL-F/RGD (TRAIL) und Gemcitabin vier Wochen nach Zellinjektion. Die Tumorfläche ist mit der Optimas Software eingekreist und danach analysiert worden.

### Ad/TRAIL-F/RGD + Gemcitabin

Maus	Schnitt	LacZ	Gem 25mg/kg/KG	TRAIL	LacZ + Gem	TRAIL + Gem
1	1	1	0	0	0	1
	2	1	1	0	1	1
	3	1	1	0	1	1
2	1	1	1	0	1	0
	2	1	1	0	1	0
	3	1	1	0	0	0
3	1	0	1	1	1	0
	2	1	1	0	0	0
	3	1	1	0	0	0
4	1	1	1	1	1	0
	2	1	1	1	1	0
	3	0	1	1	1	0
5	1	1	1	1	1	0
	2	1	0	1	1	0
	3	1	0	0	1	1
Total		13/15	12/15	6/15	11/15	4/15

1= Tumor im Schnitt

**Tab.2:** Suppression des Tumorwachstums von Capan-1 Pankreastumoren in der Leber nach der Behandlung mit der Kontrolle (Ad/CMV-LacZ, LacZ), Ad/TRAIL-F/RGD (TRAIL) und Gemcitabin (Gem). Darstellung der 5 Tiere pro Gruppe mit den nachgewiesenen Tumorareal pro Schnitt (1 = Nachweis des Tumors im Schnitt).

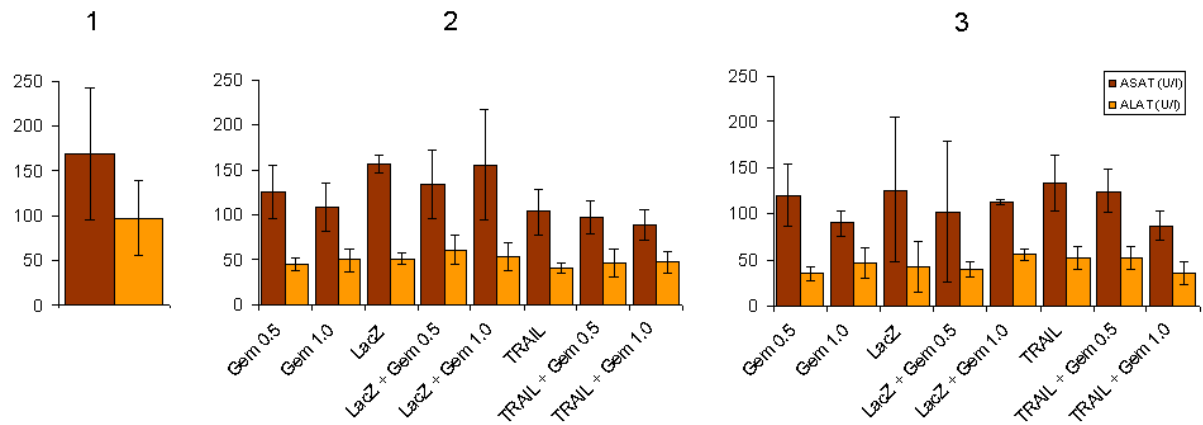


**Abb.41:** Suppression des Tumorwachstums von Capan-1 Pankreastumoren in der Leber nach der Behandlung mit der Kontrolle (Ad/CMV-LacZ, LacZ), Ad/TRAIL-F/RGD (TRAIL) und Gemcitabin (Gem) vier Wochen nach Zellinjektion. Dargestellt ist der mit der Optimas Software ausgemessene Durchschnitt der Tumorfläche von 5 Tieren pro Gruppe mit der Standardabweichung. Der Unterschied zwischen TRAIL und TRAIL+Gemcitabin behandelten Tieren gegenüber Ad/CMV-LacZ, Gemcitabin und Ad/CMV-LacZ+Gemcitabin behandelten Tieren ist signifikant ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.6 Keine Lebertoxizität durch Gemcitabin allein und in der Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD

Die Auswertung der im Serum gemessenen Leberenzyme ASAT und ALAT zum Nachweis einer eventuellen Lebertoxizität nach der systemischen Administration von Ad/TRAIL-F/RGD sowie der intraperitonealen Injektion von Gemcitabin hat keine pathologischen Werte vor, drei Tage nach der letzten Behandlung und einen Tag vor

Tötung der Tiere gezeigt. Während der Behandlung ist kein Tier verstorben, sodass von einer guten Verträglichkeit der Therapie ausgegangen werden kann.



**Abb.42:** Darstellung der Leberenzyme ASAT und ALAT vor der Behandlung (1), 3 Tage nach der letzten Therapie (2) und 1 Tag vor Tötung der Tiere (3).

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### *Vorarbeiten*

- *Entwicklung von orthotopen- und Metastasentumormodellen verschiedener Tumorzelllinien zur nachfolgenden Testung des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD in vivo.*

Es hat sich dabei sowohl das orthotope Pankreastumormodel durch Implantation als auch das Pankreasmetastasenmodell durch Tumorzellinjektion als stabilstes und größenkonstantestes Modell erwiesen, sodass beide Modelle verwendet worden sind.

#### *Experiment I*

1. *Testung des adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD in humanen Tumorzelllinien verschiedener Entitäten bezüglich seiner Toxizität in vitro .*

Ad/TRAIL-F/RGD hat einen stark zelltötenden Effekt in multiplen humanen Tumorzelllinien *in vitro* aufgewiesen.

2. *Testung eines toxischen Effektes von Ad/TRAIL-F/RGD auf mesenchymale Stammzellen.*

Ad/TRAIL-F/RGD hat keinen nachweisbaren toxischen Effekt auf mesenchymale Stammzellen gezeigt.

3. *Überprüfung, ob ein eventueller toxischer Effekt des Ad/TRAIL-F/RGD Apoptose vermittelt ist und dieser sich über die Aktivierung der initialen Kaspase-8 nachweisen lässt.*

Die durch Ad/TRAIL-F/RGD vermittelte Apoptose ist durch die initiale Kaspase-8 ausgelöst worden.

4. *Testung der antitumorösen Wirkung Ad/TRAIL-F/RGD in vivo in einem zuvor etablierten orthotopen Pankreastumormodell durch intratumorale Injektionen nach Relaparotomie.*

Die intratumorale Injektion von Ad/TRAIL-F/RGD hat zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums gegenüber den Kontrollgruppen geführt.

5. *Eventueller Nachweis des Pankreasschwanztumors in einer Mikrocomputertomografie und Vergleich zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe.*

Der durch SOI gebildete Pankreasschwanztumor hat sich gut in der Mikrocomputertomografie nachweisen lassen, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe zu verzeichnen gewesen ist

6. *Überprüfung, ob die wiederholte intratumorale Injektion von Ad/TRAIL-F/RGD lebertoxisch ist.*

Die wiederholte intratumorale Injektion hat keine Lebertoxizität gezeigt.

## *Experiment II*

1. *Zeigt die Kombinationstherapie von Ad/TRAIL-F/RGD mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin eine additive bzw. synergistische Wirkung in vitro?*

Die Kombinationstherapie hat in dem Kombinationsindex *in vitro* eine synergistische Wirkung gezeigt.



2. *Führt die systemische Applikation von Ad/TRAIL-F/RGD zu einem therapeutischen Effekt in vivo und kann dieser durch die Kombination mit Gemcitabin verstärkt werden?*

Die systemische Gabe von Ad/TRAIL-F/RGD hat in der Leber bei Pankreastumoren gegenüber den Kontrollgruppen zu einer signifikanten Tumorsuppression geführt, welche durch die Kombination mit Ad/TRAIL-F/RGD deutlich verstärkt worden ist.

3. Überprüfung einer eventuellen Lebertoxizität durch die systemische Gabe von Ad/TRAIL-F/RGD.

Die wiederholte systemische Injektion von Ad/TRAIL-F/RGD sowie die intraperitoneale Gabe von Gemcitabin hat keine Lebertoxizität gezeigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Experiment I

In vorangegangenen Experimenten unserer Forschungsgruppe ist gezeigt worden, dass der adenovirale Vektor Ad/gTRAIL, der das GFP/TRAIL-Fusionsprotein exprimiert, welches von dem hTERT-Promoter gesteuert wird, zu einer hohen Transduktion und Apoptoseinduktion in multiplen Tumorzellen führt. Zusätzlich kann durch die hTERT gerichtete Tumorspezifität eine transgene Expression mit nachfolgender Toxizität in Hepatozyten vermieden werden (39, 43, 86-88). Daneben ist nachgewiesen worden, dass durch einen „Bystander-Effekt“ über Zellinteraktionen nicht infizierte Zellen durch infizierte Zellen über membrangebundenes TRAIL mitbeeinflusst werden, sodass sich die Zahl der behandelten Zellen und damit der therapeutische Effekt deutlich erhöht (44). Allerdings hat sich in mehreren Studien mit adenoviralen Vektoren gezeigt, dass die Tumorzellen nach wiederholter Applikation Resistenzen ausbilden können und einer der Hauptgründe dieses Phänomens in einer Resistenzausbildung gegenüber dem initialen Bindungsrezeptor, Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), liegt (28, 33). Daher sind alternative virale Bindungsmechanismen gefordert, um die Transduktion in resistenten Zellen und Zellen mit einer initial geringen CAR Expression zu steigern. Eine Möglichkeit der gesteigerten Bindung ist dabei die Modifikation des adenoviralen Vektors mit einem RGD-Peptid, welches in die HI Schleife des Fiber-Knob integriert wird. Daher ist in unserer Abteilung der Vektor Ad/gTRAIL mit dieser RGD-Sequenz modifiziert worden und das *GFP*-Gen, welches nur eine Markerfunktion in dem Ad/gTRAIL besessen hat, entnommen worden. Durch die Einbringung der RGD-Sequenz könne das Einsatzspektrum in Bezug auf Adenovirus-resistente und CAR

negative bzw. erniedrigte Zellen deutlich erweitert werden und habe daher gegenüber dem vorherigen Vektor (Ad/gTRAIL) einen großen Vorteil.

Im Rahmen dieser Arbeit ist daher der Effekt des neu konstruierten adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD, der das Wildtyp *TRAIL* Gen exprimiert, welches von dem hTERT Promoter gesteuert wird und eine RGD-Sequenz in der HI Schleife des Fiber Proteins beinhaltet, ausführlich getestet worden. Die *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass Ad/TRAIL-F/RGD die Zellproliferation in Pankreas-, Hepatozellulären-, Kolon- und Lungenkarzinomzelllinien gegenüber den verwendeten Kontrollen signifikant hemmen kann und darüber hinaus stark apoptotisch wirksam ist. Dabei hat der zelltötende Effekt im Vergleich mit dem nicht RGD modifizierten Vorgängervektor Ad/gTRAIL in den Zelllinien Mia PaCa-2 (Pankreas), H358 (Lunge) und DLD-1 (Kolon) schon bei einer niedrigen Dosierung von 500 VP/Zelle eingesetzt, was für eine erhöhte Transduktion spricht. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei MiaPaCa-2 zu verzeichnen gewesen, der Zelllinie, die eine sehr geringe Dichte des CAR aufweist (30). Darüber hinaus hat Ad/TRAIL-F/RGD auch eine signifikant gesteigerte Transduktion gegenüber dem Vorgängervektor Ad/gTRAIL in Zellen mit hoher CAR Dichte. So ist in der Lungenkarzinomzelllinie H1299 eine sehr hohe CAR Expression gemessen worden (89). Zhang. et al. haben in einem Vergleich von Ad/TRAIL-F/RGD mit Ad/gTRAIL einen signifikant gesteigerten zelltötenden Effekt in dem Proliferationstest, eine signifikant gesteigerte Apoptoseinduktion und eine deutlich erhöhte Kaspase-8-Aktivität nachweisen können (89, 90). Dagegen hat in unseren Versuchen die Behandlung mit der Leerkontrolle PBS und dem Kontrollvektor Ad/CMV-GFP nur zu einem marginalen Zelluntergang geführt, der dem regulären Anteil toter Zellen entspricht. Es ist daher unter den verwendeten Dosierungen bis 2000 VP/Zelle nicht von einer erhöhten

Eigentoxizität des Kontrollvektors auszugehen. Die nachfolgende Durchflusszytometrie hat eine deutliche Transduktion der verwendeten Tumorzelllinien nach Behandlung mit adenoviralen Vektoren sowie eine Apoptoseinduktion anhand der gemessenen sub-G<sub>1</sub> Zellen bestätigt. Als Nachweis der eingeleiteten Apoptose ist die Expression des TRAIL-Proteins und der aktivierten Kaspase-8 bestimmt worden, welche nach Stimulation der Todesrezeptoren initial aktiviert wird. Eine weitere Bestätigung für die Tumorspezifität des Ad/TRAIL-F/RGD und damit des hTERT-Promotors ist durch die Behandlung von mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen worden. Es hat sich dabei keine Transduktion der Stammzellen, auch unter hohen Dosierungen bis zu 3000 VP/Zelle, nachweisen lassen. Das anschließende *in vivo* Experiment hat die an Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse bestätigt. Dabei ist als erste *in vivo*-Testung des Ad/TRAIL-F/RGD eine intratumorale Injektion unter möglichst realistischen Bedingungen erfolgt, weshalb einem orthotopen Pankreastumormodel der Vorzug gegenüber einem subkutanen Modell gegeben worden ist. Von einem subkutanen Tumormodell ist Abstand genommen worden, da diese Tumoren nur selten Metastasen ausbilden (63, 64), durch eine Behandlung teilweise zu einer verstärkten Regression neigen (65) und gegenüber dem Ursprungsparenchym andere Zelloberflächenmoleküle exprimieren (64), was das Ergebnis nachteilig beeinflussen kann.

Nach der erfolgreichen Etablierung des orthotopen Pankreastumormodells mit der humanen Tumorzelllinie Capan-1, haben die mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Tiere ein signifikant reduziertes Tumorstadium gegenüber den beiden Kontrollgruppen, die sich nicht unterschieden haben, gezeigt. Die vor und nach der Behandlung abgenommenen Transaminasen ASAT und ALAT waren bei allen Tieren der drei Gruppen im Normbereich, sodass von keiner Lebertoxizität des tumorspezifischen

adenoviralen Vektors ausgegangen werden kann. Damit hat Ad/TRAIL-F/RGD eine ebenso gute Verträglichkeit und ausbleibende Lebertoxizität wie der Vorgängervektor Ad/gTRAIL gezeigt, der durch seine hTERT vermittelte Tumorspezifität ebenfalls nicht hepatotoxisch gewesen ist (39, 43, 87). Den Nachweis der Apoptoseeinleitung in dem Tumorgewebe hat eine Folgestudie im M. D. Anderson Cancer Center erbracht, wobei Ad/TRAIL-F/RGD in der Kombination mit einer Radiotherapie zu einer signifikanten Apoptoseinduktion vier Tage nach der letzten Behandlung im Tumorgewebe von Lungentumoren geführt hat (90).

Obwohl Ad/TRAIL-F/RGD in unseren Untersuchungen in multiplen Tumorzelllinien und *in vivo* seine Wirksamkeit gezeigt hat, sind in Zukunft weitere Untersuchungen in Bezug auf CAR negative und resistente Zelllinien sowie kultivierten Tumorproben von Patienten anzuschließen. So haben Jee et al. in Patiententumorproben von Plattenepithelkarzinomen eine geringe CAR-Expression aufgezeigt, worin eine derzeit noch unbefriedigende Transduktion bei systemischer adenoviraler Applikation begründet sein könnte (31, 91). Außerdem verdichten sich die Anzeichen eines durch Chemotherapeutika getriggerten Synergismus in Kombination mit adenoviralen Vektoren, der im Tiermodell sogar in chemoresistenten Tumoren zu einer signifikanten Wachstumshemmung geführt hat (87, 92). Diese Erkenntnisse sind für zukünftige klinische Studien von besonderer Bedeutung, da durch die erhöhte Effektivität modifizierter Vektoren und den Synergismus einer Kombinationstherapie die virale Last gesenkt werden und folglich die gefürchteten Nebenwirkungen der viralen Toxizität wie Fieber, Schmerzen und Erkältungen bzw. eine überschießende Immunantwort minimiert werden könnten. Daher verwenden neuere klinische Studien die Kombination einer intratumoralen Applikation eines adenoviralen Vektors mit einem Chemotherapeutikum

(93) oder Bestrahlung (94) und erzielen dadurch deutlich bessere Ergebnisse, als die alleinige Gentherapie (95, 96).

Im Gegensatz zu anderen in der Gentherapie verwendeten Vektoren könnte Ad/TRAIL-F/RGD aufgrund seiner hTERT vermittelten Tumorspezifität zu einer potenten Transduktion in multiplen Karzinomen führen, welches oft ein unüberwindliches Hindernis dargestellt hat und deshalb in vielen gentherapeutischen Studien nicht zu der erhofften Tumorregression bzw. Verlangsamung der Progression geführt hat (96). Zusätzlich dürfte bei Verwendung des Ad/TRAIL-F/RGD die passagere Transaminasenerhöhung und folglich eine Hepatozytenschädigung unterbleiben. Dieser Begleiteffekt nach adenoviraler Administration ist häufig in klinischen Studien beobachtet worden, normalisiert sich jedoch meist nach einer Woche wieder (93, 96).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz großer Fortschritte gentherapeutischer Therapien in den vergangenen 20 Jahren die Applikationsform adenoviraler Vektoren immer noch ein Problem darstellt und die intratumorale Injektion zwar derzeit am gebräuchlichsten ist, jedoch nie den ganzen Tumor infizieren kann. Um den Vorteil der adenovirus vermittelten Gentherapie gegenüber chirurgischer oder alternativer, rein lokaler Therapieformen, auszuschöpfen, sollte die Konstruktion eines potenten tumor- und organspezifischen adenoviralen Vektors in den nächsten Jahren folgen.

## **4.2 Experiment II**

Die Leber ist nach den Lymphknoten das am häufigsten mit Metastasen verschiedenster Tumoren betroffene Organ (97, 98). Dabei sind nur bis zu 10% der Patienten mit Metastasen kurativ resektabel. Zusätzlich bestehen oft Mikrometastasen, die trotz moderner Diagnostik und einem intraoperativen Ultraschall nicht zu identifizieren sind,

sodass ein Tumorrezidiv nach erfolgreicher Resektion aus diesen „Tumornestern“ hervorgehen kann (99-101).

In dem vorangegangenen Experiment I hat die Verwendung von Ad/TRAIL-F/RGD eine signifikante tumorsuppressive Wirkung *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Allerdings liegt die Zukunft einer potenteren Gentherapie eher in einer Kombinationstherapie mit Radio-, Chemo- oder Radiochemotherapie um die Effektivität zu steigern. Daher haben wir eine Kombinationstherapie mit dem beim Pankreaskarzinom eingesetzten first-line Chemotherapeutikum Gemcitabin und Ad/TRAIL-F/RGD nach der Etablierung eines Pankreasmetastasenmodells in der Leber evaluiert, um einen additiven oder besser synergistischen Effekt nachzuweisen. Zusätzlich ist die systemische Applikation eines Vektors in der Tumor/Metastasenbehandlung von eminenter Bedeutung, um sicher auch kleinste Tumorabsiedlungen zu erreichen. Eigene Untersuchungen anhand einer Betagalaktosidasebestimmung haben eine nur sehr geringe Adenovirus-vermittelte Expression in Pankreas und Milz im Vergleich zur Leber gezeigt, die sich mit der Hepatotropie des Virus erklären lässt. Daher sind neben der Möglichkeit einer Aerosoltherapie bei Lungenmetastasen (87) gegenwärtig nur systemische Therapien von Lebertumoren bzw. Lebermetastasen erfolgversprechend durchzuführen, weshalb wir uns entschlossen haben, ein Pankreasmetastasenmodell in der Leber zu entwickeln. Die in dem Experiment gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass eine *TRAIL* Gentherapie in Kombination mit Gemcitabin zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität in humanen Pankreaskarzinomzelllinien führt. Dieser beobachtete synergistische Effekt einer Kombinationstherapie des TRAIL-Proteins mit verschiedenen Chemotherapeutika ist bereits von verschiedenen Autoren für das Brustkarzinom (87, 102) Ovarialkarzinom (103), Mesotheliom (104), Pankreaskarzinom (105, 106), Gliom

(107) und hepatozelluläre Karzinom (108) beschrieben worden. Dabei wird der Mechanismus des Synergismus in einer Höherregulation des Todesrezeptor (death receptor) DR4 oder DR5 bzw. beider vermutet (107-109), mit zum Teil kontroversen Ergebnissen. So haben Nagane et al. in humanen Gliomzellen eine deutlich gesteigerte Expression des DR5 in einer Kombinationstherapie von löslichem TRAIL und Etoposid bzw. Cisplatin (107) gezeigt. Dieses ist durch eine Studie von Gibson et al. bestätigt worden, in der humane Brustkrebszellen mit Etoposid und löslichem TRAIL behandelt worden sind (109). Die Untersuchung des synergistischen Mechanismus hat dabei eine Etoposid vermittelte Zunahme der Expression von DR4 und DR5 (109) gezeigt. Dagegen haben Liu et al. in humanen Mesotheliomzelllinien keine verstärkte Expression des DR5 nachweisen können (104). Allerdings hat sich eine erhöhte Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C gezeigt, sodass von einer Verstärkung dieses intrazellulären apoptotischen Weges ausgegangen wird (104).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen einen eventuellen Nutzen einer Kombinationstherapie, bestehend aus einem TRAIL exprimierenden adenoviralen Vektor und Chemotherapeutika für zukünftige multimodale Studien. Dabei ist jedoch von einer systemischen Applikation des adenoviralen Vektors für die Behandlung von Lebermetastasen auszugehen. Allerdings ist die Transduktion maligner Zellen nach systemischer Applikation im Gegensatz zu der direkten Tumoringektion deutlich verringert (49). Yoon et al. haben dieses in einem HCC Tumormodel in Nacktmäusen durch den Vergleich einer intratumoralen und systemischen Applikation eines betagalaktosidase exprimierenden adenoviralen Vektors (Ad2CMV beta gal) gezeigt. Die durch Chemiluminescence und Histochemie bestimmte Betagalaktosidase Expression nach der Schwanzveneninjektion hat eine starke Expression in der gesamten Leber,



aber nicht im Tumor gezeigt. Dagegen hat sich nach der intratumoralen Injektion ein umgekehrtes Expressionsmuster mit hohem Betagalaktosidase Nachweis im Tumor und eine schwachen Expression in einzelnen Hepatozyten nachweisen lassen (49). Daraus haben die Autoren geschlussfolgert, dass Barrieren in dem Endothel der Tumorgefäße existieren, die ein natürliches Hindernis für den adenoviralen Infektionsweg darstellen. Auf dieser Hypothese aufbauend, sind die in unserer Studie verwendeten Tumoren in der Leber in einem sehr frühen Stadium der Tumorgenese (nach vier Tagen), in dem das Endothel eventuell noch durchlässiger ist, therapiert worden. Die Ergebnisse der systemischen Behandlung mit Ad/TRAIL-F/RGD haben diese These unterstützt, da die alleinige Behandlung ein signifikant reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zu der Vektorkontrollgruppe aufzeigt hat. Zusätzlich ist der Nachweis eines synergistischen tumorsupprimierenden Effektes mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin *in vitro* und ein deutlich reduziertes Tumorwachstum *in vivo* nach systemischer Applikation des Ad/TRAIL-F/RGD erbracht worden. Eine ungeklärte Frage ist jedoch weiterhin, ob die systemische Administration des *TRAIL* Gens über den hTERT-Promoter in Kombination mit Gemcitabin auch in größeren Tumoren eine effektive Hemmung des Tumorwachstums bewirken kann. Ein limitierender Faktor dieser Therapie könnte jedoch die zu geringe Transduktionsrate des adenoviralen Gentransfers sein, da bei der systemischen Applikationsform auch die Existenz von adenovirale Vektoren neutralisierenden Antikörpern im Blut bedacht werden muss und aus Toxizitätsgründen der Virustiter nicht grenzenlos angehoben werden kann. Um dieses Problem des „Vektorschutzes“ zu umgehen, werden gegenwärtig mehrere Verfahren zur Neutralisierung der Antikörperreaktion erprobt. Eine Variante ist dabei das Verfahren der „PEGylation“. Im Jahre 1999 modifizierten O`Riordan et al. und 2001 Croyle et al.

adenovirale Vektoren mit Polymer Polyethylen Glykol (PEG), welches durch eine kovalente Bindung die antigenen Strukturen des Virus umhüllt und dadurch der Neutralisation durch zirkulierende Antikörper entgeht. Die Modifikation mit PEG-tresylmonomethoxypolyethylen Glykol (TMPEG) und aktiviertem Monomethoxypolyethylen Glykol (MPEGs), hat danach eine signifikant reduzierte T-Lymphozytenproduktion und deutlich verlängerte Genexpression von bis zu 42 Tagen in C57BL/6 Mäusen nach intratrachealer Applikation aufweisen können. Daneben sind die Konzentrationen von neutralisierenden Antikörpern sowohl in der Bronchiallavage als auch im Serum deutlich reduziert gewesen (110-112). Eine Senkung der inflammatorischen Immunantwort, gemessen an Interleukin-6 Spiegeln, haben darüberhinaus de Geest et al. durch die zusätzliche Gabe von Methylprednisolon erreicht (113). Des Weiteren kann die Verwendung einer auf Kollagen basierenden Matrix (auch bekannt als das Hämostatikum Gelfoam) die Transduktion anhand einer vaskulären Administration mit verzögerter Abgabe deutlich erhöhen (114). Eine weitere Alternative haben Yotnda et al. entwickelt, indem sie adenovirale Vektoren in bilamelläre DOTAP:chol Liposomen eingeschlossen haben. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung hat sich eine Entkapsulierung der Viren in der Zielzelle gezeigt, sodass dieses Verfahren auch für CAR negative oder resistente Zellen interessant sein dürfte (115).

#### **4.3 Aussichten**

Das antitumoröse Potential des adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD ist in einer am M.D. Anderson Cancer Center durchgeführten Folgestudie weiter bestätigt worden. Dort kombinierten Zhang et al. Ad/TRAIL-F/RGD mit einer Radiotherapie in

Lungenkarzinomzelllinien (90). Es hat sich dabei ein signifikant erhöhter zelltötender Effekt in der Kombinationstherapie gegenüber der alleinigen Ad/TRAIL-F/RGD oder Radiotherapie –Behandlung gezeigt und zusätzlich ist *in vivo* an subkutanen Tumoren eine signifikant gesteigerte Apoptose, eine reduziertes Tumorwachstum und ein verlängertes Überleben demonstriert worden.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass trotz modifizierender Maßnahmen der adenoviralen Bindungsmechanismen die Zukunft dieser Vektoren eher in so genannten helfer-abhängigen bzw. “gutless” Vektoren liegt. Dabei werden alle kodierenden Elemente des Virus entfernt, sodass eine Immunreaktion gegen endogen exprimierte adenovirale Proteine ausgeschlossen werden kann. Die zur Replikation und Verpackung der rekombinanten Adenoviren benötigten Proteine werden dabei in *trans* durch einen Adeno-Helfervirus zur Verfügung gestellt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind diese Vektoren erfolgreich in der Leber, dem Muskel- und zentralen Nervensystem getestet worden, wobei sich eine deutlich gesteigerte und prolongierte Genexpression sowohl in Kleintieren als auch in Primaten gezeigt hat. Jedoch benötigen diese “gutless” Vektoren zur eigenen Produktion Helferviren, wodurch ein Kontamination mit viralen Proteinen von 0.1%-1% eintritt, trotz Dekonterminationsverfahren wie z.B. mit dem Cre-loxP System (116). Dadurch ist der klinische Einsatz noch gefährdet, aber alternative Methoden zur Dekontermination sind in der Diskussion (116).

Eine weitere Methode der viralen Gentherapie ist der Einsatz von onkolytischen Viren. Bei dieser Methode infizieren die onkolytischen Viren die Tumorzellen und replizieren sich in diesen, wodurch eine Zellyse und Freisetzung von weiteren Viren eintritt. In der Tumorzelle vorhandene Mutationen ersetzen dabei die Funktionen der viralen abgeschalteten Replikationsgene (117).

Auch am M. D. Anderson Cancer Center ist in einer Nachfolgestudie die Effizienz des Vektors Ad/TRAIL-F/RGD durch Kombination mit dem onkolytischen Virus Delta24 gesteigert worden. Delta24 ist ein Adenovirus Serotyp 5, dessen E1A Region durch die Entnahme von 24bp (daher der Name), die verantwortlich sind für die virale Replikation, modifiziert worden ist. Werden normalen Zellen mit einem Adenovirus infiziert, interagiert das Retinoblastoma Protein (Rb) mit dem Virus und unterdrückt die Replikation, bis das Virus E1A exprimiert und daran Rb gebunden wird. Dadurch entsteht ungebundenes E2F, wodurch die Replikation eingeleitet wird. Dagegen kann eine Infektion mit dem Virus Delta24, dem die E1A Region fehlt, in normalen Zellen keine Replikation auslösen, da Rb an E2F gebunden ist. Fehlt aber Rb, wie in Tumorzellen, ist E2F nicht inhibiert und es kann eine ungehinderte Replikation ausgelöst werden (117). In einer von Guo et al. durchgeführten Studie hat die Kombination von Ad/TRAIL-F/RGD und Delta24 in humanen- und Mäusebrustkrebszellen eine über Delta24 induzierte Replikation des Ad/TRAIL-F/RGD und einen signifikanten zelltötenden Effekt *in vitro* sowie eine signifikante Tumorsuppression *in vivo* gegenüber den einzelnen Vektortherapien gezeigt. Zusätzlich hat sich eine signifikant reduzierte Anzahl von Lebermetastasen in der Kombinationstherapie nachweisen lassen (118). Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von onkolytischen Vektoren, die tumorspezifisch sind und in den Tumoren über einen weiteren Promoter E1A exprimieren. Davis et al. haben bei der Konstruktion des neuen Vektors einen tumorspezifischen hTERT-Promoter verwendet, der über die Kopplung mit einem kleinen Fragment eines CMV-Promoter eine deutlich gesteigerte Aktivität gezeigt hat als der wild-type hTERT-Promoter (119). Eine *in vitro* Testung in Lungen-, Pankreas- und Kolonkarzinomzellen hat dabei einen durch Ad/hTC-GFP-E1 ausgelösten zelltötenden Effekt von über 50% nach fünf Tagen

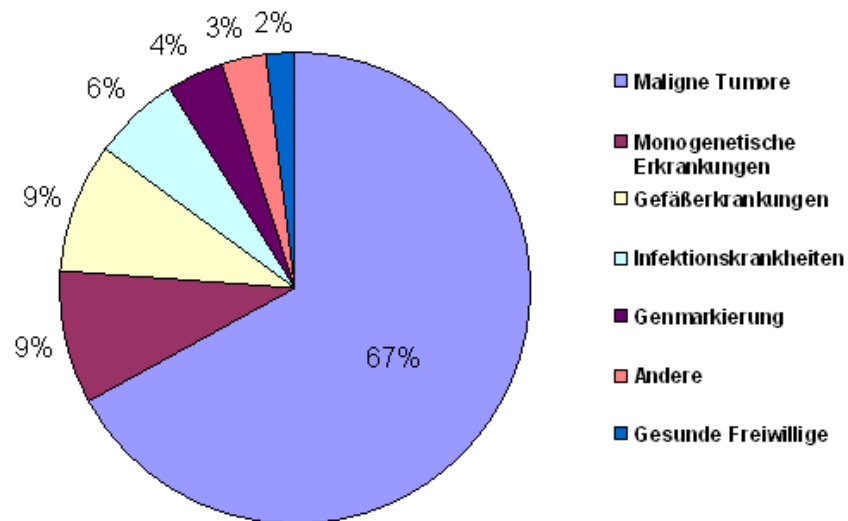
Inkubation bei einer MOI von 250 VP/Zelle erbracht. Außerdem ist in den *in vivo* Experimenten das Tumolvolumen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert und das Überleben signifikant verlängert gewesen (119). Bemerkenswert an diesen Ergebnissen ist neben der tumorspezifischen (Promoter gesteuerten) Replikation die geringe Dosierung von 250 MOI, wodurch in eventuell folgenden klinischen Studien die Gefahr der viralen Nebenwirkungen signifikant gesenkt werden könnte. Es werden sich voraussichtlich im Jahre 2007 weitere Folgestudien mit einem neu konstruierten onkolytischer Vektor anschliessend, der statt des *GFP* das *TRAIL* Gen exprimiert, wodurch ein wesentlich gesteigerter zelltödender Effekt erwartet wird.

Es bleibt daher abzuwarten, ob sich diese Systeme durchsetzen können und eventuell folgende klinische Studien den lang ersehnten Erfolg aufweisen können, auf den die Gentherapie anwendenden Forscher weltweit warten.

#### **4.4 Gentherapie in klinischen Studien 1989-2005**

Eine Übersicht über alle erfassten angefangenen, aktuell laufenden und abgeschlossenen klinischen gentherapeutischen Studien zwischen 1989 und 2005 (n = 1145) ist auf einer speziellen Seite des *Journal of Gene Medicine* ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)) einzusehen (Stand Januar 2006). Von diesen klinischen Studien befinden sich 62% in der Phase I, 14% in der Phase II und nur 2% haben bereits die Phase III erreicht. Die verbleibenden 22% verlaufen als Zwischenstufen.

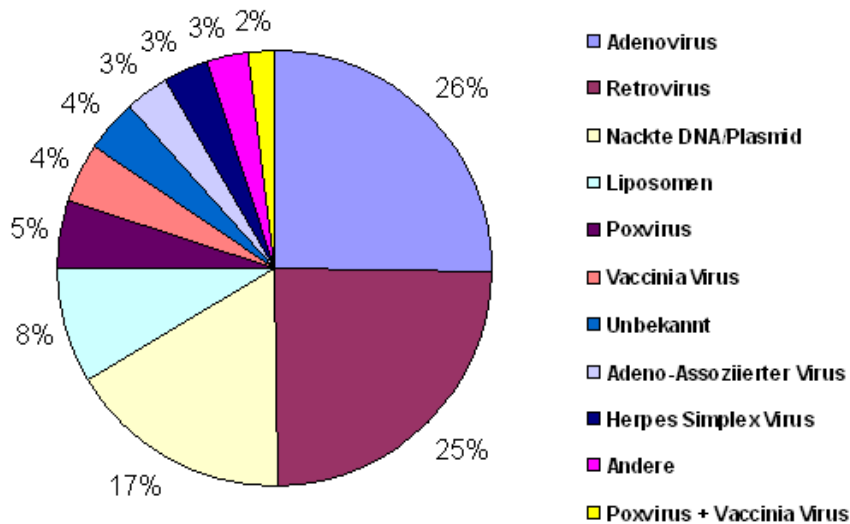
## Indikationen



**Abb.43:** Hauptindikationen gentherapeutischer Studien zwischen 1989 und 2005 (Journal of Gene Medicine, [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical), 2006).

Eine Darstellung der Hauptindikationen aller 1145 Studien zeigt mittlerweile ein deutliches Übergewicht der Behandlung maligner Tumoren mit 67%. Initial war die Therapie monogenetischer Erkrankungen (9%) und die Genmarkierung (4%) die Domäne der Gentherapie.

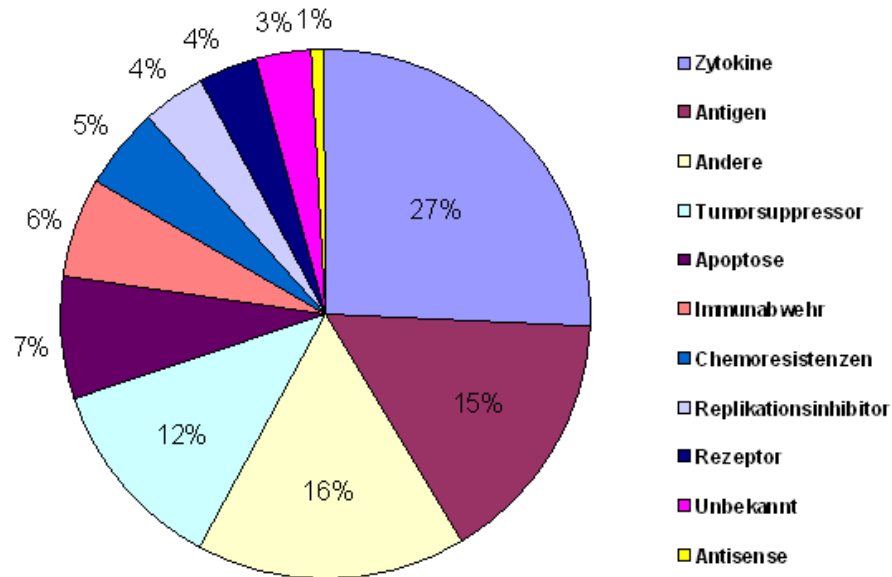
## Vektoren



**Abb.44:** Verwendete Vektoren gentherapeutischer Studien zwischen 1989 und 2005 (Journal of Gene Medicine, [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical), 2006).

Unter den 1145 hier aufgezeigten Studien zeigt sich ein deutliches Übergewicht der viralen Vektoren mit über 50%, in dem die adenoviralen Vektoren mit 26% im Vergleich zu den retroviralen Vektoren mit 25% leicht dominieren. Anfänglich bestand die Gentherapie jedoch fast ausschließlich aus Retroviren, bis 1984 Gluzman et al. das Adenovirus und Carter et al. sowie Muzyczka et al. das Adeno-assoziierte Virus einführen (10).

## Gene



**Abb.45:** Verwendete Gene gentherapeutischer Studien zwischen 1989 und 2005 (Journal of Gene Medicine, [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical), 2006).

Gegenwärtig liegt der klinische Schwerpunkt der Gentherapie in der Einschleusung von das Immunsystem stimulierenden Genen wie den Interleukinen, was in dieser Graphik mit einem Zytokinanteil von fast 30% aller verwendeten Gene zum Ausdruck kommt.



#### **4.4.1 Pankreaskarzinom**

Gegenwärtig existieren nur vier klinische Studien beim Pankreaskarzinom. Im Jahre 2001 sind in einer Phase-I-Studie 23 Patienten mit dem onkolytischen Virus ONYX-015 (dl1520) bei nicht resezierbarem Pankreaskarzinom computertomographisch durch intratumorale Punktion behandelt worden. Die Therapie ist dabei gut vertragen worden, ohne virale Nebenwirkungen. Jedoch ist nur bei sechs Patienten ein minimales Ansprechen auf die Therapie registriert worden, ohne einen Virusnachweis im Tumor (120). Zur Optimierung der intratumoralen Injektion ist 2002 eine Phase-I/II-Studie von Hecht et al. gefolgt, die endosonographisch einen Pankreastumor bei 21 Patienten durch die Injektion von ONYX-015 alleine und in Kombination mit Gemcitabin behandelt hat. Auch diese Ergebnisse sind unbefriedigend ausgefallen. Bei dem nur mit dem Virus behandelten Patienten ist keine Response zu verzeichnen gewesen und in der Kombination mit Gemcitabin haben zwei Patienten eine objektive Response und acht Patienten eine stabile Tumorgröße gehabt (121). Kritisch anzumerken ist hierbei, dass keine Kontrolle mit Gemcitabin als Monotherapie existiert hat und das Virus in zwei Dosierungen appliziert worden ist. Insgesamt sind bei verschiedenen Tumorentitäten über 200 Patienten in sechs Phase-I/II-Studien mit ONYX-015 behandelt worden und es ist bei keinem Patient in der Monotherapie zu einer objektiven Response gekommen (122).

Über die Verwendung des Oligodeoxynukleotid ISIS 2503 als Antisense-Inhibitor haben Perez et al. bei 30 Patienten berichtet, die nicht vorbehandelt worden sind. Nur zwei Patienten sind in ihrem Krankheitszustand stabil geblieben, welcher im Median nach zwei Monaten progressiv verlaufen ist (122). Eine Fortführung der Studie in der Kombination mit Gemcitabin bei 48 Patienten mit metastasierendem Pankreaskarzinom

hat zu einem medianen Überleben von 6,6 Monaten mit einer Response-Rate von 14.6% (darunter eine komplette Remission) bei guter Verträglichkeit der Therapie geführt (122).

Der Ansatz einer Induktion des Immunsystems ist durch die intratumorale Injektion eines mit dem *Interleukin-12* Gen versehenen adenoviralen Vektors unter anderem bei sieben Patienten mit einem Pankreaskarzinom in einer Phase-I-Studie getestet worden. Von den insgesamt 21 Patienten (HCC: n=9, kolorektales Karzinom: n=7, Pankreas: n=7) hat nur ein Patient mit einem HCC eine partielle Remission ausgebildet, 29% der Patienten haben einen stabilen Krankheitszustand bei insgesamt guter Verträglichkeit der Behandlung gehabt (123).

#### **4.4.2 Hepatozelluläres Karzinom**

Auch bei dem hepatozellulären Karzinom gibt es nur wenige gentherapeutische klinische Studien die bereits publiziert sind. Habib et al. haben 2002 10 Patienten in eine prospektiv randomisierten Studie eingeschlossen und die Patienten mit dem onkolytischen Virus ONYX-015 sowie die Kontrollgruppe mit Ethanolinjektionen behandelt. Es hat keine gravierenden Nebenwirkungen gegeben und in der Virusgruppe hat ein Patient ein partielle Remission und vier Patienten eine Progression der Erkrankung gehabt. Dagegen ist in der Ethanolgruppe bei zwei Patienten das Tumorwachstum stabil geblieben und zwei Patienten haben einen Progress gehabt (124). Hierbei ist anzumerken, dass neben dem unbefriedigenden Ergebnis auch die Anzahl der Patienten nicht besonders repräsentativ für eine objektive Aussage gewesen ist.

Die Möglichkeit einer Induktionstherapie des Immunsystems durch die intratumorale Injektion eines mit dem *Interleukin-12* Gen versehenen adenoviralen Vektors haben Sangro et al. in einer Phase-I-Studie an neun Patienten erprobt. Bei guter Verträglichkeit hat allerdings nur ein Patient eine partielle Remission ausgebildet (123).

Des Weiteren ist die Methode der Adenovirus-vermittelten Enzym-Prodrug-Therapie durch Einbringung des bakteriellen Enzyms Nitroreduktase zur Aktivierung des CB1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid) an Patienten mit primären und sekundären (kolorektale Lebermetastasen) Lebertumoren drei bis vier Tage vor der Resektion erprobt worden. Allerdings hat diese Phase-I-Studie an 18 Patienten nur einer Dosisfindung und der Dokumentation der Genexpression, Virusverträglichkeit und Immunantwort gedient, so dass keine Daten über eine eventuelle Response oder Rezidivrate vorhanden sind (125).

Außerdem ist bereits 1996 durch Habib et al. von der perkutanen Injektion des Tumorsuppressor Gens *p53* als nackte DNS bei fünf Patienten mit HCC berichtet worden. Damals haben drei Patienten eine objektive Tumorregression in der Computertomografie und eine Reduzierung des Serummarkers AFP gezeigt. Bedauerlicherweise sind danach keine weiteren Daten veröffentlicht worden (126).

#### **4.4.3 Kolorektale Tumoren**

##### **4.4.3.1 Kolonkarzinom**

Eine *ex vivo* Interleukin-2 (IL-2) Transduktion von Fibroblasten ist durch Sobol et al. in einer Phase-I-Studie bei 10 Patienten angewendet worden. Dabei sind die Fibroblasten mit einem *IL-2* Gen inkorporierten Retrovirus infiziert und nach Vermengung mit

bestrahlten autologen Tumorzellen wieder subkutan injiziert worden. Neben leichten grippeartigen Symptomen ist diese Therapie gut toleriert worden und es hat sich bei zwei von sechs Patienten eine Induktion von Vorstufen der zytotoxischen T-Lymphozyten nachweisen lassen. Außerdem haben fünf von 10 Patienten ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet. Trotz dieser geringen Erfolge, hat sich jedoch keine objektive Response ausgebildet (127). Eine weitere Phase-1-Vakzinationsstudie durch Suminami et al. mittels Interleukin-4 (IL-4) modifizierter autologer Fibroblasten hat zwei Wochen nach der Therapie eine bestehende IL-4 mRNS in den Tumorproben gezeigt, jedoch keine nachweisbare Induktion einer Immunantwort (128).

Die Möglichkeit einer Vakzinierung mit dem CEA haben Marshall et al. in einer Phase-I-Studie an neun Patienten untersucht, denen das in humanen Zellen nicht replizierende Kanarien-Pocken-Virus intramuskulär appliziert worden ist. Dabei sind keine Nebenwirkungen aufgetreten und sieben von neun Patienten haben CEA spezifische zytotoxische T-Zellen ausgebildet, allerdings auch keine objektiv messbare Response (129).

#### **4.4.3.2 Kolorektale Lebermetastasen**

Die immuntherapeutische Methode des *HLA-B7* (Gen der MHC Klasse 1) Gentransfers zur Stimulation der T-Zell-Antwort haben Rubin et al. 1997 in einer Phase-I-Studie erprobt. Dabei ist der liposomale Vektor ultraschallgesteuert 15 Patienten direkt in die Metastasen ohne Probleme injiziert worden. Bei 14 Patienten (93%) ist die Plasmid DNS über eine PCR nachgewiesen und das HLA-B7 Protein ist bei 50% der Patienten über Durchflusszytometrie bestimmt worden (130). Jedoch ist im Gegensatz zu einer

2001 durch Stopeck et al. veröffentlichten Phase-II-Studie bei Patienten mit metastatischen Melanom keine objektive Response erreicht worden (131).

Die subkutane Vakzinierung mit einem Carzino-embryonalen-Antigen (CEA) rekombinierten Virus in einer Phase-I-Studie bei 20 Patienten hat bei weniger als 20% der Patienten eine milde Reaktion an der Injektionsstelle und leichte Grippesymptome ausgelöst. Die Bildung einer CEA spezifischen Lymphozytenproliferation, IL-2 Freisetzung oder Antikörperbildung ist jedoch nicht nachgewiesen worden. Ebenso hat kein Unterschied in der subkutanen oder intradermalen Applikationsform bestanden (132). Dagegen sind in einer 2000 veröffentlichten Folgestudie bei sieben von 32 Patienten erstmals CEA spezifische Antikörper im Blut bestimmt worden, ohne jedoch dabei eine klinische Relevanz aufzuweisen (133). Nachfolgend sind durch die gleichen Autoren in einer Dosis-Eskalationsstudie an 17 Patienten wiederum keine CEA spezifischen Antikörper entdeckt worden, jedoch haben vier von 17 Patienten eine verstärkte Immunantwort ausgebildet (134).

Mehr Erfolg hat dagegen eine von Neidhard et al. veröffentlichte Vakzinierungsstudie an 11 Patienten aufweisen können. Ziel der Vakzinierung ist dabei das Zellmembranglykoprotein KSA (auch als EpCAM bezeichnet) gewesen, das von den meisten epithelialen Tumoren exprimiert wird. In Verbindung mit Monophosphoryllipid A (MPL) in Liposomen ist KSA subkutan injiziert worden, wobei dieses bei sechs Patienten mit humanen rekombinierten Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (rGM-CSF) durchgeführt worden ist. Dabei ist die Immunisation von allen Patienten gut toleriert worden und sieben von 11 Patienten haben eine signifikante KSA-spezifische Zellantwort und 73% KSA-spezifische Antikörper

ausgebildet. Des Weiteren ist eine Steigerung der zellulären Immunantwort bei den Patienten, die noch zusätzlich GM-CSF erhalten haben, beobachtet worden (135).

Ein Fortschritt ist bei der Korrektur von Tumorsuppressorgenen und dabei besonders dem *p53* verzeichnet worden. Venook et al. haben dabei über die Arteria hepatica einen mit *p53* (SCH58500) rekombinierten Adenovirus appliziert, der zusammen mit 5-Fluorouracilsäure bei 11 von 12 Patienten zu einer partiellen Response geführt hat (136). Die bisher veröffentlichten Phase-I-Studien, betreffend die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, haben einen sicheren *p53* Gentransfer ohne schwerwiegende Nebenwirkungen gezeigt. Darunter haben vor kurzem Tolcher et al. in einer Studie mit 17 Patienten (von diesen hatten 7 Patienten ein Kolonkarzinom), die ein Tumorleiden im fortgeschrittenen Stadium besessen haben, eine Präsenz des zirkulierenden Virus nach 24 Stunden und eine *p53* Transduktion im Tumorgewebe nachweisen können (137).

Das Prinzip der Enzym-Prodrug-Therapie ist dagegen bisher nur in Verträglichkeitsstudien getestet worden. So haben Sung et al. in einer Phase-I-Studie an 16 Patienten nachweisen können, dass die perkutane intratumorale Injektion eines adenoviralen Vektors, der das *Thymidinkinase* Gen beinhaltet, in Dosierungen bis zu  $1.0 \times 10^{13}$  VP/Patient nur zu geringen Nebenwirkungen führt. Dazu hat eine vorübergehende Erhöhung der ALAT bei 19% der Patienten, Fieber bei 31%, Leukopenie bei 19% und eine Thrombozytopenie bei 6% gezählt (93).

Mit einer systemischen Therapie durch einen onkolytischen Virus haben sich in einer klinischen Phase-I/II-Studie erstmalig Reid et al. beschäftigt, die bei 11 Patienten das replizierende Virus dl1520 (ONYX-015) über die Arteria hepatica in Kombination mit 5-Fluorouracilsäure (5-FU) und Leucovorin verabreicht haben. Auch hier haben sich nur geringe Nebenwirkungen nachweisen lassen und die antiviralen Antikörpertiter sind bei

allen Patienten signifikant angestiegen. Allerdings ist eine objektive Response nur bei einem Patienten nachweisbar gewesen, der vorher therapieresistent in der Einzeltherapie mit 5-FU oder dl1520 gewesen ist (138). In einer Nachfolgestudie sind 27 Patienten wiederum mit dl1520 und 5-FU behandelt worden, wobei 1 Patient ein schweres aber reversibles SIRS entwickelt hat. Zusätzlich hat die Kombinationstherapie eine antitumoröse Wirkung in vorher chemoresistenten Tumoren gezeigt, die jedoch nicht zu einer Remission geführt hat (139).

#### **4.5 Nachwort**

Festzuhalten bleibt aus den hier beschriebenen Studien, dass nach einer eher überschwänglichen Phase zwischen 1995 und 2002 die klinische Anwendung der Genterapie bei soliden malignen Tumoren eher rückläufig ist und daher noch keine überzeugenden Daten zur Bestätigung als vollwertige Therapiealternative vorhanden sind. Zusätzlich hat sich ein Großteil der vorhandenen und abgeschlossenen Studien mit der Dosisescalation beschäftigt, sodass relevante Daten über die eigentliche Tumorregression ausbleiben. Abschließend kann über den von unserer Gruppe vorgestellten adenoviralen Vektor gesagt werden, dass anhand von vorangegangenen und in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen, sehr wahrscheinlich der klinische Einsatz des Ad/TRAIL-F/RGD in Phase-I-Studien folgen wird. Im Gegensatz zu anderen Vektoren sollte Ad/TRAIL-F/RGD aufgrund seiner hTERT vermittelten Tumorspezifität zu einer potenten Transduktion in multiplen Karzinomen führen. Zusätzlich dürfte bei einer klinischen Verwendung des Ad/TRAIL-F/RGD die in Phase I/II Studien beschriebene passagere Transaminasenerhöhung und folglich

Hepatozytenschädigung unterbleiben. Dieser häufige Begleiteffekt nach adenoviraler Administration normalisiert sich meist nach einer Woche.

Trotz großer Fortschritte gentherapeutischer Therapien in den vergangenen 20 Jahren, stellt die Applikationsform über einen Vektor immer noch ein Problem dar. Um den Nutzen dieser Therapieform weiter ausschöpfen zu können, müssen die folgenden Punkte konsequent umgesetzt werden.

1. Steigerung der Effizienz des Gentransfers.
2. Steigerung des antitumorösen Effekts.
3. Erhöhung der spezifischen Genexpression in Tumorzellen.
4. Optimierung des systemischen Transportes, um alle Tumorzellen zu erreichen.
5. Das Provozieren einer auf die Tumorzelle beschränkten starken Immunreaktion.
6. Vermeidung der viral bedingten Nebenwirkungen.
7. Etablierung eines nicht-invasiven Monitoring der Genexpression.

Abschließend lässt sich bezüglich des noch nicht bewiesenen klinischen Nutzens der Gentherapie und deren fraglichen Stellenwert für die Zukunft der Tumorthapie eine Aussage von M. Löhr zitieren, die 2006 in der Zeitschrift für Gastroenterologie publiziert worden ist. „Es wird vermutlich so sein, wie es bei der Antikörper-Therapie gewesen ist: Die erste Welle...beim CRC (kolorektalen Karzinom) war ebenfalls ernüchternd bis wirkungslos. Zehn Jahre später kommt diese Therapiemodalität mit Macht und exzellenten Ansprechraten zurück zu den Patienten. Auch deswegen, weil sich die ausgewählten Ziele geändert haben und wir aus der Tumorbologie andere Ansätze, z.B. die Angiogenese, besser verstanden haben“ (140).



## 5 Literatur

1. Simonetti RG, Liberati A, Angiolini CPagliaro L. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 1997;8:117-36.
2. Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002;26:176-275.
3. Bohmig MRosewicz S. [Pancreatic carcinoma]. *Z Gastroenterol* 2004;42:261-8.
4. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray TThun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36.
5. Heinemann V. Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2002;29:23-31.
6. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, et al. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002;87:161-7.
7. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13.
8. Glimelius B, Hoffman K, Sjoden PO, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996;7:593-600.
9. Brand KStrauss M. Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. *In* Ganten D, Ruckpaul K, eds. *Handbuch der Molekularen Medizin*, Band 2. Berlin: Springer-Verlag, 1998. pp. 110-45.

10. <http://www.asgt.org/history.shtml>.
11. Wigler M, Silverstein S, Lee LS, et al. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 1977;11:223-32.
12. Anderson WF, Killos L, Sanders-Haigh L, Kretschmer P, Diacumakos EG. Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:5399-403.
13. Anderson W, Fletcher JC. Sounding boards. Gene therapy in human beings: when is it ethical to begin? *N Engl J Med* 1980;303:1293-7.
14. Eglitis MA, Kantoff P, Gilboa EA, Anderson WF. Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* 1985;230:1395-8.
15. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990;323:570-8.
16. Wilson JM, Grossman M, Raper SE, et al. Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther* 1992;3:179-222.
17. Crystal RG, Jaffe A, Brody S, et al. A phase 1 study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum Gene Ther* 1995;6:643-66.

18. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1995;1:1017-23.
19. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
20. 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. *Nat Med* 2000;6:879-85.
21. Kaneda Y Tabata Y. Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci* 2006;97:348-54.
22. Verma IM Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005;74:711-38.
23. Kresina TF. *An Introduction To Molecular Medicine And Gene Therapy*. New York: Wiley-Liss, 2001.
24. Nicklin SA, Wu E, Nemerow GR Baker AH. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol Ther* 2005;12:384-93.
25. Koch PE, Guo ZS, Kagawa S, et al. Augmenting transgene expression from carcinoembryonic antigen (CEA) promoter via a GAL4 gene regulatory system. *Mol Ther* 2001;3:278-83.

26. Fang B, Ji L, Bouvet M, Roth JA. Evaluation of GAL4/TATA in vivo. Induction of transgene expression by adenovirally mediated gene codelivery. *J Biol Chem* 1998;273:4972-5.
27. Gu J, Fang B. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S64-70.
28. Zhang L, Gu J, Lin T, et al. Mechanisms involved in development of resistance to adenovirus-mediated proapoptotic gene therapy in DLD1 human colon cancer cell line. *Gene Ther* 2002;9:1262-70.
29. Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, et al. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 1998;72:415-9.
30. Pearson AS, Koch PE, Atkinson N, et al. Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999;5:4208-13.
31. 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;22:2629-34.
32. Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, et al. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 1998;72:1844-52.
33. Dehari H, Ito Y, Nakamura T, et al. Enhanced antitumor effect of RGD fiber-modified adenovirus for gene therapy of oral cancer. *Cancer Gene Ther* 2003;10:75-85.

34. Wu H, Seki T, Dmitriev I, et al. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* 2002;13:1647-53.
35. Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ, et al. Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther* 2002;5:695-704.
36. Nakamura T, Sato K, Hamada H. Effective gene transfer to human melanomas via integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:613-26.
37. Koizumi N, Mizuguchi H, Hosono T, et al. Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568:13-20.
38. El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 2004;498:1-8.
39. Lin T, Huang X, Gu J, et al. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP-TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:8020-8.
40. Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000;6:564-7.
41. Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, et al. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 2000;356:827-8.

42. Voelkel-Johnson C, King DL, Norris JS. Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL. *Cancer Gene Ther* 2002;9:164-72.
43. Lin T, Gu J, Zhang L, et al. Targeted expression of green fluorescent protein/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion protein from human telomerase reverse transcriptase promoter elicits antitumor activity without toxic effects on primary human hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:3620-5.
44. Kagawa S, He C, Gu J, et al. Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Cancer Res* 2001;61:3330-8.
45. Gu J, Kagawa S, Takakura M, et al. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res* 2000;60:5359-64.
46. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue IF, Fidler IJ. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1999;1:50-62.
47. Bruns CJ, Shrader M, Harbison MT, et al. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int J Cancer* 2002;102:101-8.
48. Schumacher G, Kataoka M, Roth J, Mukhopadhyay T. Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999;5:493-9.

49. Yoon SK, Armentano D, Wands JRMohr L. Adenovirus-mediated gene transfer to orthotopic hepatocellular carcinomas in athymic nude mice. *Cancer Gene Ther* 2001;8:573-9.
50. Gu J, Andreeff M, Roth JAFang B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Ther* 2002;9:30-7.
51. Huang X, Lin T, Gu J, et al. Combined TRAIL and Bax gene therapy prolonged survival in mice with ovarian cancer xenograft. *Gene Ther* 2002;9:1379-86.
52. Stapfer M, Hu J, Wei D, Groshen SBear RW, Jr. Establishment of a nude mouse model of hepatic metastasis for evaluation of targeted retroviral gene delivery. *J Surg Oncol* 2003;82:121-30; discussion 31.
53. Fu XY, Theodorescu D, Kerbel RSHoffman RM. Extensive multi-organ metastasis following orthotopic onplantation of histologically-intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. *Int J Cancer* 1991;49:938-9.
54. Fu X, Herrera HHoffman RM. Orthotopic growth and metastasis of human prostate carcinoma in nude mice after transplantation of histologically intact tissue. *Int J Cancer* 1992;52:987-90.
55. Wang X, Fu X, Kubota THoffman RM. A new patient-like metastatic model of human small-cell lung cancer constructed orthotopically with intact tissue via thoracotomy in nude mice. *Anticancer Res* 1992;12:1403-6.
56. Fu XHoffman RM. Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Res* 1993;13:283-6.

57. Furukawa T, Fu X, Kubota T, et al. Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. *Cancer Res* 1993;53:1204-8.
58. An Z, Jiang P, Wang X, Moossa AR, Hoffman RM. Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:265-70.
59. Sun FX, Sasson AR, Jiang P, et al. An ultra-metastatic model of human colon cancer in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:41-8.
60. Bouvet M, Yang M, Nardin S, et al. Chronologically-specific metastatic targeting of human pancreatic tumors in orthotopic models. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:213-8.
61. Rashidi B, Sun FX, Jiang P, et al. A nude mouse model of massive liver and lymph node metastasis of human colon cancer. *Anticancer Res* 2000;20:715-22.
62. Lee NC, Bouvet M, Nardin S, et al. Antimetastatic efficacy of adjuvant gemcitabine in a pancreatic cancer orthotopic model. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:379-84.
63. Fidler IJ. Experimental orthotopic models of organ-specific metastasis by human neoplasms. *Adv Mol Cell Biol* 1994;9:191-215.
64. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:279-84.



65. Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CDFidler IJ. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992;52:98-104.
66. Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:272-306.
67. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603-8.
68. Grindey GB, Hertel LWPlunkett W. Cytotoxicity and antitumor activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine). *Cancer Invest* 1990;8:313.
69. Heinemann V, Hertel LW, Grindey GBPlunkett W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988;48:4024-31.
70. Marini FC, Shayakhmetov D, Gharwan H, Lieber AAndreeff M. Advances in gene transfer into haematopoietic stem cells by adenoviral vectors. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:847-56.
71. Peng HH, Wu S, Davis JJ, et al. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. *Anal Biochem* 2006;
72. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48:4827-33.
73. Jacob D, Davis JFang B. Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. *Gene Ther Mol Biol* 2004;8:213-9.

74. Chou TCTalalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 1981;115:207-16.
75. Hanna N. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1982;1:45-64.
76. Taniguchi N. Clinical significances of superoxide dismutases: changes in aging, diabetes, ischemia, and cancer. *Adv Clin Chem* 1992;29:1-59.
77. Arguello F, Baggs RB, Eskenazi AE, Duerst REFrantz CN. Vascular anatomy and organ-specific tumor growth as critical factors in the development of metastases and their distribution among organs. *Int J Cancer* 1991;48:583-90.
78. Kodama M, Kodama T, Nishi YTotani R. Does surgical stress cause tumor metastasis? *Anticancer Res* 1992;12:1603-16.
79. Stone AABovbjerg DH. Stress and humoral immunity: a review of the human studies. *Adv Neuroimmunol* 1994;4:49-56.
80. Woods JS, Holyoke E, Clason W, Sommers SWarren S. An experimental study of the relationship between tumor size and number of lung metastases. *Cancer* 1954;7:437-43.
81. Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur J Cancer* 1973;9:223-7.
82. Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, et al. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 1984;44:3584-92.
83. Jacob D, Davis J, Zhu H, et al. Suppressing orthotopic pancreatic tumor growth with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter. *Clin Cancer Res* 2004;10:3535-41.

84. Jacob D, Davis JJ, Zhang L, et al. Suppression of pancreatic tumor growth in the liver by systemic administration of the TRAIL gene driven by the hTERT promoter. *Cancer Gene Ther* 2005;12:109-15.
85. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, et al. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging* 2004;3:55-62.
86. Huang X, Lin T, Gu J, et al. Cell to cell contact required for bystander effect of the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Int J Oncol* 2003;22:1241-5.
87. Lin T, Zhang L, Davis J, et al. Combination of TRAIL gene therapy and chemotherapy enhances antitumor and antimetastasis effects in chemosensitive and chemoresistant breast cancers. *Mol Ther* 2003;8:441-8.
88. Katz MH, Spivack DE, Takimoto S, et al. Gene therapy of pancreatic cancer with green fluorescent protein and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion gene expression driven by a human telomerase reverse transcriptase promoter. *Ann Surg Oncol* 2003;10:762-72.
89. Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, et al. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'). *Oncogene* 2005;24:3130-40.
90. Zhang X, Cheung RM, Komaki R, Fang B, Chang JY. Radiotherapy sensitization by tumor-specific TRAIL gene targeting improves survival of mice bearing human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6657-68.
91. Kim M, Sumerel LA, Belousova N, et al. The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells. *Br J Cancer* 2003;88:1411-6.

92. Uchida H, Shinoura N, Kitayama J, et al. 5-Fluorouracil efficiently enhanced apoptosis induced by adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in DLD-1 colon cancer cells. *J Gene Med* 2003;5:287-99.
93. Sung MW, Yeh HC, Thung SN, et al. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2001;4:182-91.
94. Swisher SG, Roth JA, Komaki R, et al. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:93-101.
95. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996;2:985-91.
96. Habib NA, Sarraf CE, Mitry RR, et al. E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors. *Hum Gene Ther* 2001;12:219-26.
97. Kavolius J, Fong Y, Blumgart LH. Surgical resection of metastatic liver tumors. *Surg Oncol Clin N Am* 1996;5:337-52.
98. McCarter MD, Fong Y. Metastatic liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000;19:177-88.
99. Hosch SB, Steffani KD, Scheunemann P, Zibicki JR. Micrometastases from HBP malignancies and metastatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:583-91.
100. Charnsangavej C, Loyer EM, Iyer RB, Choi HK, Kaur H. Tumors of the liver, bile duct, and pancreas. *Curr Probl Diagn Radiol* 2000;29:69-107.
101. Paulson EK. Evaluation of the liver for metastatic disease. *Semin Liver Dis* 2001;21:225-36.

102. Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999;59:734-41.
103. Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S. Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001;81:380-90.
104. Liu W, Bodle E, Chen JY, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:111-8.
105. Matsuzaki H, Schmied BM, Ulrich A, et al. Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:407-14.
106. Xu ZW, Kleeff J, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Synergistic cytotoxic effect of TRAIL and gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2003;23:251-8.
107. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, et al. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000;60:847-53.
108. Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* 2000;32:482-90.

109. Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol* 2000;20:205-12.
110. Croyle MA, Chirmule N, Zhang Y, Wilson JM. "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung. *J Virol* 2001;75:4792-801.
111. Croyle MA, Chirmule N, Zhang Y, Wilson JM. PEGylation of E1-deleted adenovirus vectors allows significant gene expression on readministration to liver. *Hum Gene Ther* 2002;13:1887-900.
112. O'Riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, et al. PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 1999;10:1349-58.
113. De Geest B, Snoeys J, Van Linthout S, Lievens J, Collen D. Elimination of innate immune responses and liver inflammation by PEGylation of adenoviral vectors and methylprednisolone. *Hum Gene Ther* 2005;16:1439-51.
114. Park BH, Lee JH, Jeong JS, et al. Vascular administration of adenoviral vector soaked in absorbable gelatin sponge particles (GSP) prolongs the transgene expression in hepatocytes. *Cancer Gene Ther* 2005;12:116-21.
115. Yotnda P, Chen DH, Chiu W, et al. Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses. *Mol Ther* 2002;5:233-41.
116. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12 Suppl 1:S18-27.

117. Davis JJ, Fang B. Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. *J Gene Med* 2005;7:1380-9.
118. Guo W, Zhu H, Zhang L, et al. Combination effect of oncolytic adenovirotherapy and TRAIL gene therapy in syngeneic murine breast cancer models. *Cancer Gene Ther* 2006;13:82-90.
119. Davis JJ, Wang L, Dong F, et al. Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter. *Cancer Gene Ther* 2006;13:720-3.
120. 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 Ther* 2001;8:308-15.
121. 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;9:555-61.
122. Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:285-98.
123. 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;22:1389-97.
124. Habib N, Salama H, Abd El Latif Abu Median A, et al. Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2002;9:254-9.

125. Palmer DH, Mautner V, Mirza D, et al. Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1546-52.
126. Habib NA, Ding SF, el-Masry R, et al. Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev* 1996;20:103-7.
127. Sobol RE, Shawler DL, Carson C, et al. Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin Cancer Res* 1999;5:2359-65.
128. Suminami Y, Elder EM, Lotze MT Whiteside TL. In situ interleukin-4 gene expression in cancer patients treated with genetically modified tumor vaccine. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995;17:238-48.
129. Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol* 1999;17:332-7.
130. Rubin J, Galanis E, Pitot HC, et al. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. *Gene Ther* 1997;4:419-25.
131. Stopeck AT, Jones A, Hersh EM, et al. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:2285-91.



132. Conry RM, Khazaeli MB, Saleh MN, et al. Phase I trial of a recombinant vaccinia virus encoding carcinoembryonic antigen in metastatic adenocarcinoma: comparison of intradermal versus subcutaneous administration. *Clin Cancer Res* 1999;5:2330-7.
133. Conry RM, Allen KO, Lee S, et al. Human autoantibodies to carcinoembryonic antigen (CEA) induced by a vaccinia-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 2000;6:34-41.
134. Conry RM, Curiel DT, Strong TV, et al. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:2782-7.
135. Neidhart J, Allen KO, Barlow DL, et al. Immunization of colorectal cancer patients with recombinant baculovirus-derived KSA (Ep-CAM) formulated with monophosphoryl lipid A in liposomal emulsion, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 2004;22:773-80.
136. Palmer DH, Chen MJ, Kerr DJ. Gene therapy for colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002;64:201-25.
137. Tolcher AW, Hao D, de Bono J, et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2052-8.
138. 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.

139. 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;62:6070-9.
140. Lohr M. [Gene therapy approaches to gastrointestinal tumors]. *Z Gastroenterol* 2006;44:333-40.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Studie ist ein neu konstruierter adenoviraler Vektor getestet worden, der den schwachen tumorspezifischen humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) Promoter beinhaltet, welcher in über 85% aller humanen Karzinome aktiv ist bei gleichzeitiger Inaktivität in den meisten somatischen Zellen. Das Problem der niedrigen Genexpression des hTERT-Promoters ist dabei durch ein Verstärkungssystem umgangen worden. Dabei exprimiert der schwache tumorspezifische Promoter (hTERT) das GAL4/GV16 Fusionsprotein in den Tumorzellen, wodurch ein GAL4/TATA (GT) Promoter mit niedriger Basalaktivität aktiviert wird und in den Tumorzellen eine stark erhöhte Expression des TRAIL-Proteins auslöst. Aufgrund einer häufig beobachteten Resistenzbildung bei einer wiederholten Applikation des Adenovirus, die auf einer Runterregulation des initialen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) beruht, ist das Virus mit einer Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) Sequenz in der HI Schleife des Fiber-Proteins zur verbesserten Transduktion modifiziert worden. Die *in vitro* Testung des Ad/TRAIL-F/RGD hat dabei in Pankreas-, Hepatozellulären-, Kolon- und Lungenkarzinomzelllinien eine deutliche Proliferationshemmung (XTT-Test) und Apoptoseinduktion (Durchflusszytometrie) gegenüber den Kontrollgruppen Phosphate-Buffered Saline (PBS) und Ad/CMV-GFP. Zusätzlich hat der Vergleich mit dem nicht RGD-modifizierten Vorgängervektor Ad/gTRAIL in mehreren Tumorzelllinien eine deutlich erhöhte Proliferationshemmung bei einer niedrigen Infektionsrate von 500 Viruspartikel/Zelle gezeigt. Die weitere *in vivo* Testung an einem vorher etablierten orthotopen Pankreastumormodel durch dreimalige intratumorale Injektion hat zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum in den mit Ad/TRAIL-F/RGD behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen geführt. Die Tumorspezifität des Vektors ist dabei durch

normwertige Leberenzyme nachgewiesen worden. Zusätzlich ist *in vitro* eine nicht vorhandene Transduktion von mesenchymalen Stammzellen aufgezeigt worden. Zur Überprüfung einer möglichen systemischen Therapie und Steigerung der Effizienz ist eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin als Folgeexperiment angeschlossen worden. Dabei hat sich *in vitro* ein starker Synergismus gezeigt. Zur weiteren Überprüfung ist ein Pankreastumormodel in der Leber etabliert und der adenovirale Vektor dreimal systemisch mit oder ohne die intraperitoneale Gabe von Gemcitabin appliziert worden. Die Auswertung der Tumoreale hat eine signifikante Tumorstillstandshemmung in den mit Ad/TRAIL-F/RGD und der Kombination aus Ad/TRAIL-F/RGD und Gemcitabin behandelten Tieren gegenüber der Kontrolle und Gemcitabin als alleiniger Therapie ergeben. Allerdings ist der Unterschied zwischen der Einzelgabe von Ad/TRAIL-F/RGD im Vergleich zu der Kombinationstherapie mit Gemcitabin zwar deutlich, aber nicht signifikant gewesen. Diese Ergebnisse haben eine signifikante Tumorstillstandshemmung durch intratumorale und systemischer Applikation des neuen adenoviralen Vektors Ad/TRAIL-F/RGD gezeigt. Es bleibt abzuwarten, ob der Einsatz in dieser Kombination mit Gemcitabin in klinischen Studien folgt, oder ob eher eine Kombination mit onkolytischen Viren erfolgsversprechender ist.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ADA	Adenosin-Deaminase-Mangel
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
ALAT	Alanin Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ASAT	Aspartat Aminotransferase
Bp	Basenpaare
CEA	Carcinoembryonale Antigen
CCC	Cholangiozelluläre Karzinome
CD34	Cluster Determinante 34 (Oberflächenrezeptor)
CI	Combination Index
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FCS	Fetales Kälberserum
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
GT	GAL4/TATA
GCV	Ganciclovir
rGM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HCC	Hepatozelluläre Karzinome
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
HSV-tk	Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase

IL	Interleukin
LTR	Long Terminal Repeat
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mu	Map Units
MEM	Minimum Essential Medium
MPEGs	Monomethoxypolyethylen Glykol
MOI	Multiplicity Of Infection
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
OD	Optische Dichte
TMPEG	PEG-tresylmonomethoxypolyethylen Glykol
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFU	Plaque-forming units
p-GCV	phosphorylierte Form des Ganciclovirs
PEG	Polymer Polyethylen Glykol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidium Iodid
Rb	Retinoblastoma Protein
RT	Reverse Transkriptase
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV-LTR	Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeats
SV40	Simian Virus 40
SOI	Surgical Orthotopic Implantation
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
TK	Thymidinkinase
TRAIL	Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
<i>wt p53</i>	<i>wild type p53</i>

## **8 Danksagung**

Mein tiefster Dank gilt Herrn Professor Dr. Peter Neuhaus für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der Möglichkeit, diese Arbeit zu realisieren. Zusätzlich möchte ich mich sehr bei Herrn PD Dr. Guido Schumacher bedanken, auf dessen Vorschlag und Einsatz ein Forschungsaufenthalt im M.D. Anderson Cancer Center in Houston, USA, ermöglicht worden ist.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery des MD Anderson Cancer Center in Houston und darunter insbesondere Prof. Dr. Jack A. Roth als Direktor und Prof. Dr. Bingliang Fang als Leiter des Vector Cores. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. John Davis der mir bei allen Experimenten immer hilfreich zur Seite gestanden hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden Dr. med. Marcus Bahra und Dr. med. Tobias Lindner für die langjährige mentale und medizinische Unterstützung bedanken, bei Herrn Prof. Dr. Jan Langrehr und Herrn PD Dr. Ulf Neumann und natürlich bei meinen Eltern Dr. med. Wolfgang Jacob und Haidelis Jacob, sowie meiner Frau Nina, Tochter Maya und meinem Schwiegervater Dr. med. Tankred Haase.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Charité

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift