

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
Technische Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

# **Untersuchungen eines E1B55K-deletierten IL-2-Gen tragenden Adenovirus im Prostatakarzinommodell**

Claas Heinrich Hinze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
2. Priv.-Doz. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 08.05.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.



Für meine lieben Eltern



---

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>VORWORT.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>Gentherapie.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>Vektoren in der Gentherapie.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3</b>	<b>Adenoviren.....</b>	<b>15</b>
4.3.1	Überblick über Adenoviren.....	15
4.3.2	Biologie der Adenoviren.....	16
4.3.3	Adenoviren als Genvektoren.....	20
4.3.4	Verwendete Transgene.....	22
4.3.5	Strategien zur Optimierung tumor-selektiver Adenoviren.....	23
4.3.6	Replizierende Adenoviren in der onkologischen Therapie.....	25
4.3.7	Onyx-015 (dl1520).....	26
4.3.8	Replizierende Adenoviren in Kombination mit Chemotherapie.....	30
4.3.9	Sicherheit von Adenoviren in der Gentherapie.....	30
<b>4.4</b>	<b>Interleukin-2 .....</b>	<b>32</b>
4.4.1	Funktionen und Biologie von Interleukin-2.....	32
4.4.2	Klinische Anwendungen von IL-2.....	33
4.4.3	Nebenwirkungen der IL-2 Therapie.....	34
4.4.4	Effekt von humanem Interleukin-2 auf murine Lymphozyten .....	34
<b>4.5</b>	<b>IL-2 -Gentherapie mittels adenoviraler Vektoren.....</b>	<b>35</b>
4.5.1	Nichtreplizierende Adenoviren und IL-2 – Zytokin-Gentherapie.....	35
4.5.2	Replizierende Adenoviren und IL-2 .....	35
<b>4.6</b>	<b>Kombination von Onkolyse und Gentransfer – <i>two-pronged approach</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Bereits in der Arbeitsgruppe erhobene Befunde .....</b>	<b>37</b>

---

---

<b>5</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Zellkulturmethoden.....</b>	<b>39</b>
6.1.1	Zellen.....	39
6.1.2	Zellkultur.....	39
<b>6.2</b>	<b>Virusarbeiten .....</b>	<b>40</b>
6.2.1	Verwendete Adenoviren.....	40
6.2.2	Kotransfektion.....	42
6.2.3	Kultivierung von Zellen und Infektion mit Adenoviren .....	42
6.2.4	Plaque Assay .....	43
6.2.5	Bestimmung der Viruspartikelkonzentration .....	44
6.2.6	Herstellung von nicht aufgereinigten Virusstammlösungen .....	44
6.2.7	Herstellung von aufgereinigten hochkonzentrierten Virusstammlösungen.....	45
6.2.8	Ermittlung der Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien durch Adenoviren .....	46
6.2.9	Darstellung des CPE mittels Kristallviolett färbung .....	47
6.2.10	Bestimmung der Zytotoxizität mittels Zellproliferationsassay .....	47
<b>6.3</b>	<b>Tierversuch .....</b>	<b>49</b>
6.3.1	Tierhaltung .....	49
6.3.2	Tiere .....	49
6.3.3	Aufbereitung und Injektion von DU 145 Zellen .....	49
6.3.4	Kontrolle und Messung des Tumorwachstums .....	50
6.3.5	Intratumorale Injektion von Adenoviren.....	50
6.3.6	Opferung / Blutabnahme / Dissektion der Balb/C nu/nu Mäuse.....	51
6.3.7	Verarbeitung der entnommenen Tumore und Organe.....	52
6.3.8	Bestimmung der humanen Interleukin-2-Konzentration.....	52
<b>6.4</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>52</b>
<b>6.5</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten .....</b>	<b>53</b>
6.5.1	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse und CsCl -Gradienten-Zentrifugation.....	53
<b>6.6</b>	<b>Statistische Methoden.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>7.1</b>	<b>Unterschiedliche Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit Adenoviren.....</b>	<b>56</b>

---

---

<b>7.2</b>	<b>Ausgeprägter zytopathischer Effekt von replizierenden Adenoviren .....</b>	<b>59</b>
7.2.1	Darstellung mittels Kristallviolett färbung .....	59
7.2.2	Darstellung mittels MTT Assay .....	62
7.2.3	Darstellung mittels phasenkontrastmikroskopischer Aufnahmen .....	65
<b>7.3</b>	<b>Replikation von E1B55K-deletierten Adenoviren in allen verwendeten Prostatakarzinom Zelllinien.....</b>	<b>66</b>
<b>7.4</b>	<b>Gesteigerte IL-2 Produktion nach Infektion mit einem replikationskompetenten IL-2 Gen tragenden Adenovirus.....</b>	<b>68</b>
<b>7.5</b>	<b>Transgeninsertion in der E3 Region führt zu deutlich verminderten Transgenexpression – Überkompensation durch Replikationskompetenz .....</b>	<b>69</b>
<b>7.6</b>	<b>Koinfektion zur Steigerung der Transgenexpression .....</b>	<b>70</b>
<b>7.7</b>	<b>Tumorinduktion durch DU145 Zellen in Balb/C nu/nu Mäusen .....</b>	<b>71</b>
<b>7.8</b>	<b>Hohe Plasma IL-2-Spiegel nach intratumoraler Injektion.....</b>	<b>72</b>
<b>7.9</b>	<b>Nachweis intratumoraler Adenovirupartikel und Transgenexpression .....</b>	<b>74</b>
<b>7.10</b>	<b>Verlängertes Überleben nach intratumoraler Injektion von IL-2 Gen tragenden und replizierenden Adenoviren .....</b>	<b>77</b>
<b>7.11</b>	<b>Verzögertes Tumorwachstum nach intratumoraler Adenovirusinjektion .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>8.1</b>	<b><i>In vitro</i> Ergebnisse .....</b>	<b>83</b>
8.1.1	Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien .....	83
8.1.2	Zytopathischer Effekt.....	85
8.1.3	Replikationsfähigkeit.....	87
8.1.4	IL-2 Produktion.....	88
<b>8.2</b>	<b>Diskussion des Tiermodells .....</b>	<b>89</b>
<b>8.3</b>	<b><i>In vivo</i> Ergebnisse.....</b>	<b>91</b>
8.3.1	Tumorwachstum .....	91
8.3.2	IL-2 Produktion.....	91
8.3.3	Tumorregression .....	92

---

---

<b>8.4</b>	<b>Unterschiedliche Befunde des onkolytischen Effekts im <i>in vitro</i> und im <i>in vivo</i> Modell.....</b>	<b>93</b>
8.4.1	Verwendetes <i>in vitro</i> Modell.....	93
8.4.2	Position des Transgens.....	94
8.4.3	Verwendeter Mausstamm.....	95
8.4.4	Probleme der Administration der Virussuspension.....	95
8.4.5	Effekt der Deletion der E3-Region.....	96
8.4.6	Einfluß der IL-2-Expression auf virale Replikation und Propagation innerhalb des Tumors.....	97
<b>8.5</b>	<b>Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei Anwendung im Menschen .....</b>	<b>98</b>
8.5.1	Toxizität von IL-2 .....	99
8.5.2	Toxizität von Adenoviren.....	99
8.5.3	Immunität .....	100
8.5.4	Noch verstärkte subtraktive Aktivität des replizierenden IL-2-produzierenden Adenovirus.....	100
<b>8.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>101</b>
8.6.1	Erhalt der ADP Region .....	101
8.6.2	Besserer Zielzelltropismus .....	101
8.6.3	Geringere immunologische Antwort und Toxizität.....	102
8.6.4	Regulierbares Transgen.....	103
8.6.5	Bessere Administrationstechnik.....	103
8.6.6	Verbesserte Tiermodelle .....	104
8.6.7	Besseres Verständnis der Interaktion von onkolytischen Adenoviren, Tumorzellen und Immunantwort .....	104
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>MATERIAL UND BEZUGSQUELLENACHWEIS.....</b>	<b>107</b>
<b>10.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>107</b>
<b>10.2</b>	<b>Rezepte.....</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>114</b>
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>116</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>137</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>138</b>

---

---

## 2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über Genvektoren .....	15
Tabelle 2: Starke Variation der $MOI_{50}$ und $MOI_{75}$ der verschiedenen Zelllinien.....	59
Tabelle 3: Plasma IL-2 Nachweis nach intratumoraler Injektion.....	72
Abbildung 1: Zahl der Suchergebnisse "gene therapy".....	11
Abbildung 2: In Gentherapiestudien behandelte Erkrankungen – Stand 2002.....	12
Abbildung 3: Verwendete Vektoren in klinischen Gentherapiestudien.....	14
Abbildung 4: Struktur des Adenovirus Virion.....	17
Abbildung 5: Struktur des adenoviralen Genoms.....	17
Abbildung 6: Ereignisse und Zeitverlauf der adenoviralen Replikation.....	19
Abbildung 7: Mechanismen des adenovirusvermittelten Zelltods.....	20
Abbildung 8: Prinzip tumorselektiver replizierender Viren.....	24
Abbildung 9: Vorgeschlagene Mechanismen der Wirkung von Ad1520 (Onyx-015).....	28
Abbildung 10: Vorteile der Verwendung transgener replizierender Adenoviren.....	36
Abbildung 11: Verwendete Adenoviren.....	41
Abbildung 12: Verwendete Plasmide zur Kotransfektion.....	42
Abbildung 13: Durchflusszytometrie - Gate zum Ausschluss der toten Zellen.....	47
Abbildung 14: Die Transduktionsrate und –intensität ist abhängig von der MOI - Fluoreszenzmikroskopie.....	56
Abbildung 15: Die Transduktionsrate und –intensität ist abhängig von der MOI - Durchflusszytometrie.....	57
Abbildung 16: Unterschiedliche Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien – Graphische Darstellung.....	58
Abbildung 17: Berechnung der $MOI_{50}$ und $MOI_{75}$ .....	58
Abbildung 18: Deutlicher zytopathischer Effekt von replizierenden Adenoviren - Kristallviolett färbung.....	60
Abbildung 19: Abhängigkeit des zytopathischen Effekts von der verwendeten MOI.....	61
Abbildung 20: Zytopathischer Effekt nach Infektion mit niedrigen MOIs setzt zwischen Tag 4 und 6 ein.....	61
Abbildung 21: MTT Assay zeigt zytopathischen Effekt in Abhängigkeit von verwendeter MOI.....	63
Abbildung 22: MTT Assay zeigt zytopathischen Effekt im Zeitverlauf.....	64
Abbildung 23: Zytopathischer Effekt in Abhängigkeit von der verwendeten MOI - Phasenkontrastmikroskopie.....	65
Abbildung 24: Hohe Virusfreisetzung nach Infektion mit E1B55K-deletierten Adenoviren.....	66
Abbildung 25: Replikationskompetentes IL-2 Gen tragendes Adenovirus erzeugt hohe IL-2 Produktion.....	68
Abbildung 26: Transgenposition hat großen Einfluss auf die IL-2 Produktion.....	69
Abbildung 27: Kombinierte Infektion ermöglicht hohe IL-2 Produktion.....	70
Abbildung 28: Tumorwachstum nach Injektion unterschiedlicher Zellmengen.....	71
Abbildung 29: Replizierende und nichtreplizierende Viren mit IL-2 Gen erzeugen ähnliche Plasma IL-2 Spiegel nach intratumoraler Injektion.....	73
Abbildung 30: Nachweis von intratumoralen Adenoviruspartikeln – AdMA55.....	74
Abbildung 31: Erfolgreiche Transduktion nach intratumoraler Injektion mit AdMA55.....	76
Abbildung 32: Nachweis von intratumoralen Adenoviruspartikeln – AdSW8.....	76
Abbildung 33: Erfolgreiche Transduktion nach intratumoraler Injektion mit AdMA55.....	77

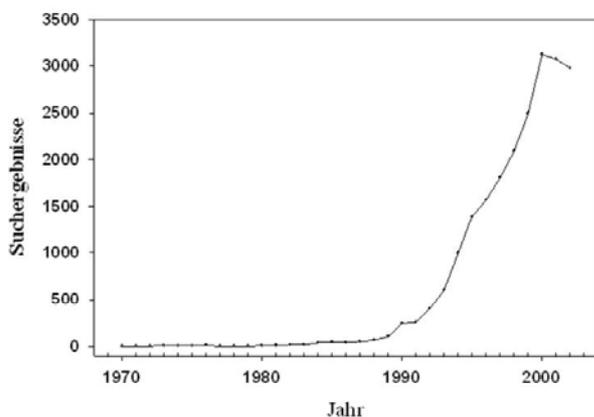
---

Abbildung 34: Überleben und Tumorwachstum nach i.t. Injektion I.....	78
Abbildung 35: Überleben und Tumorwachstum nach i.t. Injektion II.....	79
Abbildung 36: Kaplan-Meier Analyse zeigt verlängertes Überleben von Mäusen nach i.t. Injektion von IL-2 Gen tragenden Adenoviren.....	80
Abbildung 37: Darstellung des verzögerten Tumorwachstums nach initialer Adenovirusinjektion Ia.....	81
Abbildung 38: Darstellung des verzögerten Tumorwachstums nach initialer Adenovirusinjektion Ib.....	81
Abbildung 39: Darstellung des verzögerten Tumorwachstums nach initialer Adenovirusinjektion II.....	82
Abbildung 40: Parameter des Antitumoreffektes von replizierenden Viren.....	97

---

### 3 VORWORT

Das Konzept der Gentherapie hat in seiner kurzen Geschichte einen enormen Zuwachs an Interesse durchlaufen. Definiert als die Einbringung von normalen oder genetisch veränderten Genen in Zellen, um defekte Gene zu ersetzen oder deren Funktion wiederherzustellen (Kay et al. 1997), wurde die Bezeichnung „Gentherapie“ („*gene therapy*“) das erste Mal im Jahr 1970 verwendet (Osterman et al. 1970) und die erste klinische Studie im Jahr 1990 begonnen (Blaese 1995).



**Abbildung 1: Zahl der Suchergebnisse "gene therapy"**

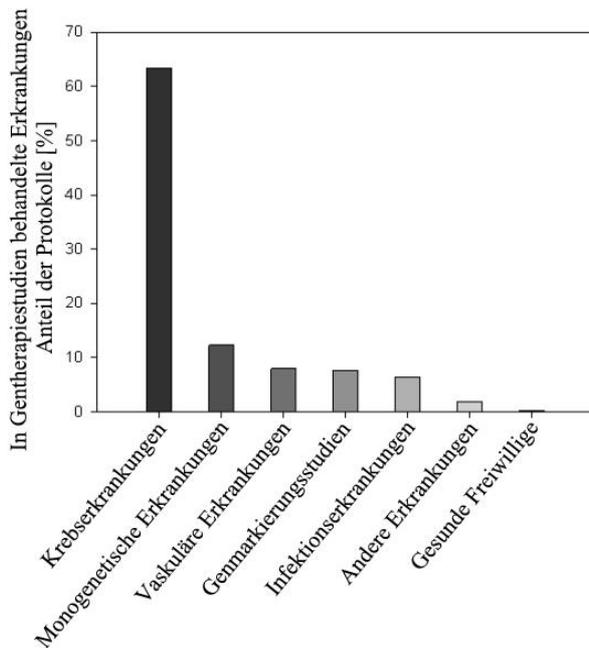
In der PubMed Datenbank ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)) mit dem oben genannten Suchbegriff erzielte Ergebnisse

Der Interessenzuwachs wird bei Betrachtung der Anzahl der Publikationen deutlich, die unter dem Überbegriff „Gentherapie“ zusammengefasst werden können. So hat zu Beginn der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts die Zahl der auf diesem Gebiet publizierten Artikel sehr stark zugenommen. Dies spiegelt vor allem die technischen Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie wider. Insgesamt sind seit 1970 mehr als 21.000 Artikel hierzu veröffentlicht worden (s. Abbildung 1).

Die Bedeutung der molekularen Medizin wird in der Zukunft zweifellos zunehmen, sowohl im Bereich der Diagnose- und Prognosestellung als auch

in der Therapie; man betrachte alleine den Meilenstein der Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms im Jahr 2001 (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001).

Während sich die traditionelle Definition der Gentherapie vorrangig auf die Behandlung von angeborenen (mono)genetischen Erkrankungen bezieht, wird zunehmend deutlich, dass sich die Möglichkeiten der Gentherapie nicht hierauf beschränken, sondern dass auch andere Erkrankungen grundsätzlich mit gentherapeutischen Strategien behandelbar werden. Zu diesen anderen Erkrankungen zählen erworbene Erkrankungen, wie Krebs-, neurologische, kardiovaskuläre und Infektionserkrankungen (Verma und Somia 1997). Zahlreiche genetische Alterationen in Krebszellen sind bekannt (Fearon und Vogelstein 2000; Pierotti et al. 2000), die zumindest theoretisch ermöglichen sollten, mittels Gentherapie einzugreifen. Heute befasst sich sogar der größte Anteil klinischer Gentherapiestudien mit der Behandlung von Krebserkrankungen (s. Abbildung 2). Zur Zeit gibt es über 600 klinische Gentherapiestudien weltweit, mit mehr als 5000 behandelten Patienten.



**Abbildung 2: In Gentherapiestudien behandelte Erkrankungen – Stand 2002**

laut (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/>)

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem Modell des Prostatakarzinoms gezeigt werden, inwieweit sich die Methode der Gentherapie, hier mit dem Gentransfer von Interleukin-2 (IL-2), mit einer anderen innovativen Therapiestrategie, der Verwendung von replizierenden tumorspezifischen onkolytischen Adenoviren verknüpfen ließ. Hierzu wurde als Genvektor ein attenuiert replizierendes onkolytisches Adenovirus verwendet, dessen natürliche Fähigkeit zur Onkolyse zusätzlich ausgenutzt werden sollte. Ein dem in dieser Arbeit verwendeten replizierenden Adenovirus ähnliches Virus (Onyx-015) mit einer Deletion des adenoviralen E1B55K-Gens, zeigte zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit in mehreren Publikationen eine tumorspezifische Onkolyse.

Ein weiterer erwarteter Effekt war die verbesserte Gentransduktionseffizienz durch die Verwendung eines replizierenden Vektors.

Die Einleitung bietet zunächst einen Überblick über das Gebiet der Gentherapie, mit einem Schwerpunkt auf die Verwendung und Biologie adenoviraler Vektoren, insbesondere auch die von Onyx-015. Mit Erläuterungen zur Tumorummunologie und den Eigenschaften von IL-2 wird schließlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten *two-pronged approach*, d.h. der oben erwähnten Kombination von Immun-gentherapie und Onkolyse übergeleitet.

---

## 4 EINLEITUNG

### 4.1 Gentherapie

In der Gentherapie werden unterschiedliche Ansätze angewandt (Jain 1998):

Bei der *ex vivo* Technik erfolgt der Gentransfer zunächst in Zellen außerhalb des Individuums; die Zellen werden anschließend, eventuell auch nach weiterer Proliferation, wieder zugeführt.

Mit der *in vivo* Technik erfolgt der Gentransfer innerhalb des Organismus direkt im Zielgewebe.

Ferner unterscheidet man zwischen somatischer Gentherapie und der Keimbahngentherapie. Bei der somatischen Gentherapie werden in der Regel differenzierte Zellen oder auch primitive oder determinierte Stammzellen verwendet, während bei der Keimbahngentherapie frühembryonale totipotente Zellen verwendet werden, die einen vollständigen Organismus bilden können. Sämtliche Zellen, die aus diesen totipotenten embryonalen Zellen stammten, trügen das transferierte Gen, unter anderem auch die Keimzellen, womit potentiell eine Weitergabe in nachfolgende Generationen möglich wäre. Die Keimbahngentherapie oder genetische Veränderungen der Keimbahn werden nur in Tiermodellen und *in vitro* angewandt (Brinster und Palmiter 1984); der Einsatz solcher Verfahren am Menschen ist bis heute ein Tabu, wird aber in neuerer Zeit diskutiert (Fletcher und Anderson 1992; Wivel und Walters 1993; Wadman 1998; Verma 2001).

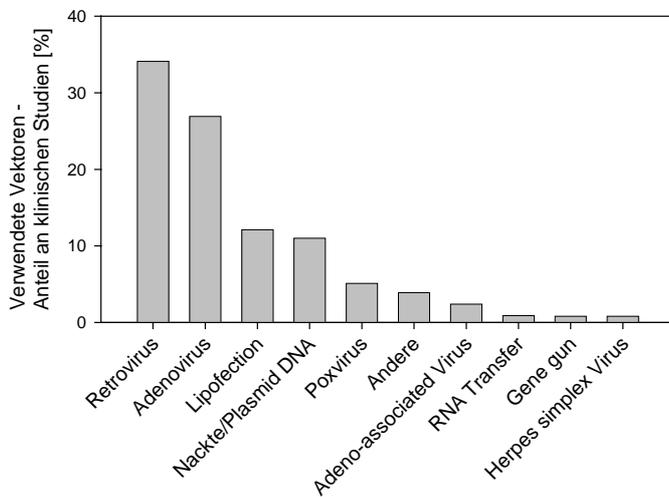
Wichtige Bedingungen für einen erfolgreichen Gentransfer sind zum einen eine erfolgreiche Geninsertion in die Zielzelle, bzw. das Zielgewebe, zum anderen eine dem Zwecke angemessene, ausreichende und nicht übermäßige Expression des Gens. Für verschiedene Anwendungen sind unterschiedliche Muster der Genexpression notwendig; für die Therapie von hereditären Erkrankungen ist zumeist eine permanente Genexpression erwünscht, während für andere Zwecke, wie z.B. bei der onkologischen Gentherapie eine transiente Genexpression ausreichend ist. In anderen Fällen mag auch eine induzierbare Genexpression wünschenswert sein.

### 4.2 Vektoren in der Gentherapie

Vektoren in der Gentherapie sind Träger von therapeutischem genetischen Material und sollen das Zielgen in die Zellen des Zielgewebes transportieren. In der Natur gibt es verschiedene Mechanismen des Gentransfers: durch Konjugation können in Bakterien Plasmide von einer Donor- in eine Akzeptorzelle übertragen werden (Lewin 2000). Mittels Transduktion werden virale DNA oder RNA Segmente in das Genom der Wirtszelle (im Falle von Bakterien von Phagen) übertragen und vervielfältigen sich während der Zellteilung (Griffiths et al. 2000). Transfektion beschreibt einen passiven Vorgang, bei dem DNA aufgrund physikalischer oder chemischer Methoden in Zellen hinein gelangt (Griffiths et al. 2000).

---

Der ideale Vektor ist bisher nur eine Wunschvorstellung und nicht existent. Er sollte die Zielzelle einfach erreichen und penetrieren, der Vorgang sollte sicher, effektiv und selektiv ablaufen und der Vektor sollte sich in großen Mengen produzieren lassen. Für einige Zwecke sollte er die Fähigkeit besitzen, das gewünschte Transgen oder die Transgene in das Wirtsgenom zu integrieren, wenn möglich an gewünschter Position (*site-specific*), oder als stabiles Episom; des weiteren ist die Möglichkeit der Regulation der Genexpression zur Erzielung einer angemessenen Genexpression wünschenswert (Verma und Somia 1997). Hierfür wäre eine Verwendung der zelleigenen *cis*-regulatorischen Elemente optimal; es ist jedoch sehr schwierig oder unmöglich alle diese regulatorischen Elemente für ein bestimmtes Gen zu identifizieren. Für die Regulation der  $\beta$ -Globin Expression sind diese Elemente beispielsweise über na-



**Abbildung 3: Verwendete Vektoren in klinischen Gentherapie-studien**

laut ([www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/)) - Stand 2002

hezu 100 kB verteilt. Diese Größe übersteigt ohnehin die Kapazität der meisten Vektorsysteme (Anderson 1998). Für manche Zwecke ist es auch erstrebenswert, dass durch den eingebrachten Vektor keine Immunantwort des Wirtsorganismus erzeugt wird (Verma und Somia 1997).

Das Spektrum der verwendeten Vektoren in der Gentherapie ist groß. Von den über 600 stattfindenden Studien verwenden mehr als die Hälfte virale Vektoren, insbesondere Retroviren und Adenoviren (s. Abbildung).

Einen Überblick über die hauptsächlich verwendeten Vektoren in der Gentherapie und deren Charakteristika bietet Tabelle 1.

	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV	Nackte oder Lipid-DNA
Maximale Insertionsgröße des Transgens [kb]	7-7,5	7-7,5	~30	3,5-4,0	unbegrenzt
Erreichbare Partikelkonzentration pro ml	$>10^8$	$>10^8$	$>10^{13}$	$>10^{12}$	unbegrenzt
Administrationsart	<i>ex vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>	<i>ex/in vivo</i>
Integration in das Wirtszellgenom	ja	ja	nein	ja/nein	sehr gering
Dauer der Genexpression in vivo	lang	lang	kurz	lang	kurz
Stabilität	gut	nicht untersucht	gut	gut	sehr gut
Einfachheit der Herstellung großer Mengen	schwierig	schwierig	einfach	schwierig	einfach
Immunologische Probleme	wenig	wenig	in hohem Maße	nicht bekannt	keine
Existierende Immunität des Zielorganismus	unwahrscheinlich	unwahrscheinlich (möglicherweise vorhanden in HIV+ Personen)	ja	ja	nein
Sicherheitsprobleme	Insertionsmutagenese	Insertionsmutagenese	Entzündungsreaktion, Toxizität	Entzündungsreaktion, Toxizität	keine

**Tabelle 1: Übersicht über Genvektoren**

Charakterika der in klinischen Studien verwendeten Genvektoren

Da für die vorliegende Arbeit ein Vektor gesucht war, der eine transiente Genexpression aufwies, der leicht handzuhaben war, einen *in vitro* und *in vivo* Gebrauch und eine Infektion nicht proliferierender Zellen erlauben sollte, während eine langfristige Genexpression nicht erwünscht war, wurden ausschließlich adenovirale Vektoren verwendet.

## 4.3 Adenoviren

### 4.3.1 Überblick über Adenoviren

Adenoviren wurden 1953 erstmals kultiviert und als distinkte Viren beschrieben (Rowe et al. 1953). Innerhalb kurzer Zeit wurden zahlreiche Serotypen und die Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen ermittelt. Die Viren wurden zunächst als *adenoid degeneration* (AD), *adenoid-pharyngeal conjunctival* (APC) und *acute respiratory disease* (ARD) Agens bezeichnet. Humanpathogene Adenoviren sind mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert, unter anderem mit akuter Pharyngitis, pharyngokonjunktiva-

lem Fieber, akuter Rhinosinusitis, Pneumonie, epidemischer Keratokonjunktivitis, pertussisähnlichem Syndrom, akuter hämorrhagischer Cystitis, Gastroenteritis und Hepatitis (Horwitz 1996).

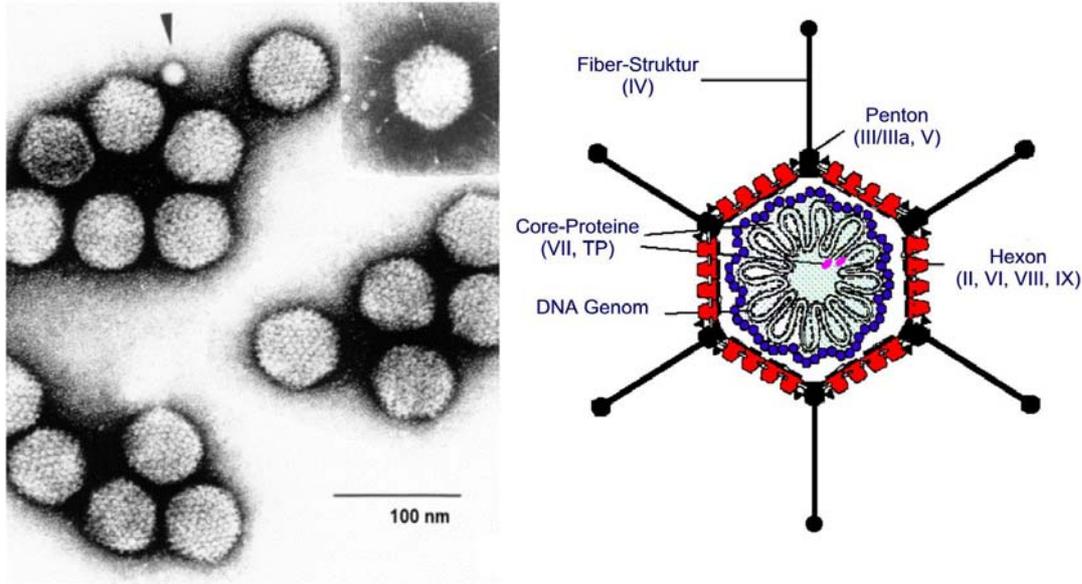
Die Adenoviren begründen die Familie der *Adenoviridae*, die wiederum in zwei Stämme, *Mastadenovirus* und *Aviadenovirus* unterteilt wird, wobei *Aviadenoviren* ausschließlich Vogelspezies infizieren. Die Verbreitung der Adenoviren ist weltweit und es existieren spezifische Adenoviren für zahlreiche Arten, z.B. humane, primaten, bovine, equine etc.. In der Regel sind diese Adenoviren speziesspezifisch; jedoch konnten Antikörper gegen humane Adenoviren in Primaten nachgewiesen werden und auch in Katzen werden Antikörper gegen humanes Adenovirus Typ 5 gefunden (Müller-Heidelberg 2003). Bis heute sind 47 verschiedene humane Adenovirus Serotypen beschrieben. Die Serotypen werden in sechs Untergruppen unterteilt, basierend auf der Fähigkeit Erythrozyten unterschiedlicher Spezies zu agglutinieren (Horwitz 1996). Serologische Studien zeigen, dass der Grad der Durchseuchung mit Adenoviren in der Bevölkerung hoch ist. Antikörper gegen die Gruppe C Adenovirus Typen 1, 2 und 5 sind am häufigsten vorhanden, bei 40-60% aller Kinder (Huebner et al. 1954; Horwitz 1996). In Populationen, die auf engem Raum zusammenleben, z.B. bei Militärrekruten, liegt der Durchseuchungsgrad noch deutlich darüber (Hilleman 1957).

### **4.3.2 Biologie der Adenoviren**

#### **4.3.2.1 Aufbau**

Adenoviren sind ikosahedrale Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 80 nm (Horwitz 1996). Die Partikel enthalten DNA (13% der Masse), Protein (87% der Masse) und haben keine Hüllmembran. Die Dichte der kompletten Viruspartikel beträgt 1,34 g/ml. Das Virion besteht aus dem Capsid, welches den DNA-enthaltenden Kernbereich umschließt. Das Capsid besteht aus 252 Capsomeren, von denen 240 Hexone und 12 Pentone sind; diese Bezeichnungen beziehen sich auf den Aufbau des Capsids, Hexone sind von sechs und Pentone von fünf benachbarten Strukturen umgeben. Jedes Penton enthält eine Basis, die einen Teil der Oberfläche des Capsids bildet; von hier nehmen die *Fiber*-Proteine ihren Ursprung. Insgesamt sind sieben verschiedene virale Proteine am Aufbau der Pentone und Hexone und somit am Aufbau des Capsids beteiligt. Das trimere *Fiber*-Protein zusammen mit der Penton-Basis wird als Penton-Capsomer bezeichnet. Die *Fiber*-Struktur formt die initiale Bindung an die Zielzelle über den zellulären Rezeptor, der für alle humanen Adenoviren, mit Ausnahme der Gruppe B Adenoviren, der Coxsackievirus-adenovirus-Rezeptor (CAR) ist (Bergelson et al. 1997; Bergelson et al. 1998; Bergelson 1999). Der Kern des Virions enthält vier virale Proteine und das virale Genom (s. Abbildung 4).

---

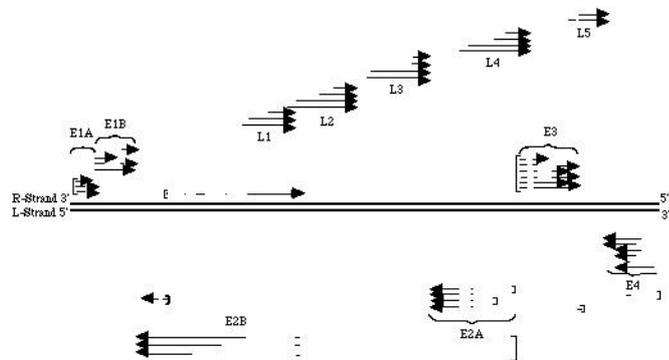


**Abbildung 4: Struktur des Adenovirus Virion**

Elektronenmikroskopische Aufnahme und Struktur von Adenoviruspartikeln (ICTVdb – The Universal Virus Database, Version 3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>)

#### 4.3.2.2 Genomstruktur und –organisation

Die allgemeine Organisation sämtlicher Adenoviren ist ähnlich. Es handelt sich um eine lineare doppelsträngige DNA mit einer Länge von etwa 36 kbp. An beiden Enden befinden sich kurze *inverted terminal repeats* (ITR); ebenfalls befindet sich im Genom ein *cis*-agierendes Verpackungssignal.



**Abbildung 5: Struktur des adenoviralen Genoms**

Organisation der viralen Transkriptionseinheiten: Die frühen mRNAs werden mit E (*early*) bezeichnet, späte mRNAs mit L (*late*) (ICTVdb – The Universal Virus Database, Version 3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). Weitere Erläuterungen im Text.

Das Verpackungssignal sorgt für die Interaktion der viralen DNA mit den verpackenden Proteinen. Der Ablauf der Replikation erfolgt streng chronologisch geordnet.

Das Genom enthält fünf frühe Transkriptionseinheiten, die *early units* E1A, E1B, E2, E3 und E4, zwei *delayed early units* IX und IVa2 und eine späte Transkriptionseinheit, *major late* (s. Abbildung 5).

### 4.3.2.3 Replikationszyklus

Die Bindung des Viruspartikels wird zunächst vermittelt über die Interaktion des *fiber*-Proteins mit dem zellulären Rezeptor, CAR. CAR ist ein Bestandteil des *Tight-Junction*-Komplexes (*Zonula occludens*) und auf zahlreichen Zelltypen vorhanden (Bergelson et al. 1997; Bergelson 1999; Cohen et al. 2001). Neben der primären Adhäsion des Virus vermittelt die Interaktion von *fiber*-Protein und CAR auch die Unterbrechung des *tight-junction*-Komplexes; hierdurch wird die strenge Kompartimentalisierung von basolateralem und luminalem Raum aufgehoben und *in vivo* die weitere Distribution des Virus entlang der luminalen Oberfläche von Epithelien ermöglicht (Walters et al. 2002). Adenovirus Typ 37 benutzt Sialinsäure als primären zellulären Rezeptor (Arnberg et al. 2000). Hong et al. beschreiben die Bindung von Adenovirus Typ 5 *fiber*-Proteinen an MHC Klasse I Moleküle (Hong et al. 1997). Für die Internalisierung ist eine zweite Protein-Protein-Interaktion notwendig; hierzu bindet das Penton-Basis-Protein an die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  oder  $\alpha_v\beta_5$  (Wickham et al. 1993), kürzlich ist auch das Integrin  $\alpha_v\beta_1$  mit dieser Funktion assoziiert worden (Davison et al. 1997); diese Interaktionen finden über das konservierte RGD-Motiv (Arginyl-Glycyl-Asparagyl) statt. Nach der Adsorption mit den geschilderten Mechanismen kommt es zur rezeptorvermittelten Endozytose (über *clathrin-coated pits*), getriggert durch die Penton-Basis-Integrin-Interaktion. Dieser Vorgang ist sehr effizient; innerhalb von 10 min nach Adsorption befinden sich mehr als die Hälfte der adsorbierten Partikel in Endosomen. Durch die Ansäuerung innerhalb der frühen Endosomen kommt es zur Freisetzung der Viruspartikel in das Zytosol. Über mikrotubuläre Transportmechanismen werden die Virione zum Nucleus befördert. Während des Internalisierungsprozesses wird schrittweise das Capsid abgebaut (Greber et al. 1993). Hierbei spielen Dissoziations- und proteolytische Vorgänge eine Rolle. Wiederum läuft dieser Transportvorgang sehr schnell ab; innerhalb von 40 min nach Penetration des Virus, können Viruspartikel bereits an den Poren der Kernmembran beobachtet werden. Die virale DNA gelangt schließlich in den Nucleus und assoziiert dort mit der Kernmatrix.

Nachdem die virale DNA in den Zellkern gelangt ist, kommt es zunächst zur Expression der *immediate early units* E1A und E1B, die Expression wird verstärkt durch sich am linken Ende des adenoviralen Genoms befindliche Enhancer (Hearing und Shenk 1983; Hearing und Shenk 1986). Die Genprodukte der E1A und E1B Region sorgen für den Übertritt in die S-Phase, um eine optimale Umgebung für die Virusreplikation, mit Versorgung von Substraten für die DNA-Biosynthese, zu schaffen. Der zweite Schritt ist die Etablierung eines Systems, die antivirale Immunantwort des Wirtsorganismus zu unterlaufen; hier spielen die E3- und VA RNA-Gene eine entscheidende Rolle. Der dritte Schritt ist die Synthese sämtlicher viraler Genprodukte, die für die DNA-Replikation notwendig sind.

Der Ablauf der initialen Ereignisse und die Rolle der E1A- und E1B-Proteine wird später detailliert beschrieben (s. 4.3.7). Eine wichtige Bedeutung der E1B-Genprodukte ist die Suppression der Wirtszellapoptose. Die Verhinderung einer frühen Wirtszellapoptose ist für die Replikation des Virus ein eminent

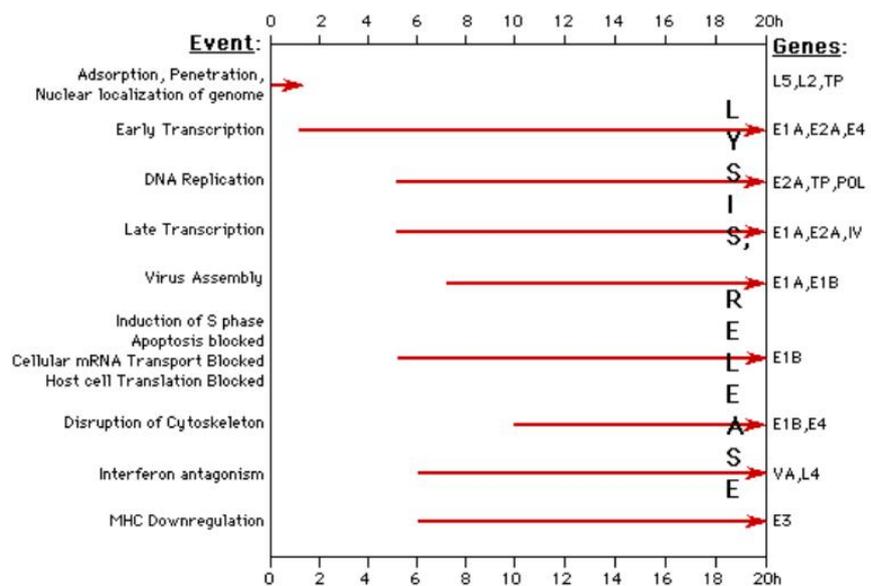
---

wichtiger Vorgang; man findet diese Inhibition durch entsprechende Genprodukte auch bei anderen Viren, z.B. SV40, CMV, Cowpoxvirus, Vacciniavirus, HBV, EBV und dem humanen Papillomavirus (Teodoro und Branton 1997).

Die Expression der *early unit* E2 hängt ab von der Transaktivierung durch die E1A-Proteine. Die zwei Untereinheiten E2A und E2B werden in zwei große RNA-Vorläufermoleküle transkribiert; durch alternatives Spleißen in verschiedene mRNAs und Translation durch die zellulären Proteinsynthesemechanismen entstehen schließlich Produkte, die für die Replikation der viralen DNA notwendig sind. So kodiert z.B. die E2B-Region für die virale DNA-Polymerase und das terminale Protein (TP), welches im Virion schließlich an die 5'-Enden des viralen Genoms bindet.

Die *early unit* E3-Genprodukte werden ebenfalls von mRNA-Molekülen translatiert, die aus Vorläufermolekülen durch alternatives Spleißen synthetisiert wurden. Diese Produkte sind für den viralen Replikationszyklus nicht unmittelbar nötig, sind aber insbesondere wichtig für die Modulation der Immunantwort durch den Wirtsorganismus. So wird eine Verminderung der MHC-Klasse-I Moleküle durch ein 19-kD-Protein erzielt, die Empfindlichkeit gegenüber TNF- $\alpha$  durch ein 14,7 kD-Protein gesenkt, und durch ein autokrin sezerniertes 10,4 kD-Protein eine Aktivierung des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors vermittelt, der ein weiteres Proliferationssignal für die Zelle abgibt.

So wird eine Verminderung der MHC-Klasse-I Moleküle durch ein 19-kD-Protein erzielt, die Empfindlichkeit gegenüber TNF- $\alpha$  durch ein 14,7 kD-Protein gesenkt, und durch ein autokrin sezerniertes 10,4 kD-Protein eine Aktivierung des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors vermittelt, der ein weiteres Proliferationssignal für die Zelle abgibt.



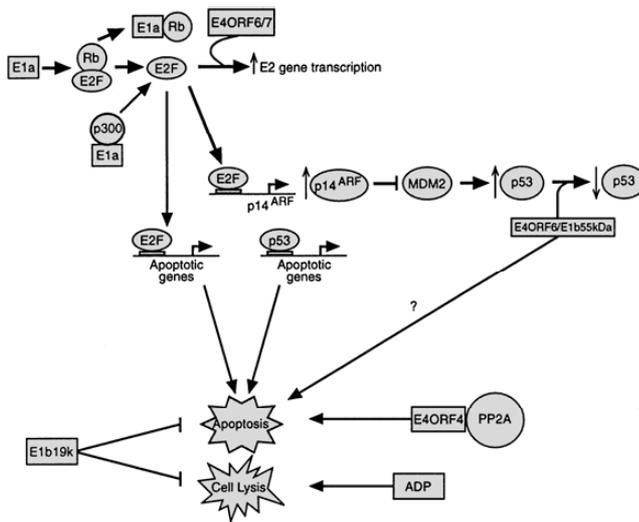
**Abbildung 6: Ereignisse und Zeitverlauf der adenoviralen Replikation**

modifiziert nach Shenk (Shenk 1996)

*Early unit* E4-Genprodukte sind in Kombination mit E1B-Genprodukten verantwortlich für den Transport viraler mRNA vom Nucleus in das Zytoplasma und gleichzeitig für die Hemmung des Transports zellulärer mRNA. Ein 14 kD-Protein fungiert als Proteinkinase und reguliert virale und zelluläre Proteine (z.B. c-Fos und AP-1), ein 17 kD-Protein bindet an und stimuliert die Aktivität von E2F-Transkriptionsfaktoren.

*Late unit* L-Genprodukte sind fast ausschließlich Strukturproteine, die für den Aufbau der Capsid- und *Fiber*-Struktur verantwortlich sind.

Nachdem die virale DNA-Replikation und Strukturproteinsynthese abgelaufen sind, kommt es zum



**Abbildung 7: Mechanismen des adenovirusvermittelten Zelltods**

Vereinfachte Darstellung der Mechanismen des adenovirusvermittelten Zelltods. Die wesentlichen Mechanismen sind eine p53-vermittelte Apoptose, bei der aber auch andere virale Genprodukte eine Rolle spielen, und nichtapoptotische Mechanismen, hierbei spielt insbesondere das in der E3 Region kodierte ADP (*adenovirus death protein*) eine wichtige Rolle. Nach Braithwaite et al. (Braithwaite und Russell 2001)

Aufbau der Virione im Nucleus, schließlich zum Zelltod und zur Virusfreisetzung (*viral burst*).

Für die letztgenannten Vorgänge spielen virale Proteine eine wichtige Rolle: das E3 11,6 *adenovirus death protein* (ADP) und das E4orf4-Genprodukt werden spät im Verlauf des Infektionszyklus exprimiert und wirken direkt zytotoxisch. Eine Deletion beider Gene sorgt für einen erheblich verzögerten Zelltod infizierter Zellen (Tollefson, Ryerse et al. 1996).

Braithwaite et al. haben hierzu ein Modell vorgeschlagen (s. Abbildung 7)

(Braithwaite und Russell 2001). Demnach besitzen Adenoviren die Fähigkeit sowohl einen apoptotischen Zelltod als auch einen nichtapoptotischen Zelltod auszulösen.

Der lytische Infektionszyklus der Adenoviren ist sehr effektiv; jede infizierte Zelle produziert etwa 100.000 Viruspartikel; zusätzlich werden große Mengen überschüssiger viraler DNA und Proteine synthetisiert, die nicht in Virione verpackt werden. Ein Infektionszyklus benötigt 32 bis 36 Stunden, wobei die frühe Phase mit der Expression der *early*-(E)-Gene bereits nach sechs bis neun Stunden komplettiert ist (Zhang 1999). Der Zeitpunkt des Zelltodes mit Freisetzung der produzierten Viruspartikel bestimmt die Effektivität und Produktivität des viralen Replikationszyklus. Einen Überblick über die Ereignisse und den Zeitablauf der Virusreplikation bietet Abbildung 6.

Der zytopathische Effekt (*cytopathic effect, CPE*) des Virus in der Zellkultur besteht in einer Abrundung, Schwellung und Haufenbildung der Zellen. Des Weiteren treten typische Veränderungen des Zellkerns auf, hierzu zählen intranukleäre Einschlusskörper; diese entsprechen der zunehmenden Akkumulation von Virionen im Zellkern (Horwitz 1996).

### 4.3.3 Adenoviren als Genvektoren

Die Größe der verwendbaren Transgene für einen adenoviralen Vektor sind begrenzt. Es können maximal 105% der Wildtyp-DNA-Menge verpackt werden, um funktionelle Viruspartikel zu erzeugen; dies entspricht bei einer DNA-Größe im Wildtyp-Adenovirus von 36 kbp einer zusätzlich inserierbaren Grö-

---

ße von etwa 1,8 kbp (Bett et al. 1993). Daher müssen zur Verwendung größerer Transgene Bereiche des Virusgenoms deletiert werden. Am häufigsten werden Deletionen in den E1- und E3-Regionen durchgeführt, da diese für die Infektion und eine Replikation in Produktionszelllinien nicht unbedingt notwendig sind. Hierdurch werden etwa 6,5 kbp zusätzlicher Raum für Transgene geschaffen, so dass insgesamt 8,5 kbp für Transgene zur Verfügung stehen. Diese Vektoren werden als Vektoren der ersten Generation bezeichnet (Graham und Prevec 1991). Vektoren der zweiten Generation besitzen zusätzliche Deletionen von der E2A, E2B und dem größten Teil der E4 Region (Amalfitano et al. 1998). Vektoren der dritten Generation, sogenannte *gutless*-Vektoren besitzen nur geringe Anteile des adenoviralen Genoms und benötigen für Replikation und Produktion von Virusstammlösungen Helferviren, die die benötigten Gene in *trans* komplementieren (Mitani et al. 1995; Parks et al. 1996; Schiedner et al. 1998; Morsy und Caskey 1999). Das Helfervirus enthält alle viralen Gene, die für die Replikation notwendig sind und komplementiert diese in *trans*, hat aber einen Gendefekt in der Verpackungsdomäne; hierdurch wird die DNA des Helfervirus nicht oder nur sehr ineffizient in Virione verpackt. Das Vektorvirus hingegen enthält nur die Enden des viralen Genoms, die therapeutische Gensequenz und das normale Verpackungssignal; hierdurch wird selektiv diese DNA in Virione verpackt und aus den Zellen freigesetzt. Neben der verminderten Toxizität besteht der Vorteil, dass auch wesentlich größere Mengen fremder DNA, bis zu 32 kbp, inseriert werden können (Amalfitano et al. 1998; Morral et al. 1998; Kochanek 1999; Balague et al. 2000). Jedoch ist die Virusproduktion durch die Verwendung von Helferviren mühsam.

Der Vorteil der Verwendung adenoviraler Genvektoren ist, dass ein weites Spektrum an Zellen unterschiedlicher Gewebe infiziert werden kann, sowohl teilende als auch nicht-teilende Zellen, dass die Transduktionseffizienz in der Regel sehr hoch ist, dass Adenoviren in hohen Titern bereitete werden können, und dass zahlreiche Zellen *in vivo* infiziert werden können. Ferner sind die Vektoren relativ einfach zu manipulieren (Anderson 1998).

Nachteile sind, dass die Expression des Transgens transient ist, da das virale Genom in der Wirtszelle episomal vorliegt und sich nicht in das Wirtszellgenom integriert, dass *in vivo* applizierte adenovirale Vektoren eine Entzündungsreaktion hervorrufen können, und dass ein großer Teil der Bevölkerung neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren aufweist, die einen effektiven Gentransfer verhindern können (Horwitz 1996; Wilson 1996).

Die transiente Genexpression im Falle des adenoviralen Gentransfers ist für einige Anwendungen erwünscht, z.B. bei der onkologischen Gentherapie, während für andere Anwendungen, z.B. bei der Therapie hereditärer Erkrankungen eine stabile langfristige Genexpression wünschenswert wäre.

Zwei sich scheinbar widersprechende Faktoren stellen ebenfalls ein wichtiges Hindernis in der adenoviralen Gentherapie dar: zum einen die mangelhafte Infizierbarkeit primärer Tumorzellen durch das Fehlen des adenoviralen Adhäsionsrezeptors CAR oder der Internalisierungsrezeptoren, zum anderen der

---

promiskuitive Tropismus des Virus der einen Gentransfer in normale Zellen erlaubt (Miller und Vile 1995).

Die Immunogenität von adenoviralen Vektoren kann durch Manipulation der viralen Proteine beeinflusst werden. Um die Spezifität von Adenoviren für bestimmte Gewebe und Zelltypen zu verbessern, sind verschiedene Ansätze denkbar; so kann beispielsweise durch Manipulation der Capsid- und *fiber*-Proteine eine Bindung und letztlich Infektion spezifischer Zellen erreicht werden, oder, umgekehrt, durch eine Entfernung der CAR-bindenden Abschnitte des Fiber-Knobs, eine Diversifizierung des Zielzellspektrums. Wickham et al. verwendeten verschiedene Strategien, ein besseres *Targeting* zu erreichen; u.a. die Konstruktion eines adenoviralen Vektors mit einer heparinbindenden Domäne zur Transduktion von Zellen mit heparanenthaltenden Oberflächenrezeptoren, bispezifische Antikörper und adenovirale Vektoren mit bichimären *Fiber*-Proteinen (Wickham, Roelvink et al. 1996; Wickham, Segal et al. 1996; Wickham et al. 1997). Douglas et al. verwendeten das Fab-Fragment eines gegen adenoviralen Fiber-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper und koppelten diesen mit Folat; hierdurch wird zum einen eine Ablation des normalen Zielzellspektrums, zum anderen ein *Retargeting* auf Folat-Rezeptor-exprimierende Zellen erzielt (Douglas et al. 1996).

Durch die Insertion von gewebe- oder tumorspezifischen Promotoren, sogenanntes transkriptionelles *Targeting*, kann die Genexpression gewebe- oder tumorspezifisch reguliert werden. Um unter zahlreichen Ansätze nur einige zu erwähnen, sei die Verwendung der CEA-, PSA-, MBP-Promotoren genannt (Richards et al. 1995; Spitzweg et al. 1999).

#### **4.3.4 Verwendete Transgene**

Zahlreiche verschiedene Transgene wurden im Rahmen einer adenoviralen onkologischen Gentherapie evaluiert. Eine Gruppe umfaßt die Verwendung von Zytokinen, z.B. IL-2 (Addison et al. 1995b; Toloza et al. 1996), IL-6 (Tanaka et al. 1997), IL-12 (Putzer et al. 1997), IFN- $\gamma$  (Zhang et al. 1996) und TNF- $\alpha$  (Marr et al. 1998). Des weiteren wurde mit Tumorsuppressorgenen gearbeitet, wie z.B. p53 (Putzer et al. 1998) und Cyclinkinase-Inhibitoren (Jin et al. 1995; Schrupp et al. 1996). Eine interessante Strategie ist die Verwendung der Suizid-Gentherapie. Durch die Transduktion mit Genen, die für ein Enzym kodieren, welches eine nicht-toxische Substanz (*prodrug*) in eine zytotoxische Substanz umwandelt. Das bisher am häufigsten verwendete Gen ist die herpesvirale Thymidinkinase (HSV-TK). Als *Prodrug* wird in diesem Falle Ganciclovir (GCV) benutzt; HSV-TK metabolisiert GCV zu Monophosphat-GCV, welches anschließend von zellulären Enzymen zu Triphosphat-GCV konvertiert wird. Triphosphat-GCV kann in DNA und RNA inkorporiert werden, führt aber zu einem Abbruch der Nukleotidstrangsynthese und letztendlich zum Zelltod. Nicht nur die transduzierten Zellen sind betref-

---

---

fen, sondern, da das Substrat, Monophosphat-GCV, interzellulär transportiert werden kann, auch benachbarte Zellen (*bystander* Effekt) (Freeman et al. 1993).

#### **4.3.5 Strategien zur Optimierung tumor-selektiver Adenoviren**

Zwei wesentliche Strategien werden verwendet, um eine tumorselektive Adenovirusreplikation zu erreichen (Alemany et al. 2000; Heise und Kirn 2000).

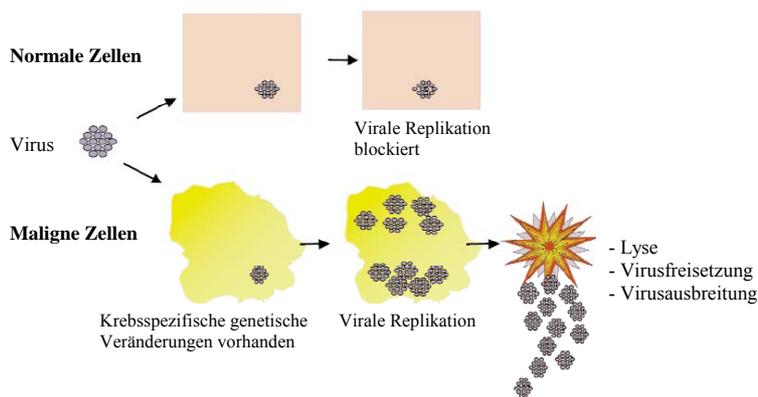
Erstens, durch die Insertion von tumor- oder gewebespezifischen Promotoren vor das adenovirale E1A-Gen wird versucht, die Virusreplikation auf Tumorgewebe einzuschränken. Die Expression der E1A-Gene stimuliert den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und transaktiviert zahlreiche andere virale Gene und ist somit wichtiger Schritt für die Virusinfektion. Hierfür geeignet sind z.B. der *prostate specific antigen* (PSA) Promotor/Enhancer. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation nach Insertion des PSA-Promotor/Enhancers *upstream* des E1A-Gens mit dem PSA-Expressionslevel der betroffenen Zelle korreliert (Rodriguez et al. 1997). Eine äquivalente Strategie wurde angewendet mit der Insertion von Promotoren/Enhancern für tumorspezifische Antigene; z.B. für  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), *carcinoembryonic antigen* (CEA) oder MUC-1 (Richards et al. 1995; Hallenbeck et al. 1999; Kurihara et al. 2000; Li, Yu et al. 2001).

Wesentliches Problem bei der Anwendung dieser Strategie ist, dass zum einen die verwendeten Promotoren/Enhancer nicht ausreichend tumorspezifisch sind und auch gesundes Gewebe die Antigene exprimiert, eine ausreichende Gewebeselektivität ist selten gegeben. Zum anderen sind die Promotoren/Enhancer unabhängig von der Expression des entsprechenden Antigens oft nicht selektiv genug; aufgrund von sogenannter *leakiness* findet eine Hintergrundgenexpression statt, die neben der Virusreplikation, im Falle der zusätzlichen Expression zytotoxischer Transgene auch andere unerwünschte Nebenwirkungen für normales, Nicht-Tumor-Gewebe zur Folge hat.

Eine Verfeinerung dieser Strategie ist die Benutzung einer doppelt regulierten E1A- und E1B-Genexpression durch die Insertion zweier unterschiedlicher prostataspezifischer Promotoren/Enhancer, nämlich des PSA- und des Kallikrein-Promotors/Enhancers, sowohl *upstream* der E1A- als auch der E1B-Region; entsprechende Versuche ergeben eine höhere Selektivität als die Einzelinsertion (Yu et al. 1999).

Zweitens, durch die Deletion von Genen, die notwendig sind für die Replikation in normalen Zellen, aber nicht in Tumorzellen, kann eine Tumorspezifität erreicht werden (s. Abbildung 8).

---



**Abbildung 8: Prinzip tumorselektiver replizierender Viren**

Durch verschiedene genetische Veränderungen erlangen Viren die Möglichkeit, sich spezifisch in malignen Zellen zu replizieren und lytisch aktiv zu werden. Nach Heise und Kim (Heise und Kim 2000).

defektem Rb jedoch kann ein Fortschritt des Zellzyklus und eine Virusreplikation stattfinden (Fueyo et al. 2000a).

Eine weitere verwendete Mutante ist Add1316 mit einer kompletten Deletion der E1A-Region; die Replikation hängt ab von einer intrinsischen oder IL-6-induzierten E1A-Aktivität. Die Replikation dieses Virus wird ebenfalls als relativ tumorselektiv beschrieben (Rancourt et al. 1999).

Die Spezifität eines beliebigen Adenovirus AdX für einen Tumor kann ausgedrückt werden mittels des folgenden Quotienten, unter Verwendung der freigesetzten Virusmengen (*burst size*) nach Infektion:

$$\frac{\text{Freisetzung von AdX aus der Tumorzelle}}{\text{Freisetzung von AdX aus der Normalzelle}} \times \frac{\text{Freisetzung von AdWt aus der Normalzelle}}{\text{Freisetzung von AdWt aus der Tumorzelle}}$$

Hierdurch wird für die Unterschiede in Infektivität und Virusproduktion zwischen verschiedenen Zelllinien korrigiert und der Quotient ist ein besseres Maß als die alleinige Angabe des Quotienten für das zu testende Adenovirus. Auch die Auswahl der „normalen“ Zelle spielt eine wichtige Rolle, da hier sehr große Unterschiede in der Infektivität bestehen, so z.B. zwischen primären humanen embryonalen Nierenzellen als sehr sensitive Zellen auf der einen Seite und den insensitiven Fibroblasten- und Endothelzelllinien auf der anderen Seite. Leider sind primäre Zellen epithelialen Ursprungs wenig verfügbar, prinzipiell sind dies aber sehr wichtige Fragen bei der Therapie eines speziellen Tumors (Alemany et al. 2000).

Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Anwendung von Onyx-015 (Add11520) (s. hierzu ausführlich 4.3.7).

Eine andere verwendete Mutante ist z.B. AdΔ24, mit einer Deletion der *Retinoblastoma* (Rb)-Bindungsstelle eines E1A-Genproduktes; hierdurch kann das Virus keinen Übertritt von der *gap* (G)1- in die Synthese (S)-Phase des Zellzyklus induzieren, da der G1/S-Kontrollpunkt nicht überwunden werden kann. In Zellen mit

---

### ***4.3.6 Replizierende Adenoviren in der onkologischen Therapie***

Bereits kurz nach der Entdeckung der Adenoviren im Jahr 1953 (Rowe et al. 1953), wurden Wildtyp-Adenoviren in klinischen Studien zur Krebstherapie verwendet, da sie ein rasches Wachstum und lytische Aktivität in humanen Epithelzelllinien aufwiesen. Die erste Studie im Jahr 1956 verwendete ein Wildtyp-Adenovirus zur Therapie des fortgeschrittenen Zervixkarzinoms (Smith et al. 1956). Wie auch bei vorherigen Studien mit der Verwendung anderer Viren, kam es auch hier zunächst zu einem deutlichen initialen onkolytischen Effekt und Tumorregression, letztendlich aber zur Tumorprogression. Bereits zu jenem Zeitpunkt konnte gezeigt werden, dass die onkolytische Aktivität invers variierte mit dem Vorhandensein einer antiviralen Immunantwort, bzw. dem Vorhandensein von neutralisierenden anti-Adenovirus-Antikörpern. Die Phänomene der Tumorprogression trotz initialer Regression und der Virusneutralisation führte damals zu einem Verlassen dieser Therapiestrategie (Alemany et al. 2000).

Entwicklungen der letzten Jahre haben aber das Interesse an der Verwendung onkolytischer Viren wieder aufleben lassen. Hierzu zählt insbesondere die verbesserte Erkenntnis über die Interaktion von viralen Proteinen mit Zellzyklus-Regulationsproteinen, zellulären Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen.

Eine Vielzahl verschiedener Adenoviren wurden evaluiert in Bezug auf ihre onkotropen Replikations- und lytischen Eigenschaften (Bischoff et al. 1996; Rancourt et al. 1999).

Ein weiterer Vorteil von replizierenden Adenoviren in der onkologischen Gentherapie kann sein, dass durch die Replikation und weitere Ausbreitung innerhalb des Tumorgewebes mehr Zellen infiziert werden, als dies mit einem nicht replizierenden Adenovirus der Fall ist (Heise, Williams, Olesch et al. 1999). Im Falle der nichtreplizierenden Adenoviren findet man die infizierten Zellen immer nur im Bereich des Stichkanals, da intratumorale Faktoren, wie Druckgradienten, extrazelluläre Matrix und andere Faktoren einer Verteilung im Tumorgewebe entgegenwirken (Jain 1994); die fehlende Distribution spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Limitierung der Effektivität von nichtreplizierenden Adenoviren.

Somit sollte das optimale replizierende Virus die folgenden Eigenschaften besitzen: selektive Infektion maligner transformierter Zellen, virale Replikation, virale Zytotoxizität und Induktion von virus- und/oder tumorspezifischer Immunität, ohne dass aber eine überwältigende Immunantwort die Virusreplikation beeinträchtigt (Wodarz 2001b).

---

#### 4.3.6.1 Andere onkolytische Vektoren

Nebst Adenoviren sind verschiedene andere Virusfamilien evaluiert worden im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als onkolytische Agentien (Chiocca 2002). Hierzu zählen das *Newcastle disease* Virus, Poliovirus und Herpes simplex Virus Typ 1 (Ahlert und Schirmacher 1990; Herold et al. 1994; Gromeier et al. 2000).

#### 4.3.7 *Onyx-015 (dl1520)*

Add1520 wurde bereits 1987 konstruiert (Barker und Berk 1987), gelangte aber erst Jahre später in den Mittelpunkt des Interesses und wurde dann als ONYX-015 (nach Onyx Pharmaceuticals, Richmond, CA, USA) bezeichnet. Add1520 ist ein Gruppe C Adenovirus-Derivat mit einer 827 bp Deletion in der E1B-Region des Adenovirusgenoms und einer Punktmutation im Codon 2022. Hierdurch wird eine Expression des trunkierten Proteins vom deletierten Gen verhindert und das E1B55K-Protein nicht exprimiert. Hingegen ist die Expression des E1B19K-Gens, welches einen überlappendes offenes Leseraster (*orf*) mit dem E1B55K aufweist, nicht betroffen (Bischoff et al. 1996). Add1520 ist äquivalent zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Virus AdSW8, welches aber zusätzlich noch eine Deletion in der E3 Region besitzt; das in der Arbeit verwendete Virus AdMA55 beinhaltet zusätzlich noch die IL-2-Expressionskassette in der E3-Region. Daher erfolgt in Folge eine ausführliche Darstellung der Erkenntnisse über Add1520 und die Interaktion mit Tumorzellen.

E1B55K spielt eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des Virus; E1B55K bindet zusammen mit dem adenoviralen Genprodukt von E4orf6 (E4-34K) an das Tumorsuppressor-Protein p53 und inhibiert so die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung (Yew und Berk 1992; Debbas und White 1993). Dieser Schritt ist notwendig für die virale Replikation, da es ansonsten zu einem p53-vermittelten Zellzyklusarrest käme. Das p53-Protein ist das wichtigste bekannte Tumorsuppressorprotein; es ist in mehr als 50% aller humanen malignen Tumoren mutiert (Hollstein et al. 1991). Diese Mutationen sind entweder inaktivierende Mutationen, die beide Allele des Gens betreffen, oder aber dominant negative Mutationen, die nur ein Allel betreffen. Dieses Phänomen beruht auf dem Vorliegen des nukleären p53-Proteins als Tetramer, da Tetramere, die sowohl mutiertes als auch Wildtyp-p53 enthalten, nicht funktionsfähig sind (Khleif und Curt 2000).

Ursache für den p53-vermittelten Zellzyklusarrest im Falle der adenoviralen Infektion ist, dass die E1A Proteine, die sehr früh nach der Infektion exprimiert werden, an das Rb-Tumorsuppressorprotein binden, was zu einer Freisetzung des zellulären Transkriptionsfaktor E2F führt. E2F transaktiviert zum einen Gene, die für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus verantwortlich sind; zum anderen transaktiviert E2F auch das p14<sup>ARF</sup>-Gen. Das p14<sup>ARF</sup>-Protein bindet an das zelluläre MDM2-Protein und se-

---

---

questriert dieses im Nucleolus. Während des normalen Zellzyklus reguliert MDM2 den p53-Spiegel über eine negative Feedback-Schleife; durch die Bindung von p14<sup>ARF</sup> an MDM2 kommt es zu einem Anstieg der p53-Spiegel. Dieser Anstieg kann einen transienten oder permanenten Zellzyklusarrest und/oder die Apoptose der Zelle zu Folge haben (Linke 1998; Dix et al. 2001). Die zelluläre Apoptose und/oder Zellzyklusarrest würden zu einem Stop der Virusreplikation und Zytolyse führen. Um diesem entgegen zu wirken, besitzen Adenoviren drei wichtige Proteine: E1B55K und E4orf6 binden als Komplex an p53 und führen zu dessen Degradation; E1B19K ist ein Mitglied der bcl-2 Familie antiapoptotischer Proteine.

Hingegen sollte nach der Infektion von Tumorzellen mit defektem p53 kein Zellzyklusarrest stattfinden und damit eine produktive Virusinfektion und –replikation ermöglicht sein (s. Abbildung 9).

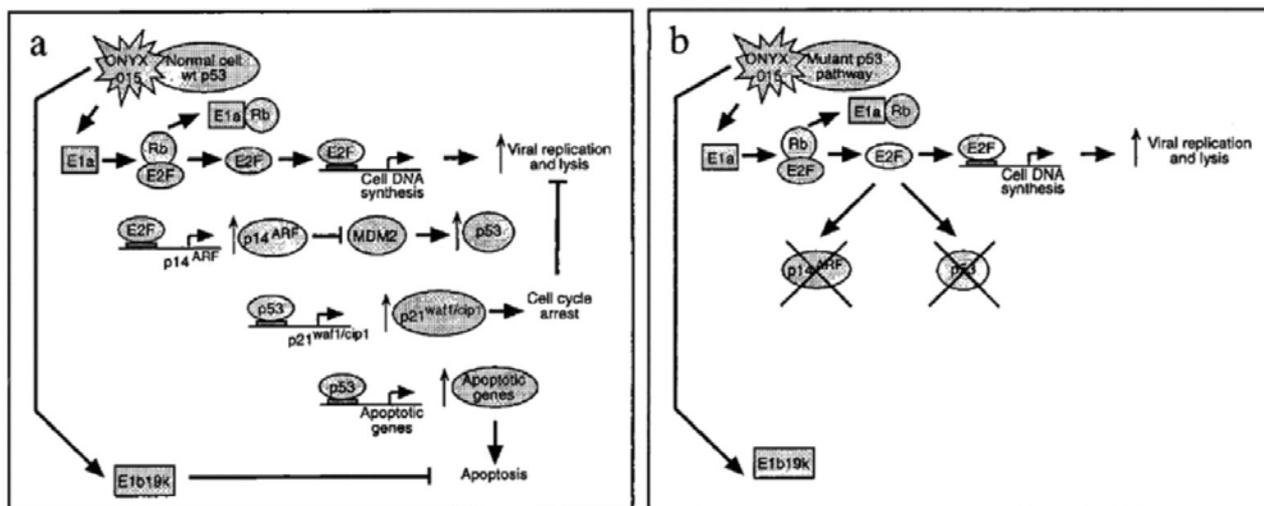
Zusammenfassend wird daher postuliert, dass Viren, die eine Deletion von E1B55K besitzen, nicht in normalen Zellen mit Wildtyp p53 replizieren können, da diese eine antiproliferative Antwort in Form von Apoptose oder Zellzyklusarrest geben können, während eine Wildtyp-Adenovirus-ähnliche Replikation in p53-defizienten Zellen erwartet würde (Bischoff et al. 1996; Heise et al. 1997). Dies beruht auf der Unfähigkeit des Virus, die Wirkung von p53 antagonisieren zu können. Eine weitere Wirkung des E1B55K-Proteins ist, zusammen mit dem E4-34K-Protein (E4orf6-Genprodukt), die Blockade der Translokation zellulärer mRNA vom Nucleus in das Zytosol und den zytosolischen Transport viraler mRNA (Rubenwolf et al. 1997).

Erste Publikationen schienen die These zu bestätigen, dass Add1520 in Zellen mit mutiertem p53 replizieren kann, nicht jedoch in Zellen mit Wildtyp p53. Bischoff et al. und Heise et al. zeigten in *in vivo* und *in vitro* Experimenten, dass Add1520 in p53-negativen Zellen genauso gut wie ein Wildtyp-Adenovirus repliziert, hingegen deutlich schlechter als ein Wildtyp-Adenovirus in p53-positiven Zellen; deutliche zytopathische Effekte wurden nachgewiesen in p53-negativen Zellen, jedoch nicht in p53-positiven Zellen; auch in xenotransplantierten humanen Tumoren im Nacktmausmodell wurde das gleiche Phänomen gezeigt (Bischoff et al. 1996; Heise, Williams, Olesch et al. 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Add1520 in der martialischen Sprache der Fachjournale auch als *magic bullet* oder *smart bomb* der onkologischen Therapie diskutiert (Lowe 1997). Dieses war verständlich, denn wie oben erwähnt besitzen mehr als 50% der humanen malignen Tumoren Mutationen im p53-Gen (Hollstein et al. 1991); ein Agens, welches spezifisch diese Tumoren therapieren könnte, wäre in der Tat ein *magic bullet*. Gleichzeitig wurden verschiedene Tierversuchs- und klinische Patientenstudien mit Add1520 begonnen; u.a. mit systemischer intravenöser Gabe von Add1520 im Nacktmaus-Xenograft-Modell mit HT29 humanen Kolonkarzinomzellen, in Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Oropharynx und in Patienten mit rezidivierenden malignen Gliatumoren des ZNS (Chiocca 1999; Heise, Williams, Xue et al. 1999; Nemunaitis et al. 2000; Nemunaitis, Khuri et al. 2001). Innerhalb dieser Studien wurden moderate Effekte von Add1520, eine Remission herbeiführen zu können, nachgewiesen (Kirm et al.

---

1998). Erste Schätzungen gingen davon aus, dass eine Infektion von 2% der Zellen eines Tumors nach Injektion ausreichen sollte, um eine Propagation des Virus durch den gesamten Tumor herbeizuführen (Pennisi 1996).

Beeindruckende Resultate wurden von Khuri et al. in einer klinischen Studie mit der Kombination von Add1520 mit Chemotherapeutika - Cisplatin oder 5-FU – erreicht. In der Studie hatten 19 von 30 Patienten mit rezidivierenden Plattenzellkarzinomen des Oropharynx signifikante objektive Tumorregressionen von wenigstens 50% der Tumorgröße, acht sogar komplette Remissionen; hingegen kam es zur Progression bei allen Tumoren in der Gruppe, die lediglich mit Chemotherapeutika alleine behandelt



**Abbildung 9: Vorgeschlagene Mechanismen der Wirkung von Add1520 (Onyx-015)**

Mögliche Mechanismen von Onyx-015 (Add1520): In normalen Zellen führt die Infektion mit Onyx-015 zu einer Freisetzung von E2F von pRb durch E1A und einer Induktion von p53. Die Überexpression von p53 führt zum Zellzyklusarrest durch Aktivierung von p21<sup>waf1/cip1</sup>, während die p53-vermittelte Apoptose blockiert wird durch das E1B-19K Protein. Hierdurch kommt es zu einer abgeschwächten viralen Replikation und Verhinderung einer vorzeitigen Zelllyse. In Zellen mit mutiertem p53, oder mit defekten p53 Signalwegen hingegen kommt es zur viralen Replikation und Lyse der Zellen. Nach (Dix et al. 2001)

wurden (Khuri et al. 2000). Habib et al. konnten in einer klinischen Studie zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms mit intravenöser Gabe von Add1520 nur bei einem von fünf Patienten eine partielle Remission erzielen, während vier Patienten eine Progression aufwiesen (Habib et al. 2002).

Kurze Zeit nach den ersten sehr vielversprechenden Publikation kamen Zweifel hinsichtlich der Spezifität der Replikation und des zytopathischen Effekts von Add1520 auf. Mehrere Untersuchungen widersprachen den oben erwähnten Ergebnissen und lieferten teilweise sogar diametral entgegengesetzte Befunde (Goodrum und Ornelles 1998; Hall et al. 1998; Rothmann et al. 1998; Dix et al. 2000; Georger et al. 2002):

Rothmann et al. zeigten, dass Add1520 in einigen p53-positiven Tumorzelllinien repliziert, und dass, andererseits, einige p53-negative Tumorzelllinien resistent gegen eine Replikation sind; außerdem, dass Add1520 auch in mehreren primären humanen Zelllinien repliziert und einen zytopathischen Effekt erzeugt (Rothmann et al. 1998). Goodrum et al. zeigten, dass die Replikation weniger vom p53-Status der Zelle, als vielmehr von der Temperatur und vom Zellzyklusstatus abhängt; so kann beispielsweise

---

der Defekt der Virusreplikation in p53-positiven Zellen aufgehoben werden durch Infektion in der S-Phase des Zellzyklus (Goodrum und Ornelles 1998). Georger et al. wiesen nach, dass in malignen Gliom-Xenografts in der Nacktmaus der onkolytische Effekt von Add1520 in p53-positiven Tumoren größer ist als in p53-mutierten Tumoren (Georger et al. 2002). Hall et al. zeigten, dass das intakte p53-Protein eine essentielle Rolle für eine produktive Adenovirusinfektion spielt; Wildtyp-Adenovirus und Add1520 replizieren sowohl in p53-negativen als auch in p53-positiven Zellen, jedoch kommt es nur in p53-positiven Zellen zu einem zytopathischen Effekt und produktiver Adenovirusinfektion, bzw. der zytopathische Effekt tritt wesentlich früher auf als in p53-negativen Zellen (Hall et al. 1998). Dix et al. wiesen nach, dass in Abwesenheit der Bildung des E1B55K-p53-Komplexes der Zelltod deutlich verspätet eintritt, und zwar nicht vermittelt über den p53-Signalweg (Dix et al. 2000). Diese Ergebnisse stellten die Verwendung von Add1520 als therapeutisches Mittel in der Tumorthherapie in Frage. Folgerichtig wurde über die mögliche *defusion of the smart bomb* berichtet (Linke 1998).

Ries et al. konnten zeigen, dass die Wiedereinführung von p14<sup>ARF</sup> in Tumorzellen mit Wildtyp-p53 die Replikation von Add1520 supprimiert; der Verlust von p14<sup>ARF</sup> erweist sich daher als ein Mechanismus, der die Replikation von Add1520 in Zellen mit Wildtyp-p53 erlaubt (Ries et al. 2000). Durch diese Erkenntnisse wiederum wurde der therapeutische Einsatz von Add1520 in Tumoren mit Aberrationen der p53-assoziierten Signalwege unterstützt.

McCormick weist darauf hin, dass die Evaluation des funktionellen p53 Status allein aufgrund des Vorhandenseins oder der Abwesenheit von mutiertem p53 irreführend sei, da die meisten Tumorzellen mit Wildtyp p53 andere Defekte im p53 Signalweg aufweisen, wie z.B. in pRb, ARF oder MDM2 (McCormick 2001).

Desweiteren führen Kirn et al. an, dass die Befunde von Hall et al. und Dix et al. keineswegs den bisherigen Ergebnissen entgegenstünden; so sei ein frühes p53-vermitteltes Eintreten des zytopathogenen Effektes verbunden mit einer verminderten Virusreplikation und einem verminderten *viral burst* (Kirn et al. 1998).

Die virale Replikation wurde in klinischen Studien nachgewiesen mittels in situ Hybridisierung von adenoviraler DNA in Tumorbiopsiematerial; ein vorwiegendes Vorliegen von adenoviraler DNA im Zellkern wurde zusammen mit einem beobachteten zytopathischen Effekt als Nachweis einer Replikation betrachtet. Zudem wurde mittels quantitativer PCR adenovirale DNA im Serum nachgewiesen; da nach der Administration eines adenoviralen Vektors in der Regel nur für 6 bis 24 Stunden adenovirales Genom im Serum vorliegt, wird ein Nachweis mehr als drei Tage nach Administration als Indikator für eine persistierende Replikation betrachtet (Kirn 2001a). Jedoch konnte nur zu relativ frühen Zeitpunkten, d.h. ein bis drei Tage nach intratumoraler Virusinjektion mit diesen Methoden eine Replikation gezeigt werden. Proben, die 14 bis 17 Tage nach Injektion untersucht wurden, weisen keine Replikation auf (Nemunaitis et al. 2000). Vasey et al. konnten nicht reproduzierbar nachweisen, dass durch intraperitoneale Gabe von Onyx-015 Ovarialkarzinomzellen infiziert werden können; in ihrer Studie

---

ritoneale Gabe von Onyx-015 Ovarialkarzinomzellen infiziert werden können; in ihrer Studie war keine Plasma-PCR für adenovirales Genom positiv und nur eine von zwölf Peritonealflüssigkeitsuntersuchungen (Vasey et al. 2002). Für die intraarterielle und intravenöse Gabe hingegen ist der Nachweis gelungen, dass auf diesen Wegen eine Infektion von Tumoren und virale Replikation zu erzielen ist. So zeigten etwa die Hälfte der Patienten drei bis fünf Tage nach arterieller intrahepatischer Infusion von Onyx-015 bei metastatischem kolorektalen Karzinom ein positives PCR Ergebnis (Reid et al. 2001). Drei von vier Patienten mit karzinomatösen Lungenmetastasen wiesen ebenfalls über PCR nachweisbares adenovirales Genom drei Tage nach intravenöser Virusinjektion auf (Nemunaitis, Cunningham et al. 2001).

Yver zweifelt die Aussagekraft des Nachweises viraler DNA im peripheren Blut als Beleg für eine virale Replikation an (Yver 2001). So konnte in klinischen Studien selbst bei Verwendung von nichtreplizierenden Adenoviren noch wenigstens 15 Tage nach intratumoraler Injektion gezeigt werden, dass adenovirale DNA im peripheren Blut vorhanden ist (Constenla-Figueiras et al. 1999).

Im Zusammenhang mit den positiven Ergebnissen der klinischen Phase I und II Studien liegt die Vermutung nahe, dass sich die Permissivität der verschiedenen Tumoren für eine Infektion und Replikation durch Onyx-015 interindividuell stark unterscheidet. Nach dem heutigen Stand der Dinge ist ein einfacher Zusammenhang zwischen p53-Status der Zelle und Replikationsfähigkeit und zytopathischem Effekt durch Add1520 nicht gegeben. Der exakte Zusammenhang bleibt zunächst unklar, wahrscheinlich spielen auch p53-assoziierte Signalwege dort eine Rolle, wie z.B. die Assoziation mit dem p14<sup>ARF</sup>-Status beweist .

#### ***4.3.8 Replizierende Adenoviren in Kombination mit Chemotherapie***

Sowohl in Tierversuchen, als auch in klinischen Therapiestudien am Menschen konnte gezeigt werden, dass sich die Effektivität der verschiedenen Therapiemodalitäten durch Kombination untereinander verstärken ließ. So konnte im Nacktmaus-Tumorxenograft-Modell gezeigt werden, dass die Effektivität einer Kombination von Onyx-015 mit Cisplatin oder 5-Fluorouracil größer ist als diejenige der einzelnen Substanzen (Heise et al. 1997; Heise et al. 2000); so ließ sich die Überlebenszeit im Nacktmaus-Oropharyngealtumor-Xenograft-Modell signifikant verlängern.

#### ***4.3.9 Sicherheit von Adenoviren in der Genterapie***

Die über lange Zeit vorherrschende Gewissheit, dass Adenoviren ein sicheres Vehikel für die Genterapie darstellten, wurde nach dem ersten Tod eines Patienten in einer Genterapiestudie in Frage gestellt.

---

---

In einer klinischen Phase I Gentherapiestudie des Ornithintranscarbamylase-Mangels mittels eines rekombinanten nichtreplizierenden adenoviralen Vektors, kam es an der University of Pennsylvania im September 1999 zum Tod des 18-jährigen Jesse Gelsinger. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Tod mutmaßlich bedingt war durch eine überwältigende inflammatorische Antwort nach intraarterieller hepatischer Applikation großer Virusmengen. Zusätzlich wurden zahlreiche Versäumnisse und Fehlverhalten der Investigatoren bei der Durchführung der Studie festgestellt. Aufgrund dieser Feststellungen wurden sämtliche klinische Gentherapiestudien an der University of Pennsylvania gestoppt und der verantwortliche *principal investigator* sämtlicher patientenbezogener Aufgaben in Klinik und Forschung enthoben (Stolberg 1999; Smaglik 2000).

Onyx-015 als replizierendes onkolytisches Adenovirus wurde bereits in etwa 10 klinischen Therapiestudien (Phase I-III) bei über 200 Patienten angewendet (Kirn 2001a). Als Administrationswege wurden die intratumorale, intraperitoneale, intrahepatisch arterielle und die intravenöse Gabe evaluiert. Bei diesen Studien konnte keine maximal tolerierbare Dosis ermittelt werden und es wurden nur geringe bis moderate Nebenwirkungen verzeichnet (Kirn 2001b). Zu den häufigen Symptomen zählten grippeähnliche Symptome, Fieber, Schmerzen im Bereich der Injektionsstelle bei intratumoraler Injektion oberflächlicher Tumoren, zusätzlich Bauchschmerzen, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen bei intraperitonealer Injektion, und Fieber, Schüttelfrost und Asthenie bei intravasaler Gabe (Kirn 2001a).

Die oben genannten Vorkommnisse an der University of Pennsylvania sind eine Warnung und stimulieren die Suche nach nebenwirkungsärmeren Therapieformen in der Gentherapie. Hierzu zählen auf dem Feld der Adenovirusvektorologie die Entwicklung von geringer immunogenen Adenoviren, mit modifizierten *Fiber*- und *Capsid*-Strukturen, die ein besseres *Targeting* erlauben sollten (Dmitriev et al. 1998). Die heutigen adenoviralen Vektoren sind nur als Etappen auf dem Weg zu wirkungsvolleren und nebenwirkungsärmeren Strategien zu verstehen.

Weitere Probleme in der Verwendung von Adenoviren als Genvektoren bestehen darin, dass es bei der Produktion von nichtreplizierenden Adenoviren zur Kontamination mit replizierenden Adenoviren (*replication competent Ad – RCA*) kommen kann. Dies beruht im Falle der Verwendung von 293 HEK Zellen als Produktionszelllinie darin, dass durch homologe Rekombination zwischen dem Virusgenom und den von 293 Zellen in *trans* komplementierten, für die virale Replikation notwendigen Sequenzen, komplette replikationsfähige Viruspartikel gebildet werden können. Daher sind für klinische Therapiestudien Produktionszelllinien wünschenswert, die nicht die Gefahr der homologen Rekombination aufweisen. Es sind verschiedene stabile Zelllinien entwickelt worden (Gao et al. 2000).

---

Die Empfehlungen des *Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)* des *National Institute of Health (NIH)* der U.S.A. sind, Standards für den Vergleich von in klinischen Studien erhobenen experimentellen Daten zu entwickeln, hierzu zählt die Vereinheitlichung der Dosisangaben, die Transgenexpressions- und Transduktionseffizienz der Vektoren, und die Reinheit der verwendeten Vektoren darzulegen; des weiteren solle eine zentrale Datenbank für die Verwaltung möglicher Nebenwirkungen entworfen werden .

## 4.4 Interleukin-2

### 4.4.1 Funktionen und Biologie von Interleukin-2

IL-2, ein 15-kD Protein aus 153 Aminosäuren, mit einer Disulfidbrücke, ist ein sphärisches Molekül mit sechs Alpha-Helices und gehört zu einer Familie von Zytokinen, zu der auch IL-4, -7, -9, and -15 gehören. Initial wurde es als *T-cell-growth-factor* bezeichnet (Morgan et al. 1976; Mier und Gallo 1980; Taniguchi et al. 1983).

Wie auch andere Interleukine wirkt IL-2 in der Hauptsache auf parakrinem oder autokrinem Wege und spielt eine zentrale Rolle bei der Reifung, Entwicklung und Proliferation von Lymphozyten und Monozyten.

IL-2 wird von T-Zellen nach Aktivierung über MHC-Peptid-Komplexe mit dem CD4/TCR-Komplex produziert. Das natürliche IL-2 ist glykosyliert, die Glykosylierung ist aber nicht essentiell für die biologische Wirkung.

Die Wirkung von IL-2 wird vermittelt über den IL-2-Rezeptor. Dieser ist ein aus drei Untereinheiten bestehender Rezeptor, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette (Taniguchi und Minami 1993). Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette sind Mitglieder einer Zytokinrezeptorsuperfamilie und essentiell für die Signaltransduktion; die  $\alpha$ -Kette hingegen erhöht die Affinität der IL-2-IL-2-Rezeptor-Interaktion und ist Bestandteil des hochaffinen IL-2-Rezeptors.

Der Ablauf der Signalkaskade nach Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor erfolgt über die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der  $\beta$ -Kette durch Jak-3, Bindung von STAT-3 und -5 an die phosphorylierten Tyrosinreste der  $\beta$ -Kette und Phosphorylierung von STAT-3 und -5. Die phosphorylierten STAT-3 und -5 werden in den Nucleus transloziert und fungieren als Transkriptionsfaktoren (Taniguchi und Minami 1993).

Eine weitere Signalkaskade läuft über die Assoziation von p56lck, einem Mitglied der src-Familie ab; die Kinaseaktivität von p56lck wird verstärkt durch IL-2. Daraufhin kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins shc mit folgender Aktivierung von p21ras und weiter von den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) erk-1 und erk-2 (Welte et al. 1999).

---

---

Das akzeptierte Modell der T-Zellimmunologie geht davon aus, dass T-Zellen zwei unterschiedliche Signale zur Aktivierung benötigen, zum einen die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors-CD4/CD8-Komplexes mit dem MHC-Peptid-Komplex, zum anderen ein zweites kostimulatorisches Signal (Bretscher und Cohn 1970; Lafferty und Cunningham 1975; Schwartz 1990; Schwartz 1992; Ochsenbein et al. 2001). Dieses zweite Signal kann unterschiedlicher Natur sein; z.B. die Interaktion von membranständigen Molekülen der beteiligten Zellen, etwa von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf Seiten der antigenpräsentierenden Zellen mit CD28 auf Seiten der T-Zellen oder auch anderer T-Zell-aktivierender Liganden wie ICAM-1 (CD54). Die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen wird im wesentlichen angetrieben mittels löslicher Faktoren, wie z.B. IL-2 oder IFN- $\gamma$ . Die wichtigste biologische Wirkung von IL-2 ist die Aktivierung und Stimulation zur Proliferation von T-Lymphozyten, des weiteren die Rekrutierung von lymphokin-aktivierten Killerzellen. Insbesondere bei hohen Konzentrationen kommt es *in vitro* zur Aktivierung von NK-Zellen und von Makrophagen (Herberman 2002). Meropol et al. konnten in klinischen Studien die Expansion und Aktivierung von NK-Zellen nach subkutaner niedrigdosierter IL-2 Therapie nachweisen (Meropol et al. 1996; Meropol et al. 1998). Wahrscheinlich kommt es auch zu einer Verstärkung der antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und zu einer Diversifizierung des Zielzellspektrums (Davis et al. 2003).

Die Wirkungen von IL-2 beschränken sich also nicht allein auf die spezifischen Komponenten des Immunsystems, sondern auch auf die unspezifischen Komponenten. So ist neben den oben erwähnten Wirkungen auch ein stimulierender Einfluss auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und  $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben (Djeu et al. 1993; Kjeldsen-Kragh et al. 1993; Espinoza-Delgado et al. 1995).

Schmidt et al. beschrieben in einem Immunisierungsexperiment mit IL-2-Gen-transduzierten Melanomzellen eine optimale Effektivität bei mittleren IL-2-Produktionsraten (Schmidt et al. 1995). Bei sehr hohen Produktionsraten kommt es nicht zur Ausbildung von tumorspezifischen CTLs. Dieses Phänomen wird als Interleukin-2-Dosis-Effekt bezeichnet.

#### **4.4.2 Klinische Anwendungen von IL-2**

Die Anwendung eines hochdosierten systemischen IL-2-Regimens in klinischen Studien bei metastasiertem Melanom oder Nierenzellkarzinom ergab eine Tumor-Response-Rate von 15-20% (Dutcher et al. 1989; Parkinson, Abrams, Wiernik, Rayner et al. 1990; Rosenberg et al. 1994; Negrier et al. 1998). Komplette Remissionen wurden in etwa 4-6% der Fälle beobachtet. Geringere Response-Raten wurden beobachtet bei Patienten mit Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom und kolorektalem Karzinom. Momentan wird IL-2 im Rahmen der onkologischen Therapie nur bei metastasiertem Melanom und Nierenzellkarzinom routinemäßig eingesetzt.

---

In klinischen Studien wurde eine niedrigdosierte IL-2 Therapie eingesetzt in Kombination mit monoklonalen Antikörpern, da die oben erwähnte Aktivitätszunahme der NK-Zell-Aktivität und ADCC-Aktivität zu den Effektormechanismen der monoklonalen Antikörpertherapie zählt. Bajorin et al. und Ziegler et al. verwendeten eine solche Kombination in der Therapie des metastasierten Melanoms, bzw. fortgeschrittener Karzinome (Bajorin et al. 1990; Ziegler et al. 1992).

Desweiteren konnten Studien bei HIV-positiven Patienten zeigen, dass eine niedrigdosierte IL-2-Gabe zu einer deutlichen Stimulation des Immunsystems führt, gemessen an einer erhöhten Konzentration zirkulierender NK-Zellen, CD4-Zellen, und Monozyten (Jacobson et al. 1996; Kovacs et al. 1996). Aufgrund erheblicher Fortschritte in der hochaktiven antiretroviralen Therapie (*highly active antiretroviral therapy* – HAART) mittels NRTIs (*nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*), NNRTIs (*non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*) und Protease-Inhibitoren, ist diese Form der Immunstimulation aber weitestgehend obsolet geworden.

#### **4.4.3 Nebenwirkungen der IL-2 Therapie**

Die dosislimitierenden Nebenwirkungen der systemischen IL-2-Therapie sind unter anderem das *capillary-leak*-Syndrom, mit einer Erhöhung der kapillären Permeabilität und den Folgen, die denen eines septischen Schocks ähneln, wie Flüssigkeitsretention, Hypotension, ARDS, prärenales Nierenversagen und gelegentlich Myokardinfarkt. Außerdem kommen grippeähnliche Symptome, wie Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerzen und schweres Krankheitsgefühl vor (Parkinson, Abrams, Wiernik und al. 1990; Negrier et al. 1998). Diese Phänomene sind bedingt durch die sekundäre Freisetzung von Zytokinen, wie z.B: TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6. Des weiteren spielt eine durch endothelial produziertes NO vermittelte Hypotension eine Rolle (Shahidi und Kilbourn 1998). Klempner et al. beschrieben ein vermehrtes Auftreten von Bakteriämien bei Patienten, die eine systemische IL-2 Therapie erhielten, aufgrund eines erworbenen reversiblen Defektes der Neutrophilen-Chemotaxis (Klempner et al. 1990).

#### **4.4.4 Effekt von humanem Interleukin-2 auf murine Lymphozyten**

Humanes und murines IL-2 weisen ein hohes Maß an Homologie auf. Die Länge des humanen IL-2 beläuft sich auf 153 Aminosäuren, die des murinen IL-2 auf 169 Aminosäuren; hierbei sind 56,8% der Aminosäuren identisch und insgesamt 71,0% sind identisch oder homolog. Bleackley et al. zeigten, dass *in vitro* die Effekte von rekombinantem humanen und aufgereinigtem genuinen murinen IL-2 auf murine Lymphozyten im Rahmen der verwendeten Assays gleich sind (Bleackley et al. 1985); so sind genuines murines und rekombinantes humanes IL-2 im gleichen Maße in der Lage, eine primäre zytoto-

---

---

xische T-Zell Antwort und auch eine zytotoxische T-Zell Antwort von Gedächtniszellen (*memory CTL*) auszulösen. Daher ist anzunehmen, dass sich möglicherweise auch die *in vivo* Effekte zwischen murinem und rekombinantem humanen IL-2 im Mausmodell nicht stark unterscheiden.

## **4.5 IL-2 -Gentherapie mittels adenoviraler Vektoren**

### **4.5.1 Nichtreplizierende Adenoviren und IL-2 – Zytokin-Gentherapie**

Die Wirkung der systemischen Gabe von IL-2 mit verlängertem Überleben und verzögertem Tumorstadium ist im Tiermodell nachweisbar. Durch die Verwendung der Gentherapie liessen sich theoretisch deutlich höhere intratumorale IL-2 Spiegel erzielen als mit alleiniger Gabe des reinen Zytokins. Für diesen Gentransfer scheinen Adenoviren die idealen Vektoren zu sein, da sie eine hohe Transduktionseffizienz aufweisen und ein hohes Expressionslevel erzielen können. Nachdem Gansbacher et al. bereits mit einem retroviralen Vektor haben zeigen können, dass ein IL-2 Gentransfer in einer verminderten Tumorigenität und verstärkten Immunität gegenüber einer Tumorinduktion nach Injektion von Tumorzellen resultiert (Gansbacher et al. 1990), konnten Addison et al. im Modell des murinen Mammaadenokarzinoms zeigen, dass durch intratumorale Injektion eines rekombinanten Adenovirus eine Tumorregression zu erzielen ist, und dass gleichzeitig die Mäuse immun sind gegenüber einer wiederholten Tumorinduktion (Addison et al. 1995a). In ihrer Studie erwies sich der Gentransfer von IL-2 mittels eines nichtreplizierenden Adenovirus als effiziente Immuntherapie; die intratumoralen zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen sind gegenüber der Kontrollgruppe deutlich vermehrt. In einer ähnlichen Untersuchung konnten Addison et al. nachweisen, dass die Kombination zweier nichtreplizierender Adenoviren, von denen jeweils einer IL-2, der andere IL-12 trug, wirksamer ist als die einfache Applikation jedes Vektors (Addison et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden geliefert von Toloza et al.; sie erreichen ebenfalls eine Tumorabstoßung, bzw. -regression im immunkompetenten Fibrosarkom- und Mammaadenokarzinommodell der Maus nach intratumoraler Injektion eines IL-2-Gen-tragenden Adenovirus (Toloza et al. 1996). Jedoch wird hier im hohen Dosisbereich bereits ein erhebliches Maß an IL-2-vermittelter Toxizität beobachtet.

### **4.5.2 Replizierende Adenoviren und IL-2**

Ein Schwachpunkt der intratumoralen Applikation von nichtreplizierenden Adenoviren ist die inhomogene Verteilung der Viren im Tumor. Im wesentlichen werden Zellen im Bereich des Stichkanals erreicht, da die Verteilung im Tumor erschwert ist. Verschiedene Hindernisse beeinträchtigen die Ausbreitung von nichtreplizierenden Viren im Tumor; hierzu zählen die intratumoralen Druckgradienten

---

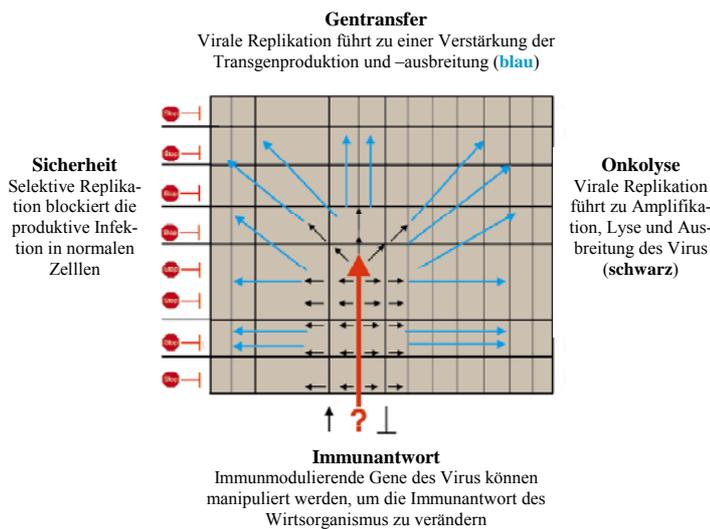
und Moleküle der extrazellulären Matrix (Jain 1994; Heise, Williams, Olesch et al. 1999). Daher erscheint die Kombination von replizierenden Viren in diesem Zusammenhang erfolgsversprechend. Motoi et al. verwendeten die Kombination eines replizierenden attenuierten Adenovirus, der Add11520-äquivalent ebenfalls E1B55K-deletiert war, mit einem nichtreplizierenden IL-2-Gen tragenden Adenovirus mit dem Ziel, dass das replizierende Virus auch dem nichtreplizierenden Virus die zur Replikation notwendigen Gene transkomplementieren würde (Motoi et al. 2000); im SCID-Maus-Pankreas-Xenograft-Modell werden höhere Regressionsraten erzielt als mit den jeweiligen Viren in alleiniger Gabe.

### 4.6 Kombination von Onkolyse und Gentransfer – *two-pronged approach*

Hermiston diskutiert die Verwendung von replizierenden onkolytischen Viren als Genvektoren im Einvektor-System(Hermiston 2000). Hierbei sollen zwei Effekte ausgenutzt werden; zum einen der direkte

onkolytische Effekt durch den lytischen Replikationszyklus des Virus, welches sich durch Replikation innerhalb des Tumors ausbreiten kann, zum anderen Effekte, die durch den Gentransfer, z.B. von immunmodulatorischen Genen, stattfinden (Hermiston 2000). Des weiteren soll mit einem replizierenden Vektor eine deutlich bessere Distribution des Transgens im Tumor erzielt werden. Die ersten Schätzungen gingen im Falle von Onyx-015 davon aus, dass es ausreichen sollte, 2% der Tumorzellen im Rahmen der Injektion zu infizieren, um durch virale Replikation und Ausbreitung den gesamten Tumor zu infizieren (Pennisi 1996).

Überlegungen hierzu waren, dass ein replizierendes Adenovirus eine bessere Distribution im Tumorgewebe aufweisen sollte als ein nichtreplizierendes Virus, welches im wesentlichen Zellen entlang des Nadeltraktes infiziert und transduziert. Die virale Replikation kann hier möglicherweise eine deutliche Amplifikation des therapeutischen Transgens erzeugen (s. Abbildung 10) (Hermiston 2000).



**Abbildung 10: Vorteile der Verwendung transgener replizierender Adenoviren**

Durch die Verwendung eines replizierenden onkolytischen transgen-exprimierenden Virus kann der onkolytische Effekt des Virus und z.B. auch die Immunantwort moduliert werden. Abbildung modifiziert nach Hermiston (Hermiston 2000)

---

## 4.7 Bereits in der Arbeitsgruppe erhobene Befunde

In der Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Arbeit erhobene Befunde wiesen ebenfalls daraufhin, dass keine einfache Beziehung zwischen dem p53-Status der verwendeten Zellen und der Replikationsfähigkeit eines E1B55K-deletierten Adenovirus besteht (Anton 1999b). Vergleiche der Infektion von DU145, LNCaP und PC-3 Zellen mit einem E1B55K-deletierten Adenovirus (äquivalent zu Onyx-015/Add11520) zeigten, dass im Vergleich zur Infektion mit einem Wildtyp-Adenovirus die Viruskonzentrationen in Zellkulturüberständen um den Faktor 45, 55 und 54, respektive, vermindert waren. Von den verwendeten Zelllinien weist alleinig die Zelllinie LNCaP zwei Wildtyp-p53-Allele auf, DU145 Zellen haben zwei Mutationen im p53 Gen (Codon 274<sup>Pro→Leu</sup>, Codon 223<sup>Val→Phe</sup>) und PC-3 Zellen sind hemizygot für Chromosom 17p, den Locus von p53, das vorhandene Allel besitzt eine *single bp* Deletion im Codon 138, was zum *frame shift* und Einführung eines Stopcodons an Position 169 führt (Carroll et al. 1993).

---

## 5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die zu Beginn dieser Arbeit im Jahr 1999 in der Literatur vorliegenden Daten wiesen auf einen moderaten onkotropen Effekt von E1B55K-deletierten Adenoviren hin (s. 4.3.7). Ebenso bestehen in der Literatur eindeutige Hinweise auf eine Wirksamkeit von Interleukin-2 in der Immuntherapie von malignen Tumoren und in einigen Bereichen bereits klinische Anwendungen (s. 4.4.2).

Daher erschien es sinnvoll, zwei erfolgsversprechende Therapiestrategien zu verbinden, um einen additiven oder synergistischen Effekt zu erzielen. Zusammengefasst sind die beiden grundsätzlichen zu erwartenden Mechanismen:

- (1) Die virusbedingte Tumorzellyse durch das onkolytische Virus, und
- (2) die IL-2-vermittelte immunologische Stimulation,

gewissermaßen ein *two-pronged approach* an die onkologische Therapie, wie schon in Abschnitt 0 diskutiert. Eine solche Kombination im Ein-Vektor-System ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

Im *in vitro* Modell sollten die verschiedenen Komponenten dieses kombinierten Verfahrens untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die Zytopathogenität, Virusfreisetzung und IL-2 Produktion nach Infektion mit verschiedenen Adenoviren. Im Tumorexograftmodell in der Nacktmaus sollten insbesondere die Parameter IL-2 Produktion, Tumorregression, Überleben der Tiere und Ausmaß der Replikation innerhalb des Tumors untersucht werden.

---

---

# 6 METHODEN

Die verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen sind aufgeführt in Abschnitt 10.

## 6.1 Zellkulturmethoden

### 6.1.1 Zellen

Die verwendeten humanen Prostatakarzinomzelllinien DU 145, LNCaP und PC-3 wurden für *in vitro*, die Zelllinie DU 145 auch für *in vivo* Experimente verwendet. Die Zelllinie LNCaP weist das p53-Gen-Wildtyp-Allel auf, wohingegen die Zelllinie DU 145 eine Inaktivierung beider Allele durch Punktmutationen besitzt und die Zelllinie PC-3 eine Frameshift-Mutation im p53-Gen hat und hemizygot für Chromosom 17p, den Locus des p53-Gens, ist (Carroll et al. 1993).

Die 293 HEK (*human embryonal kidney*) Zelllinie wurde verwendet für die Produktion von Virusstammlösungen und die Messung von Adenoviruskonzentrationen. Die Zelllinie 293 ist eine permanente Zelllinie, die mit DNA von humanem Adenovirus Typ 5 transformiert ist. Die Zelllinie besitzt die linksseitigen Gensequenzen des Adenovirusgenoms und erlaubt somit auch die Replikation von nicht-replizierenden Adenoviren durch die *trans*-Komplementierung der beschriebenen Sequenzen und die Bereitung von Virusstammlösungen (Graham et al. 1977).

### 6.1.2 Zellkultur

Sämtliche Zellen wurden als Monolayerkulturen in Zellkulturschalen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung. Die Zellkulturarbeiten wurden steril unter S1- oder S2-Sicherheitsstufenbedingungen in Sterilbänken durchgeführt.

DU 145 und PC-3 Zellen wurden in Dulbecco's MEM Medium mit 10% FBS, 2 mM Glutamin, LNCaP Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat und 293 Zellen in MEM-Earle Medium mit 10% FBS und 2 mM Glutamin kultiviert.

Das Passagieren und Subkultivieren von DU 145, LNCaP und PC-3 Zellen erfolgte nach Standardprotokoll mit Trypsin-EDTA (Lindl und Bauer 1994), das von 293 Zellen mit Citratsalzlösung.

Die Subkultivierungsrate von DU 145 und PC-3 Zellen betrug 1:4 bis 1:6, von LNCaP und von 293 Zellen 1:2 bis 1:3. Das Passagieren der Zellen wurde jeweils bei Erreichen eines nahezu konfluenten Monolayers durchgeführt.

---

Das Auftauen und Einfrieren der Zellen wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Lindl und Bauer 1994). Das Auszählen von Zellen erfolgte standardmäßig in Neubauer-Zählkammern (Lindl und Bauer 1994).

## 6.2 Virusarbeiten

### 6.2.1 *Verwendete Adenoviren*

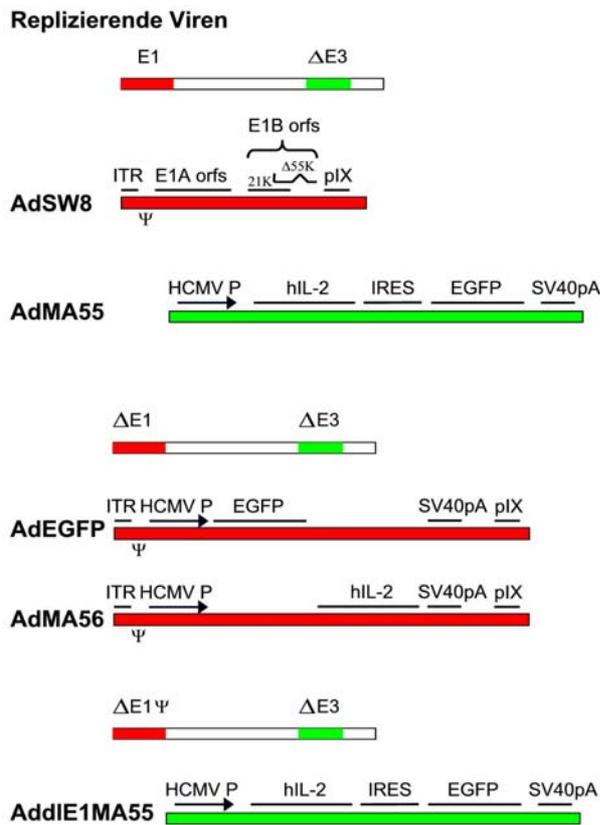
Add170-3 ist ein nichtreplizierendes Adenovirus der ersten Generation, welches Deletionen der E1 und E3 Sequenzen des Adenovirusgenoms aufweist, die Deletion in der E1 Region beträgt 3,2 kbp und lediglich die linksseitige ITR und Verpackungssignale ( $\psi$ ) bleiben intakt; des weiteren erstreckt sich die Deletion bis kurz vor den Protein IX Promoter, der jedoch funktional bleibt (Bett et al. 1994). Add170-3 wurde als Negativkontrolle bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten eingesetzt, um den Effekt von Viruspartikeln alleine zu evaluieren.

AdMA56 ist ein nichtreplizierendes Adenovirus, welches vollständige Deletionen der E1 und E3 Sequenzen des Adenovirusgenoms aufweist (s. Abbildung 11). Zusätzlich besitzt dieses Virus eine Expressionskassette bestehend aus den Genen für ITR, HCMV-Promoter, hIL-2, SV40pA und der pIX-Einheit inseriert im deletierten E1-Bereich.

Ad $\Delta$ E1MA55 ist ein nichtreplizierendes Adenovirus, welches vollständige Deletionen der E1 und E3 Sequenzen des Adenovirusgenoms aufweist. Zusätzlich besitzt dieses Virus eine Expressionskassette bestehend aus den Genen für HCMV-Promoter, hIL-2, IRES, EGFP, und dem SV40pA, inseriert im deletierten E3-Bereich (s. Abbildung 11).

AdEGFP ist ein nichtreplizierendes Adenovirus, welches vollständige Deletionen der E1 und E3 Sequenzen des Adenovirusgenoms aufweist. Zusätzlich besitzt dieses Virus eine Expressionskassette bestehend aus den Genen für HCMV-Promoter, EGFP, und dem SV40pA inseriert im deletierten E1-Bereich (s. Abbildung 11). EGFP ist ein Reportergen, welches abgeleitet wurde von einem in der bioluminiszierenden Qualle *Aequorea victoria* vorhandenen chromophoren Protein (Prasher et al. 1992); mittels Fluoreszenzmikroskopie kann bei einem Exzitationsmaximum von 488 nm Wellenlänge und einem Emissionsmaximum von 508 nm das Vorhandensein des Reporterproteins nachgewiesen werden. EGFP weist gegenüber GFP ein in den roten Frequenzbereich verschobenes Fluoreszenzspektrum auf (Clontech 2001).

---



**Abbildung 11: Verwendete Adenoviren**

Bei den verwendeten Adenoviren AdEGFP, AdMA56 und AdΔE1MA55 handelt es sich um Viren der ersten Generation, d.h. nichtreplizierende Viren mit Deletionen der E1 und der E3 Region. AdMA55 und AdSW8 hingegen sind replizierende Adenoviren, die eine Deletion in der E1B-Region besitzen, welche die Expression von E1B-55K verhindert, hingegen aber die Expression von E1B-19K zulässt. Die Konstruktion in der E1 Region ist bei AdMA55 und AdSW8 identisch; jedoch besitzt AdMA55 zusätzlich eine Expressionskassette mit dem hIL-2 Gen, der *internal ribosomal entry site*, EGFP-Gen und dem Polyadenylierungssignal in der E3 Region. Diese Expressionskassette in der E3 Region besitzt auch das Virus AdΔE1MA55; allerdings ist dieser Vektor der ersten Generation nichtreplizierend aufgrund einer 3,19 kbp Deletion in der E1 Region.

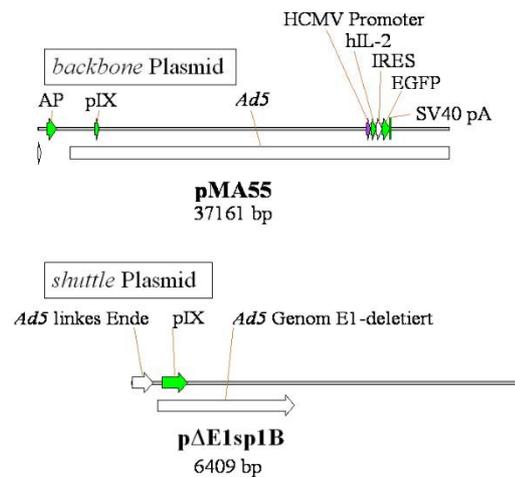
AdSW8 ist ein replizierendes Adenovirus, welches eine Mutation im E1B55K-Gen besitzt, ohne dass der überlappende *orf* des E1B19K-Gen betroffen ist (s. Abbildung 11). Sämtliche anderen Gene des E1-Bereiches sind funktionsfähig und erlauben somit eine Replikation. Zusätzlich weist das Virus eine Deletion des E3-Bereiches auf.

AdMA55 ist ein replizierendes Adenovirus welches eine Mutation im E1B55K-Gen besitzt, ohne dass der überlappende *orf* des E1B19K-Gen betroffen ist. Sämtliche anderen Gene des E1-Bereiches sind funktionsfähig und erlauben somit eine Replikation. Zusätzlich weist das Virus eine Deletion des E3-Bereiches auf. Im deletierten E3-Bereich ist eine Expressionskassette inseriert, bestehend aus den Genen für HCMV-Promoter, hIL-2, IRES, EGFP und dem SV40pA (s. Abbildung 11).

Von den verwendeten Adenoviren waren Ad170-3, AdEGFP, AdMA55, AdMA56 und AdSW8 zu Beginn dieser Arbeit bereits vorhanden. AdΔE1MA55 wurde über Kotransfektion von 293 Zellen produziert.

### 6.2.2 Kotransfektion

Für die Herstellung von Ad $\Delta$ E1MA55 mittels Kotransfektion in 293 Zellen wurden CsCl-aufgereinigte Plasmide verwendet (s. 6.5.1). Als *Shuttle*-Plasmid wurde in diesem Fall p $\Delta$ E1sp1B benutzt und als *Backbone*-Plasmid pMA55. Die Kotransfektion und Produktion des Virus, d.h. die Untersuchung von sich nach Kotransfektion bildenden Plaques, Expansion, Pronase-SDS Lösung der Zellen, Phenolextraktion und Kontrollverdau mit HindIII und PvuI wurde durchgeführt nach Hitt et al. (Hitt et al. 1995). Zusammengefaßt beruht die Technik auf der Einbringung eines zirkulären *backbone* Plasmids, welches den größten Teil der adenoviralen Gensequenzen beinhaltet, und eines *shuttle* Plasmids, welches, in diesem Fall, die linksseitigen adenoviralen Gensequenzen besitzt, in die E1A-komplementierende 293 Zelllinie. Durch spontane homologe Rekombination kommt es zur Bildung von kompletten Virus-DNA-Sequenzen; über weitere Schritte, d.h. Plaque-Isolierung und Produktion in 293 Zellen, können so Virusstammlösungen hergestellt werden. Das hier verwendete *backbone* Plasmid beruht auf pBHG10, einem klassischen *backbone* Plasmid (Hitt et al. 1995) versehen mit einer Expressionskassette, die den HCMV Promoter, das hIL-2 Gen, IRES, EGFP Gen und das SV40 pA Signal in der deletierten E3 Region enthält (Anton 1999a). Das *shuttle* Plasmid p $\Delta$ E1sp1B bringt die linksseitigen adenoviralen Gensequenzen ein, mit einer 3,19 kbp Deletion in der E1 Region (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Verwendete Plasmide zur Kotransfektion**

Zur Produktion von Ad $\Delta$ E1MA55 wurden eine Kotransfektion nach Hitt et al. mit den beiden oben angegebenen Plasmiden durchgeführt (Hitt et al. 1995).

### 6.2.3 Kultivierung von Zellen und Infektion mit Adenoviren

Für die verschiedenen *in vitro* Infektionsversuche wurden die verschiedenen Zellen auf 60mm-Zellkulturplatten, 6-well- oder 12-well-Platten ausgelegt. Für die DU 145 und PC-3 Zellen wurde in der Regel eine Zellanzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen pro 60mm-Zellkulturplatte oder  $1 \times 10^5$  Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgelegt. Für die LNCaP Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro 60mm-Platte oder  $5 \times 10^5$  Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgelegt. Bei diesen Zelldichten kommt es bei normalem Zellwachstum zur Bildung eines konfluenten Monolayers innerhalb von vier bis sechs Tagen.

---

Zur Infektion wurden zunächst Verdünnungen der Virusstammlösungen in PBS<sup>2+</sup> bereitet. Das Verhältnis von verwendeten pfu pro Zelle wird als MOI (*multiplicity of infection*) angegeben. Die Infektionsversuche wurden in der Regel mit MOIs von 1 bis 100 durchgeführt.

Wenn hiervon abweichende Parameter verwendet wurden, ist dies im Ergebnisteil explizit angegeben.

Das Medium der zu infizierenden Zellen wurde abgesaugt und jeweils 200 µl der vorbereiteten Virus-suspension hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation im Zellkulturinkubator um eine Adsorption des Virus zu erlauben, wobei alle 10 Minuten ein vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte erfolgte. Dann wurde das für die Zelllinie entsprechende Medium hinzugegeben und die Zellen für den weiteren Versuchsverlauf im Zellkulturinkubator inkubiert.

#### **6.2.4 Plaque Assay**

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde die Eigenschaft von Adenoviren herangezogen, in einem 293-Zell-Monolayer unter einem MEMF11-Overlay Plaques zu bilden (Hitt et al. 1995). Zur Evaluation von Überständen, Zellysaten und Virusstammlösungen wurden demnach 293 Zellen infiziert und mit einem MEMF11-Overlay überschichtet.

Hierzu wurden zunächst 293 Zellen so in 60mm-Zellkulturplatten ausgelegt, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu einem subkonfluenten Monolayer gewachsen waren. Es wurden serielle Zehnfach-Verdünnungsreihen in PBS mit 0,68 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,49 mM MgCl<sub>2</sub> (PBS<sup>2+</sup>) der zu bestimmenden Lösung (Überstände, Zellysate) hergestellt. Zellysate und Zellkulturüberstände unterliefen jeweils drei Gefrier-Auftau-Zyklen vor der Verdünnung, um eine maximale Freisetzung aus den Zellen zu gewährleisten. Jeweils 200 µl der Verdünnungen wurden nach dem Absaugen des Mediums auf die 293 Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte verteilt. Danach erfolgte eine 30 minütige Inkubation im Zellkulturinkubator um eine Adsorption des Virus zu erlauben, wobei alle 10 Minuten zur ausgeglichenen Verteilung ein vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte erfolgte. Nach Abschluss der Inkubation wurde ein MEMF11-Overlay aufgebracht. Nach Abkühlung und Aushärtung des MEMF11-Overlays erfolgte die weitere Inkubation im Zellkulturinkubator unter Standardbedingungen. Nach einigen Tagen Inkubation kommt es zur Ausbildung von Plaques im konfluenten Monolayer, die die lytische Aktivität des Virus darstellen. Diese Plaques wurden nach sieben und zehn Tagen mit bloßem Auge gezählt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung und Heranziehung der Anzahl der Plaques am zehnten Tag nach Infektion, erfolgte die Berechnung der Viruskonzentration mit der Einheit pfu/ml (*plaque forming unit / ml*).

---

Die Bestimmung der Viruskonzentration erfolgte immer aufgrund zwei unabhängiger Verdünnungsreihen der Virusstammlösung und aufgrund zweier MEMF11-Overlays pro Verdünnungsreihe und Verdünnung.

### **6.2.5 Bestimmung der Viruspartikelkonzentration**

Zur Bestimmung der Konzentration der Viruspartikel wurde eine 20-fache Verdünnung der Virusstammlösung hergestellt (95 µl Aqua bidest. + 5 µl Virusstammlösung) und 10 min bei 70°C inkubiert, um eine Freisetzung der viralen DNA aus den Viruspartikeln zu erreichen. Im Anschluss wurde im Photometer die Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der Viruspartikel wird angenommen, dass ein Absorptionswert von 1 einer Viruspartikelkonzentration von  $1,1 \times 10^{12}$  *viral particles* / ml entspricht (Mittereder et al. 1996a). Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann somit die Viruspartikelkonzentration berechnet werden. Der errechnete Wert der Viruspartikelkonzentration liegt immer oberhalb der beim Plaque Assay (s. 6.2.4) ermittelten Konzentration an pfu, da der Großteil der Viruspartikel nicht funktionell im Sinne der Plaquebildung ist. Bei guten Viruspräparationen beträgt das Verhältnis *viral particles*:pfu  $\leq 100:1$  (Mittereder et al. 1996b). Diese Methode der Konzentrationsbestimmung beruht auf der Messung des DNA-Gehaltes in der betreffenden Lösung, daher ist sie ausschließlich für aufgereinigten Virusstammlösungen anwendbar (s.unten).

### **6.2.6 Herstellung von nicht aufgereinigten Virusstammlösungen**

Für Teile der *in vitro* Experimente wurden Infektionen mit nicht aufgereinigten Virusstammlösungen durchgeführt. Zur Aufbereitung von nicht aufgereinigten Virusstammlösungen wurden vier bis acht 150mm-Zellkulturplatten zur Subkonfluenz kultivierter 293 Zellen mit einer MOI von 1 bis 10 infiziert (s. 6.2.3). Die Infektion erfolgte in einem Volumen von 2 ml PBS<sup>2+</sup> pro 150mm-Platte. Nach Sichtbarwerden des viral bedingten zytopathischen Effekts erfolgt das Abschaben des Zellrasens mittels des Zellschabers und Überführung von Zellen und Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 800 g für 15 min. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 1 bis 2 ml PBS<sup>2+</sup> mit 10% Glycerol pro 150mm-Zellkulturplatte resuspendiert und bei -80°C tiefgefroren. Vor der weiteren Verwendung dieses nicht aufgereinigten Stammlösungen wurden drei Auftau-Gefrier-Zyklen durchgeführt.

Die erreichbaren Viruskonzentrationen mit dieser Methode liegen etwa im Bereich von  $10^8$ - $10^9$  pfu / ml.

---

---

### **6.2.7 Herstellung von aufgereinigten hochkonzentrierten Virusstammlösungen**

Insbesondere für die Tierversuche wurden hochkonzentrierte Virusstammlösungen benötigt. Die Herstellung aufgereinigter, hochkonzentrierter Virusstammlösungen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Hitt et al (Hitt et al. 1995).

Hierfür wurden 15 bis 30 150mm-Zellkulturplatten mit 293 Zellen bis zu etwa 90%iger Konfluenz kultiviert und zu diesem Zeitpunkt mit einer nicht aufgereinigten Virusstammlösung infiziert. Die Infektion erfolgte wie zuvor beschrieben mit einer MOI von 1 bis 10. Die anschließende Inkubation erfolgte in MEM Earle Medium mit 5% Pferdeserum. Nach Sichtbarwerden des viral bedingten zytopathischen Effekts erfolgt die Abschaben des Zellrasens mittels des Zellschabers. Der optimale Zeitpunkt hierfür ist, wenn sich die Zellen bereits abgerundet, aber noch nicht von der Zellkulturplatte abgelöst haben. Die abgeschabten Zellen wurden mitsamt Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets in einem Gesamtvolumen von 10 bis 20 ml 0,1 M TrisHCl pH 8,0 resuspendiert. Die Virussuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung wurde die Virussuspension aufgetaut und 1/10 Volumen 5% Natrium Deoxycholat zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1/100 Volumen 2M  $\text{MgCl}_2$  und 0,005 Volumen DNase I Lösung. Nach gründlicher Mischung wurde für 30-60 min im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, des weiteren wurde in diesem Zeitpunkt alle 10 min gründlich gemischt.

In der Zwischenzeit wurde ein CsCl-Stufengradient in Beckman Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen bereitet. Hierzu wurden vorsichtig, mittels Pasteurpipetten, die folgenden Lösungen geschichtet: zuunterst 0,5 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,5 g/ml), dann 3 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,35 g/ml) und zuoberst 3 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,25 g/ml).

Nach den oben beschriebenen Schritten wurde die behandelte Virussuspension bei maximaler Geschwindigkeit (4000 rpm) in der Heraeus Varifuge für 20 min bei  $5^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig über den Stufengradienten geschichtet.

Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend in der Ultrazentrifuge mit dem SW41T1-Rotor bei 35000 rpm für 1 h bei  $10^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Adenoviruspartikel mit einer Dichte von 1,34 g/ml sammeln sich in einer Bande in der Grenzschicht zwischen den CsCl-Schichten mit der Dichte 1,35 g/ml und 1,25 g/ml.

Unter strikter Beachtung der Sterilität wurde die Adenovirusbande unter der Sterilbank unter S2-Sicherheitsvorkehrungen mit einer 18G-Kanüle und 2 ml-Spritze abpunktiert und das gesammelte Volumen in ein neues Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend aufgefüllt mit der CsCl-Lösung (Dichte 1,35 g/ml) und in der Ultrazentrifuge bei 35000 rpm übernacht bei  $10^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die hiernach erhaltene Bande wurde abpunktiert und in Dialysekassetten gegen

---

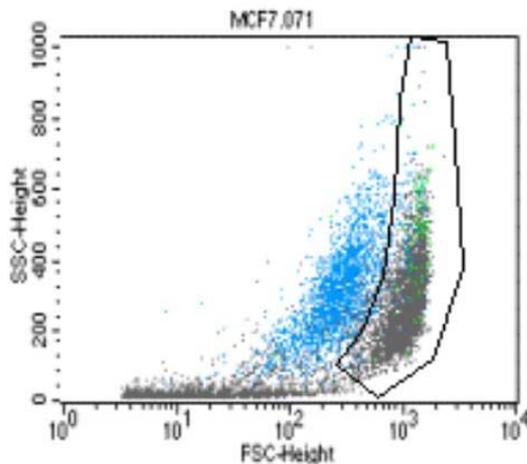
0,01 M TrisHCl dialysiert. Nach 24-stündiger Lyse und wenigstens vier Wechseln des Dialysates wurde die Virussuspension abgezogen, zur Kryoprotektion noch 1/10 Volumen Glycerol hinzugefügt und die Suspension in Kryoröhrchen aliquotiert.. Die gewonnene Virusstammlösung wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die erreichbaren Viruskonzentrationen mit dieser Methode liegen in unserem Labor im Bereich von  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  pfu / ml.

### **6.2.8 Ermittlung der Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien durch Adenoviren**

Zur Ermittlung der Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien durch Adenoviren wurde ein Infektionsversuch mit AdEGFP, einem replikationsdefizienten EGFP-Gen-tragenden Adenovirus, durchgeführt. DU 145, HeLa, MCF-7 und PC-3 Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 60mm-Platte ausgelegt, LNCaP Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 60mm-Platte. Die Infektion erfolgte wie oben beschrieben mit AdEGFP mit MOIs von 0,01 bis 100, abgestuft in Schritten mit dem Faktor 3,16 ( $\approx \sqrt{10}$ ). Nach ca. 24 Stunden Inkubation wurden mikroskopische Photos angefertigt und nach 36 Stunden die EGFP Fluoreszenz mit dem Durchflußzytometer (FACS Vantage, Becton & Dickinson) bestimmt und mit der dazu gehörenden Software (CELLQuest, Becton & Dickinson) analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit der Trypsin/EDTA-Methode geerntet, nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands in FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflußzytometrie die Anteile der EGFP-exprimierenden Zellen bestimmt.

Hierfür wurde folgendes Protokoll angewendet: Eine Hälfte der Zellen wurde in separate FACS-Röhrchen überführt und mit 150 nM Propidiumjodid (= 0,1 mg / ml) für 5 min inkubiert. Propidiumjodid ist ein fluoreszierender DNA bindender Farbstoff mit einer maximalen Exzitationswellenlänge von 536 nm und einer maximalen Emissionswellenlänge von 617 nm; Propidiumjodid färbt spezifisch nekrotische Zellen an – dieses Phänomen beruht auf der Nichtpermeabilität intakter Zellmembranen für den Farbstoff (Crompton et al. 1992; Darzynkiewicz et al. 1992; de Caestecker et al. 1992; Pollice et al. 1992; Belloc et al. 1994). Im FSC:SSC (*forward scatter:siteward scatter*) Plot wurden zunächst die Propidiumjodid gefärbten (toten) Zellen, die auch in der Kontrolle (nicht infizierte Zellen) vorhanden waren, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen (s. Abbildung 13). Das ermittelte Gate wurde für alle Zellen und Infektionen der gleichen Zelllinie verwendet.

---



**Abbildung 13: Durchflusszytometrie - Gate zum Ausschluss der toten Zellen**

Im *siteward:forward scatter* (SSC:FSC) Punktplot ist das Gate eingezeichnet, deren Zellen weiter analysiert wurden im Hinblick auf EGFP Expression. Der Punktplot zeigt nichtinfizierte MCF-7 Zellen, die mit Propidiumjodid inkubiert wurden. Die Propidiumjodid aufnehmenden Zellen sind blau dargestellt und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Man sieht im Gate einige grün dargestellte Punkte, die Zellen entsprechen, die Fluoreszenzlicht im EGFP-Bereich emittieren (FL1, 530 +/- 15 nm); dies entspricht dem Maß an Autofluoreszenz, wie es bei nichtinfizierten Zellen vorliegt. Ähnliche Plots und Gates wurden für die anderen verwendeten Zelllinien ebenfalls angefertigt.

Anschließend wurde das Ausmaß der EGFP-Expression der gegateten Zellen bestimmt. Hierfür wurde die Wellenlänge der von EGFP emittierten Fluoreszenz verwendet. Zellen, deren EGFP-spezifische Fluoreszenz über der Hintergrundfluoreszenz un behandelter Zellen lag, wurden als infiziert bewertet. Die verwendeten Parameter im Durchflusszytometer waren für die Bestimmung der EGFP Fluoreszenz: Exzitation bei 488 +/- 5 nm, Emission bei 530 +/- 15 nm (FL1), für die Bestimmung der Propidiumjodidfluoreszenz: Exzitation bei 488 +/- 5 nm, Emission bei 575 +/- 13 nm (FL2).

Der Anteil der infizierten Zellen wurde ermittelt und eine Regressionsanalyse unter der Annahme des Vorliegens einer hyperbolischen Abhängigkeit des Anteils EGFP-exprimierender Zellen von der verwendeten MOI durchgeführt. Die  $MOI_{50}$  beschreibt diejenige MOI, bei der 50% der Zellen EGFP exprimieren, bzw. infiziert sind (weitere Erläuterungen und Abbildungen s. 7.1).

### 6.2.9 Darstellung des CPE mittels Kristallviolett färbung

Für die Darstellung des zytopathischen Effekts des Virus wurden die verschiedenen Zelllinien wie oben beschrieben infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit Kristallviolett angefärbt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend der Boden der Zellkulturplatte mit Kristallviolettlösung überschichtet. Nach 5 bis 10 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Kristallviolettlösung abgekippt und die Platten gewaschen. Durch die Färbung werden die adhärennten Zellen fixiert und zugleich angefärbt. Die abgelösten Zellen hingegen entsprechen denen, die einen zytopathischen Effekt aufweisen.

### 6.2.10 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Zellproliferationsassay

Für die Quantifizierung der Zellproliferation nach Infektion mit Adenoviren wurden die Zellen wie oben beschrieben infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten ein Zellproliferationsassay durchgeführt (Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche Molecular Biochemicals).

Für die Zeitdauer des Versuchs wurden die Zellen zunächst in 60mm-Zellkulturplatten oder 6-well-Platten kultiviert.

Für die Messung der adhärennten Zellen wurden die Zellen zum Zeitpunkt des Assays mit der Trypsin/EDTA-Methode abgelöst (1 ml Trypsin/EDTA pro Platte) und in 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Für die Messung der adhärennten und nichtadhärennten (abgelösten) Zellen in der Zellkulturplatte wurden die Zellen mit dem Cell Lifter abgeschabt und samt Medium in 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 4 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden serielle Verdünnungen in 96-well-Zellkulturplatten mit dem entsprechenden Medium angefertigt; diese Verdünnungen wurden jeweils in doppelter Ausführung angefertigt. Nach eineinhalb Stunden Inkubation im Zellkulturinkubator wurde der Assay nach den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden folgende Parameter verwendet: Inkubation nach Auslegen der Zellen 1,5 Stunden; Inkubation nach Zugabe des MTT-Substrats 4 Stunden; Inkubation nach Zugabe der Solubilisierungslösung über Nacht, dann Messung bei den angegebenen Wellenlängen, d.h. primäre Messung bei 570 nm und einer Referenzmessung bei 650 nm.

Zunächst wurde aufgrund der ermittelten Absorptionswerte unter Zuhilfenahme von zuvor angefertigten Standardkurven für die verschiedenen Zelllinien die Zellzahl der jeweiligen Platten bestimmt. Für die weitere Darstellung wurden die berechneten Zellzahlen jeder Probe in Beziehung zur Zellzahl der *mock*-Infektion gestellt und als relative Zellkonzentration wiedergegeben:

$$\frac{\text{Zellzahl in der mit Adenovirus infizierten Platte}}{\text{Zellzahl in der mockinfizierten Platte}}$$

---

---

## 6.3 Tierversuch

### 6.3.1 Tierhaltung

Die Versuchstiere (Balb/C Nacktmäuse; Balb/C *nu/nu*) wurden unter SPF-Bedingungen im Tierstall des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung gehalten. Sämtliche Versuche fanden statt im Einklang mit den gesetzlichen Richtlinien und entsprechend dem von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsanträgen Nr. 97/249 und 98/005. Die Versuche wurden durchgeführt unter S2-Sicherheitsvorkehrungen im SPF-Tierstall unter der Sicherheitswerkbank.

### 6.3.2 Tiere

Es wurden ausschließlich Mäuse männlichen Geschlechts verwendet, um bei allen Tieren eine vergleichbare hormonale Umgebung für das Wachstum der heterolog transplantierten humanen Prostatakarzinomzellen zu erreichen, da eine gewisse Androgenabhängigkeit des Wachstums von Prostatakarzinomen besteht (Huggins et al. 1941; Nomura et al. 1996). Die verwendeten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Gewicht von durchschnittlich 30 g.

### 6.3.3 Aufbereitung und Injektion von DU 145 Zellen

Die DU 145 Zellen wurden entsprechend den oben beschriebenen Richtlinien kultiviert und passagiert. Für jede einzelne Injektion wurden  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Eine entsprechende Anzahl von Zellen wurde bis zur Konfluenz kultiviert ( $1-2 \times 10^7$  Zellen pro 150mm-Zellkulturplatte). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst und im entsprechenden Medium (10 ml Dulbecco's MEM Medium mit 10% FBS und 2 mM Glutamin pro ca.  $1 \times 10^7$  Zellen) resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde ermittelt mit der Neubauer-Zählkammer. Das der benötigten Menge Zellen (Anzahl der Injektionen  $\times 5 \times 10^6$  Zellen) entsprechende Volumen wurde überführt in 50 ml-Zentrifugenröhrchen und bei 1200 rpm für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PBS resuspendiert in PBS; hierfür wurden 100  $\mu$ l PBS pro  $5 \times 10^6$  Zellen zugegeben. Die Zellsuspension wurde danach aliquotiert in Volumina je etwa 120  $\mu$ l (100  $\mu$ l PBS + Volumen der Zellen) und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die Injektion der Zellen in Balb/C *nu/nu* Mäuse erfolgte subkutan in die rechte Flanke. Zur Injektionen wurde eine 1 ml-Spritze mit einer 23G-Kanüle verwendet. Die Zellsuspension wurde jeweils unmittel-

---

bar vor der Injektion in der Sterilbank im SPF-Raum des Tierstalls resuspendiert und aufgezogen um ein Sedimentieren im Spritzenzylinder zu verhindern. Für mehrere Tiere wurde jeweils die gleiche Spritze und Kanüle verwendet; vor der Injektion des ersten Tieres wurde ein zusätzliches aliquotiertes Volumen an Zellsuspension aufgezogen und abgelassen, um ein Füllen des Totraums von Spritze und Kanüle zu erreichen. Die Injektionen sind für die Tiere schmerzlos und wurden ohne Anästhesie durchgeführt (Donovan und Brown 1995c).

### **6.3.4 Kontrolle und Messung des Tumorwachstums**

Nach der subkutanen Tumorzellinjektion wurden die Mäuse zweimal wöchentlich auf die Entstehung von Tumoren hin untersucht. Bei Entstehung von Tumoren wurden die Tumoren mit einem Messschieber in zwei Dimensionen gemessen, jeweils der lange und der kurze Durchmesser. Das Tumolvolumen wurde unter der Annahme eines Rotationsellipsoids berechnet:

$$\text{Tumolvolumen} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left( \frac{\text{kurzerDurchmesser}}{2} \right)^2 \times \left( \frac{\text{langerDurchmesser}}{2} \right)$$

Bei einzelnen Mäusen kam es zur Ausbildung von mehr als einem Tumor; hier ist das Tumolvolumen angegeben als Summe der berechneten Volumina der einzelnen Tumoren.

Im Vorversuch wurde zunächst die Wachstumscharakteristik der subkutanen Tumoren ermittelt.

### **6.3.5 Intratumorale Injektion von Adenoviren**

Nach Erreichen eines Tumolvolumens von 100–200  $\mu\text{l}$  (entspricht ungefähr einem mittleren Durchmesser von 6–8 mm) wurden die Tumoren mit  $5 \times 10^8$  pfu in 50  $\mu\text{l}$  PBS injiziert. Zur Injektion wurden verdünnte Virussuspensionen von CsCl-gereinigten Virusstammlösungen der verschiedenen Viren verwendet. Die Injektionen wurden mit einer 30G-Kanüle und einer 1-ml-Spritze durchgeführt. Zur Injektion wurden die Mäuse per Inhalationsnarkose anästhesiert. Zur Inhalationsnarkose wurde eine handelsübliche, für Nagetiere verwendbare Anästhesiemaschine mit halbgeschlossenem Narkosekreislauf der Fa. Dräger verwendet; als Anästhesiegas wurde Isofluran benutzt. Die Mäuse wurden zunächst in eine Ganzkörpernarkosekammer verbracht und dort bis zum Erlöschen der Stellreflexe beobachtet. Nach dem Erlöschen der Stellreflexe wurden die Mäuse aus der Narkosekammer entfernt und die perkutane intratumorale Injektion durchgeführt. Die Zeitdauer bis zum Wiederauftreten erster Bewegungsaktivität betrug 45 bis 60 sec.

---

---

Im späteren Verlauf wurden auch intratumorale Injektionen ohne Anästhesie aber bei manueller Fixierung der Mäuse durchgeführt; dies erwies sich ebenfalls als praktikabel, da die verwendeten Balb/C *nu/nu* Mäuse eine sehr geringe Aggressivität zeigten.

Es wurden in den verschiedenen Tierversuchen unterschiedliche Injektionsschemata verwendet. Die detaillierten Schemata sind im Resultateteil angegeben.

### ***6.3.6 Opferung / Blutabnahme / Dissektion der Balb/C *nu/nu* Mäuse***

In dem Falle, in dem keine Blutabnahme der Versuchstiere notwendig war, erfolgte die Opferung mittels CO<sub>2</sub> (Donovan und Brown 1995b). Danach wurden die Mäuse disseziert und eine Entnahme von Tumor, Leber und bei einigen Tieren von der Milz durchgeführt. Die Tiere in der Langzeituntersuchung wurden geopfert bei Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von rund 12 mm; dieses entspricht etwa einem Tumolvolumen von 800 bis 1000 µl, bei sehr rascher Größenzunahme der Tumoren und Exulzeration oder bei Verhaltensänderung, die mutmaßlich auf das Tumorwachstum zurückzuführen waren, z.B. bei intramuskulärem Wachstum der Tumoren.

In den ersten Versuchen wurde zur Bestimmung der Plasma-hIL-2-Spiegel eine Blutentnahme aus der Schwanzvene der Mäuse durchgeführt (Donovan und Brown 1995a). Hierzu wurden die Mäuse zunächst für einige Minuten unter einer Infrarotwärmelampe gehalten, um eine periphere Vasodilatation zu erreichen und somit eine bessere Ausbeute bei der Blutabnahme. Nach Einbringung der Mäuse in einen angefertigten Container wurde eine Schwanzvene mit einer 23G-Kanüle punktiert und die austretenden Blutropfen mit einer heparinisierten Pipette aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde das gewonnene Blut zentrifugiert und das Plasma separiert. Das Plasma wurde zur weiteren Verarbeitung und Bestimmung der hIL-2-Konzentration verwendet. Das erzielte Gesamtvolumen bei dieser Art der Blutabnahme betrug jedoch meist weniger als 50 µl, das Plasmavolumen somit weniger als 25 µl; hinzu kam eine oft sehr starke Hämolyse, was die Durchführung des hIL-2-ELISAs unmöglich machte (Mannheim 1997).

Im weiteren Verlauf wurde eine Blutabnahme aus der V. saphena der Mäuse durchgeführt (Hem und Smith 2000). Das erzielte Volumen ließ sich auf bis zu 100 µl steigern, jedoch auch häufig in Verbindung mit einer ausgeprägten Hämolyse.

Aufgrund der Unzuverlässigkeit der beiden oben beschriebenen Blutentnahmeverfahren wurde schließlich eine terminale Blutentnahme bei einigen der Versuchstiere durchgeführt, um eine verlässliche Messung des Plasma-hIL-2-Spiegels zu erlauben. Hierzu wurden die Mäuse mit einer Dreifach-Kombination von Anästhetikum/Analgetikum/Sedativum anästhesiert. Eine Kombination von Medetomidin (Dormitor<sup>®</sup>) 0,5 mg/kg Körpergewicht, Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>) 5 mg/kg Körpergewicht und Fentanyl (Fenta-

---

nyl-ratiopharm<sup>®</sup>) 0,05 mg/kg Körpergewicht wurde intraperitoneal injiziert. Nach einigen Minuten und nach Erlöschen der Schmerzreflexe wurde perkutan subxiphoidal mit einer heparinisierten 23G-Kanüle und 1-ml-Spritze intrakardial Blut abgenommen (Donovan und Brown 1995a). Die erzielten Blutvolumina betragen etwa 1 ml, was etwa 50% des Gesamtblutvolumens einer Maus mit einem Körpergewicht von 30 g entspricht. Nach der Blutabnahme wurden die Mäuse human getötet (Donovan und Brown 1995b).

### ***6.3.7 Verarbeitung der entnommenen Tumore und Organe***

Nach Tötung und Dissektion der Mäuse wurden die Tumoren und Organe in mit Einbettmedium für Gefrierschnitte gefüllte aus Aluminiumfolie hergestellte Behältnisse überführt und nochmals mit Einbettmedium überschichtet. Die Behältnisse wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### ***6.3.8 Bestimmung der humanen Interleukin-2-Konzentration***

Für die Bestimmung der humanen Interleukin-2-Konzentration in Blutplasma oder Zellkulturüberständen wurden kommerzielle hIL-2-ELISA Kits entweder von Roche Molecular Biochemicals oder von PharMingen verwendet. Die Bestimmungen erfolgten nach den Anweisungen der Hersteller; die Messung und Auswertung erfolgte mit dem Biolumin 960 Photometer und der Biolumin-Software.

## **6.4 Immunhistochemie**

Mit dem Kryostat wurden 5 bis 6  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte der eingefrorenen Tumoren angefertigt und jeweils einzeln auf Objektträger aufgebracht. Als optimale Bedingungen für die Anfertigung der Schnitte erwies sich eine Box-Temperatur von  $-25^{\circ}\text{C}$  und eine Objekttemperatur von  $-23^{\circ}$  bis  $-26^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Schnitte für 3 bis 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgte die Fixierung mittels Aceton bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie entweder sofort weiterverwendet, s. unten, oder aber bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Das weitere Protokoll folgt im wesentlichen den Anweisungen von DAKO, Hamburg (DAKO). Vor dem weiteren Bearbeiten wurde das auf dem Objektträger befindliche Gewebe mit dem PAP PEN eng ummalt, um eine wasserabweisende Barriere um das Gewebe herum zu schaffen und in den folgenden Schritten Antikörperlösungen und Nachweisreagenzien sparen zu können. Danach erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte im Waschpuffer für 1 h. Von jetzt an wurden die Präparate ständig feucht gehalten.

---

---

ten, um eine artifizielle Veränderung der Präparate zu verhindern. Nach der Rehydrierung wurde der Primäantikörper aufgebracht, d.h. entweder der monoklonale anti-Adenoantikörper (MAb 805, Chemicon, USA), der monoklonale anti-IL-2-Antikörper (DPC-Biermann) oder der monoklonale anti-Asialogangliosid GM1-Antikörper (BP281, DPC-Biermann). Zur Verdünnung des Antikörpers wurde 0,05M Tris/HCl pH 7,6 mit 1% BSA benutzt. Die Überschichtung erfolgte gerade so weit, dass das gesamte Präparat bedeckt war, ungefähr 100 µl pro Objektträger. Im Falle des anti-Adenovirus-Antikörpers wurde eine Verdünnung von 1:200 der Ausgangslösung verwendet. Im Falle des anti-hIL-2-Antikörpers und des anti-Gangliosid-GM1 (anti-NK-Zell-Antikörper) wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:200 ausgetestet. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C wurde die Überschichtung vorsichtig mit Waschpufferlösung abgespült, ohne den Strahl direkt auf das Gewebe zu richten, mit ca. 10 ml pro Objektträger. Zur kurzfristigen Zwischenlagerung wurden die Objektträger in einem Bad mit Waschpufferlösung (Küvette) gelagert, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Die überschüssige Waschpufferlösung wurde abgeklopft und die Objektträger um das Präparat herum – unter Schonung der wasserabweisenden Barriere - abgewischt. Anschließend wurde das Präparat mit DAKO EnVision™ System Labelled Polymer überschichtet, wiederum dergestalt, dass das gesamte Präparat gerade bedeckt war. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Präparat mit Waschpufferlösung vorsichtig abgespült. Danach wurden die Objektträger vorsichtig abgeklopft und abgewischt und mit Substrat-Chromogen-Lösung (Fast Red), die zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität noch zusätzlich Levamisol enthält, überschichtet, ausreichend, um das Präparat vollständig zu bedecken. Zu beachten war, dass die Substrat-Chromogen-Lösung höchstens 1 h vor Verwendung zuzubereiten war. Die folgende Inkubationsphase betrug hiernach 5 bis 10 min. Anschließend erfolgte erneut ein vorsichtiges Abspülen der Objektträger mit ddH<sub>2</sub>O, unter Beachtung der Gefahrstoffentsorgung (Fast Red ist potentiell kanzerogen). Anschließend wurden die Objektträger in ein Bad wässriger Hämatoxylin-Lösung überbracht und für 3 min inkubiert. Danach wurden die Objektträger in ein Bad mit Leitungswasser verbracht und mehrere Male das Wasser ausgetauscht bis zum Klaren des Wassers. Nach ca. 15minütiger weiterer Inkubation im Leitungswasserbad wurden die Präparate mit Deckgläsern bedeckt. Als Medium wurde wasserlösliches Aqua-Poly/Mount Medium verwendet.

## **6.5 Molekularbiologische Arbeiten**

### ***6.5.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse und CsCl -Gradienten-Zentrifugation***

Für die Herstellung von Adenoviren durch Kotransfektion in 293 Zellen und für große Plasmide war die Präparation von Plasmiden mittels alkalischer Lyse und CsCl-Gradientenzentrifugation notwendig. Das Verfahren ist modifiziert nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979; Birnboim 1983).

Hierfür wurden 500 ml Medium mit den transformierten Bakterien inokuliert und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 40 ml Lysozymlösung gründlich resuspendiert; es folgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Dann wurde 80 ml alkalischer SDS-Lösung zugegeben und durch Schwenken gemischt, um eine alkalische Lyse zu erreichen; danach folgte eine Inkubation für 5 min bis maximal 10 min auf Eis. Danach wurde 60 ml 3M Kaliumacetat-Lösung zugegeben und eine gründliche Mischung durchgeführt und hernach für 15-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml Aqua bidest. und eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 min. Aus dem Überstand wurde partikuläres Material durch Filterung durch Gaze entfernt und anschließend überführt in eine neue 500 ml Zentrifugenflasche. Dann Zugabe von 100 ml Isopropanol und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur; in diesem Schritt sollte die DNA deutlich sichtbar präzipitieren. Im Anschluss Zentrifugation 10000 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet; hierfür sind etwa 30 min notwendig. Das Pellet wurde in insgesamt 8 ml 0,1 x SSC resuspendiert. Danach Zugabe von 8 g CsCl in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen und komplette Lösung mit dem zuvor erhaltenen Produkt; Inkubation für 30 min auf Eis – dies führt zu einer Präzipitation von verbliebener RNA und Proteinen. Zentrifugation 3800 rpm für 15 min (Heraeus Varifuge), vorsichtiges Sammeln des Überstands und Überführung in ein Opti Seal Zentrifugenröhrchen (Beckman) mit 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Versiegeln des Zentrifugenröhrchens und Zentrifugation 55000 rpm für 10-14 Stunden bei 14°C (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Ti80-Rotor, Beckman). Die (untere) Plasmidbande wurde unter UV-Licht visualisiert und mittels 18G-Kanüle und 2ml-Spritze aus dem Zentrifugenröhrchen abgezogen; hierbei musste strikt darauf geachtet werden, nicht die oberen Banden mitzunehmen, die chromosomale und relaxierter Plasmid-DNA darstellten. Hierauf folgte die Extraktion von Ethidiumbromid mittels CsCl-gesättigtem Isopropanol. Danach Zugabe von 3 Volumina TE-Puffer und Präzipitation der DNA mit 8 Volumina kaltem 100% Ethanol. Zentrifugation 4000 rpm für 30 min (Heraeus Varifuge). Einmal Waschen mit 5 ml 100% Ethanol und zweimaliges Waschen mit 70% Ethanol (jeweils Zentrifugation 4000 rpm für 5 min); Trocknen bei Raumtemperatur.

Das Pellet wurde gelöst in 200-500 µl 0,1 x SSC, in Abhängigkeit von der Größe des Pellets. Anschließend Lagerung bei +4 bis +8°C.

## 6.6 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Versuche wurde SPSS, Version 11.0.1 für Windows, verwendet.

---

Für die Evaluierung statistischer Unterschiede hinsichtlich der Plasma-IL-2 Spiegel zwischen den mit verschiedenen Adenoviren injizierten Mäuse wurde der zweiseitige T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Ermittlung der mittleren Überlebenszeiten der Mäuse nach intratumoraler Injektion wurde eine Kaplan-Meier Analyse durchgeführt. Die Ermittlung, ob signifikante Unterschiede Vorlagen hinsichtlich des Tumorwachstums zwischen verschiedenen Gruppen vorlagen, wurde mit dem One-Way ANOVA-Test durchgeführt (bei Vorliegen normalverteilter Daten), bzw. mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis H Test (bei Vorliegen nicht-normalverteilter Daten). Bei Vorliegen signifikanter Unterschiede wurde eine post hoc Analyse zur Ermittlung der Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen mittels der Methode der kleinsten signifikanten Differenzen durchgeführt.

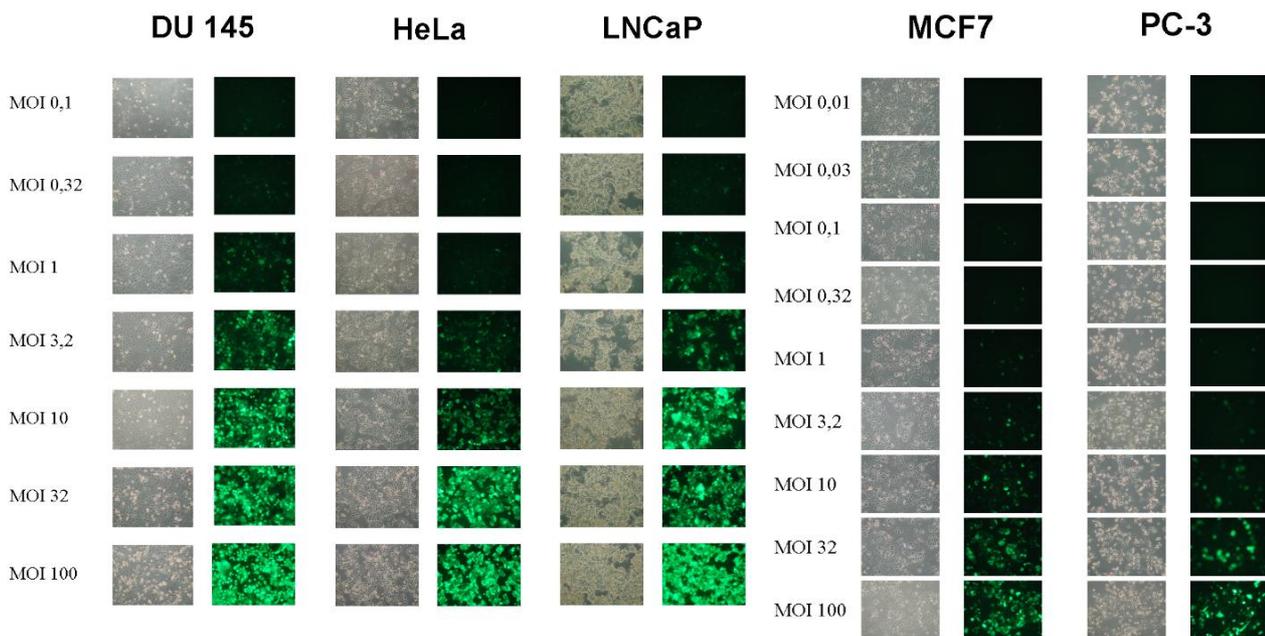
Für die Darstellung von Standardabweichung und Standardfehlern des Mittelwertes verschiedener Versuchsreihen wurde die integrierte Kalkulationsfunktion von Sigma Plot, Version 8.0 für Windows, verwendet.

---

## 7 ERGEBNISSE

### 7.1 Unterschiedliche Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit Adenoviren

Es war zunächst wichtig, zu ermitteln, ob und in welchem Maße sich die Infizierbarkeit der verwendeten Zelllinien unterscheidet. Hierzu wurde neben den in dieser Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien, DU145, LNCaP und PC-3, auch eine bekanntermaßen sehr gut zu infizierende Zelllinie, HeLa, verwendet (Smith et al. 1956), außerdem eine relativ schlecht zu infizierende Zelllinie, MCF-7 (Garcia-Sanchez et al. 1998). Bei allen Zelllinien zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Proportion der infizierten Zellen und der verwendeten MOI, außerdem eine Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzaktivität und verwendeter MOI. Dieses war sowohl aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (s. Abbildung 14), als auch aufgrund der ermittelten durchflußzytometrischen Daten ersichtlich (s. Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17 und Tabelle 2).

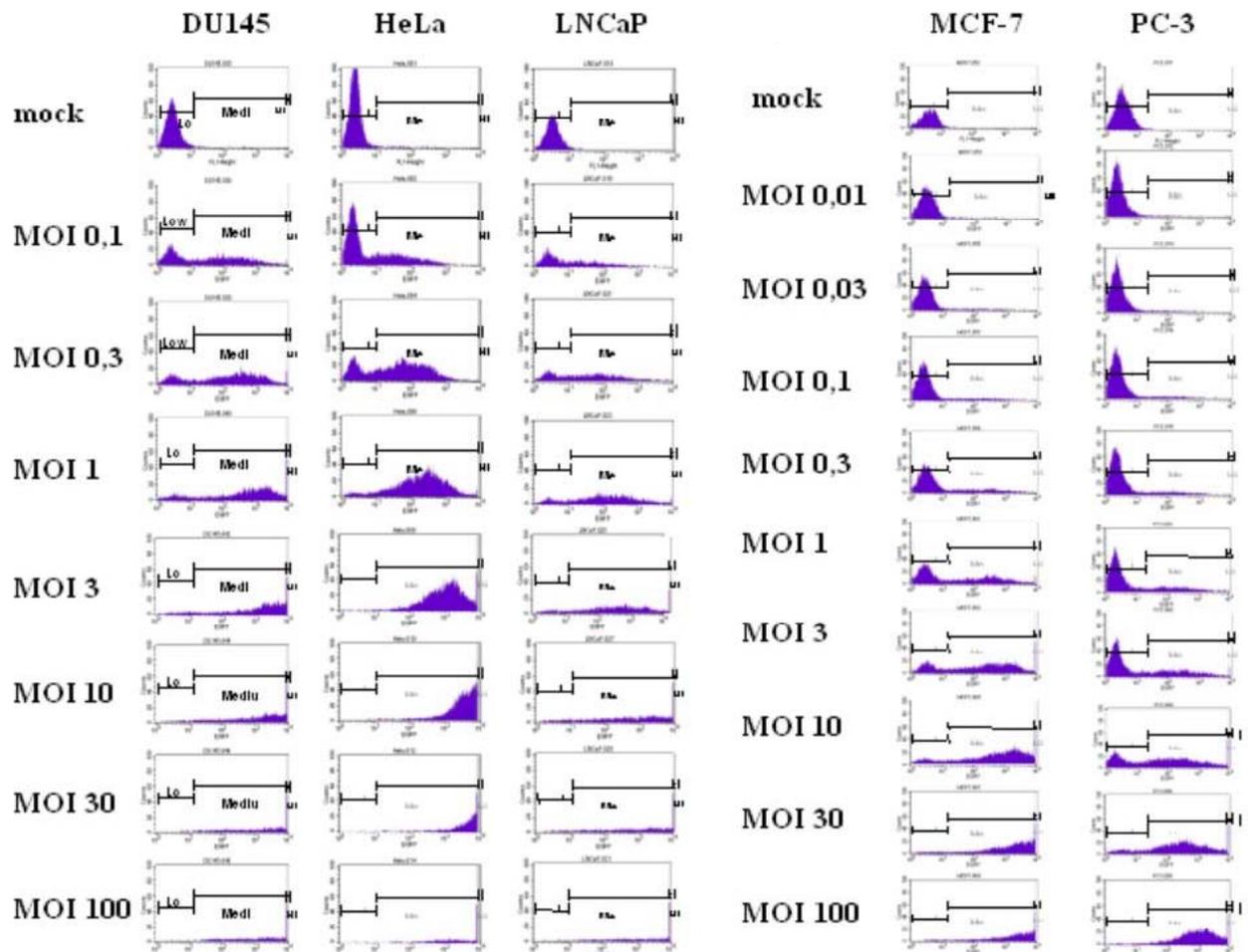


**Abbildung 14: Die Transduktionsrate und –intensität ist abhängig von der MOI - Fluoreszenzmikroskopie**

Die oben bezeichneten Zellen wurden mit AdEGFP mit der angegebenen MOI infiziert. Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP. Dargestellt sind die einander entsprechenden Gesichtsfelder mit dem Phasenkontrast- (links) und mit dem Fluoreszenzmikroskop (rechts) (Vergrößerung ca. 120x).

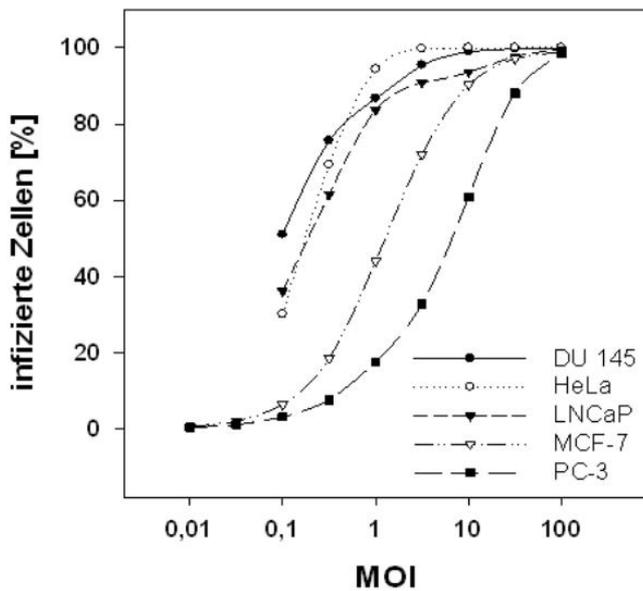
In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, dass es zunächst, in Abhängigkeit von der angewandten MOI, zu einer Zunahme der Proportion der EGFP-exprimierenden Zellen kam; insbesondere bei hohen MOIs aber auch zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität der einzelnen infizierten Zellen. Der gleiche Effekt wurde auch in den dargestellten durchflußzytometrischen Plots in der

Histogrammdarstellung deutlich: zunächst kam es bei allen verwendeten Zellen zu einer Zunahme der Zellen mit einer hauptsächlichen Fluoreszenzintensität im mittleren Intensitätsbereich, bei hohen MOIs verschob sich der die mittlere Intensität immer weiter in hohe Intensitätsbereiche (s. Abbildung 15).



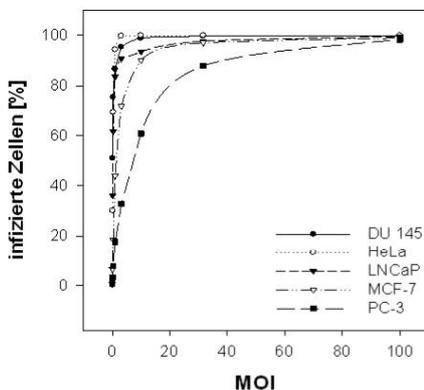
**Abbildung 15: Die Transduktionsrate und –intensität ist abhängig von der MOI - Durchflusszytometrie**

Verschiedene Zelllinien wurden mit AdEGFP infiziert und 36 h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung stellt die Verstärkung der EGFP-Fluoreszenz Aktivität von infizierten DU145, HeLa, LNCaP; MCF-7 und PC-3 Zellen in Abhängigkeit von der MOI dar. Die Zellen im niedrigen Intensitätsbereich entsprechen den Zellen, die ohne Infektion und somit ohne Expression von EGFP eine geringe Autofluoreszenz aufweisen. Sowohl der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen, als auch die EGFP-Fluoreszenzaktivität nimmt mit zunehmender MOI zu.



**Abbildung 16: Unterschiedliche Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien – Graphische Darstellung**

Die Datenpunkte der einzelnen Graphen wurden aus den Daten der Durchflußzytometrie bestimmt (s. Abbildung) und stellen den Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen dar.



**Abbildung 17: Berechnung der MOI<sub>50</sub> und MOI<sub>75</sub>**

Ähnlich der vorherigen Abbildung erfolgt wieder die Auftragung der Anteile der infizierten Zellen gegen die verwendete MOI, jedoch handelt es sich um nichtlogarithmische Achseneinteilungen. Zur Regressionsanalyse wurde eine einfache hyperbolische Annäherung ( $f(x) = \frac{ax}{b+x}$ ) gewählt, deren Parameter in Tabelle 3 dargelegt sind

Die Abhängigkeit des Anteils infizierter, d.h. EGFP-exprimierender Zellen ist in Abbildung 16 dargestellt. Insbesondere bei den Zelllinien DU145, HeLa und LNCaP kam es bei geringen MOIs zu einer Infektion eines großen Teils der Zellen. So war im Falle der DU145 Zelllinie z.B. oberhalb einer MOI von 3 keine weitere Zunahme des Anteils infizierter Zellen zu erwarten; bei Erhöhung der MOI kam es lediglich zu einer Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität der infizierten Zellen (s. oben und Abbildung 15); bei den anderen Zelllinien lag dieser Schwellenwert höher. Zur Quantifizierung der Infizierbarkeit wurde jeweils die MOI<sub>50</sub> und die MOI<sub>75</sub> als diejenige MOI berechnet, bei der 50%, bzw. 75% der Zellen infiziert sind, gemessen an der über

dem definierten Limit liegenden EGFP-spezifischen Fluoreszenzemission. Zur Berechnung wurde eine hyperbole Abhängigkeit von MOI und Proportion infizierter Zellen angenommen und eine Regressionsanalyse der Daten mittels Sigma-Plot Version 8.0 durchgeführt (s. Abbildung 17):

$$\text{Proportion infizierter Zellen} = \frac{a \times \text{MOI}}{b + \text{MOI}} [\%]$$

	DU 145	HeLa	LNCaP	MCF-7	PC-3
<b>a</b>	98,95	103,20	97,46	101,20	104,90
<b>b</b>	0,10	0,18	0,18	1,31	6,62
<b>MOI 50</b>	<b>0,10</b>	<b>0,17</b>	<b>0,19</b>	<b>1,28</b>	<b>6,03</b>
<b>MOI 75</b>	<b>0,31</b>	<b>0,47</b>	<b>0,59</b>	<b>3,75</b>	<b>16,62</b>

**Tabelle 2: Starke Variation der MOI<sub>50</sub> und MOI<sub>75</sub> der verschiedenen Zelllinien**

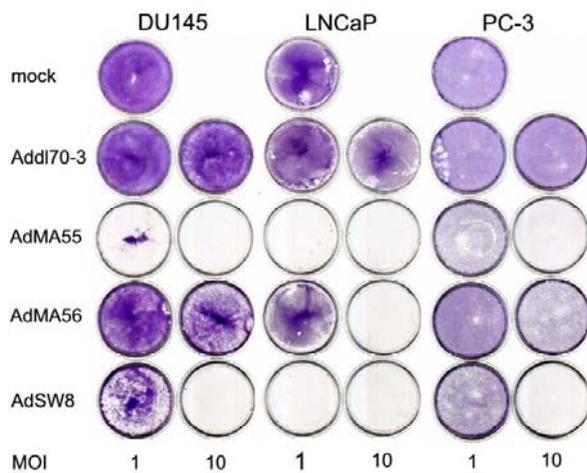
Aus den berechneten Parametern für die hyperbolische Regressionsfunktion errechnen sich die dargestellten Werte für die MOI<sub>50</sub>, bzw. MOI<sub>75</sub>, d.h. die MOI, bei der 50% bzw. 75% der Zellen transduziert sind. a und b wurden aus Abbildung 16 berechnet (Proportion infizierter Zellen = (a x MOI) / (b + MOI)).

Die am besten infizierbaren Zellen, gemessen an der niedrigsten MOI<sub>50</sub> waren DU145 Prostatakarzinom- und HeLa Zervixadenokarzinomzellen, mit einer MOI<sub>50</sub> von 0,10, bzw. 0,17. Die Infizierbarkeit der am schlechtesten infizierbaren Zellen MCF7 und PC-3 lag mit einer MOI<sub>50</sub> von 1,28, bzw. 6,03, um den Faktor 12 bis 60 darunter (s. Tabelle 2).

## 7.2 Ausgeprägter zytopathischer Effekt von replizierenden Adenoviren

### 7.2.1 Darstellung mittels Kristallviolett-färbung

Die verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien wurden infiziert mit den verschiedenen verwendeten Viren, Add170-3, AdMA55, AdMA56, AdSW8 und mock. Add170-3 und AdMA56 sind nichtreplizierende Adenoviren der ersten Generation, mit Deletion der E1 und E3 Region; AdMA56 enthält zusätzlich die IL-2 Expressionskassette in der E1 Region. AdMA55 und AdSW8 sind replikationskompetente Adenoviren mit einer Deletion des E1B55K-Gens und einer Deletion der E3 Region; AdMA55 enthält zusätzlich eine IL-2 Expressionskassette in der E3 Region (nähere Erläuterungen s. 6.2.1). Die Infektionen wurden nach Standardprotokoll durchgeführt in 60mm-Zellkulturplatten. Die Infektion wurde in einer Versuchsreihe durchgeführt mit verschiedenen MOIs im Bereich von 1 bis 10 und mit einer Kristallviolett-färbung der adhären Zellen am Tag 3 nach Infektion, um den zytopathischen Effekt bei unterschiedlichen MOIs zu zeigen. Trotz der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber einer adenoviralen Infektion wurden die gleichen MOIs für die verschiedenen Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in einer relativ geringen Dichte ausgelegt, 2 x 10<sup>5</sup> DU145 und PC-3 Zellen und 1 x 10<sup>6</sup> LNCaP Zellen, und mit dem entsprechenden Medium mit 10% FCS inkubiert; dieses entspricht einem Modell, bei dem ein Großteil der Zellen proliferiert. Für die Infektion wurden zunächst nicht aufgereinigte Virusstammlösungen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die replizierenden Adenoviren, AdMA55 und AdSW8 in allen drei verwendeten Prostatakarzinomzelllinien einen deutlichen zytopathischen Effekt erzeugten, wobei der Effekt am deutlichsten sichtbar war bei LNCaP Zellen, am geringsten bei PC-3 Zellen. Bei der Verwendung einer MOI von 10 kam es auch nach Infektion mit nichtreplizierenden Viren, Add170-3 und AdMA56 zu einem geringen zytopathischen Effekt (s. Abbildung 18).



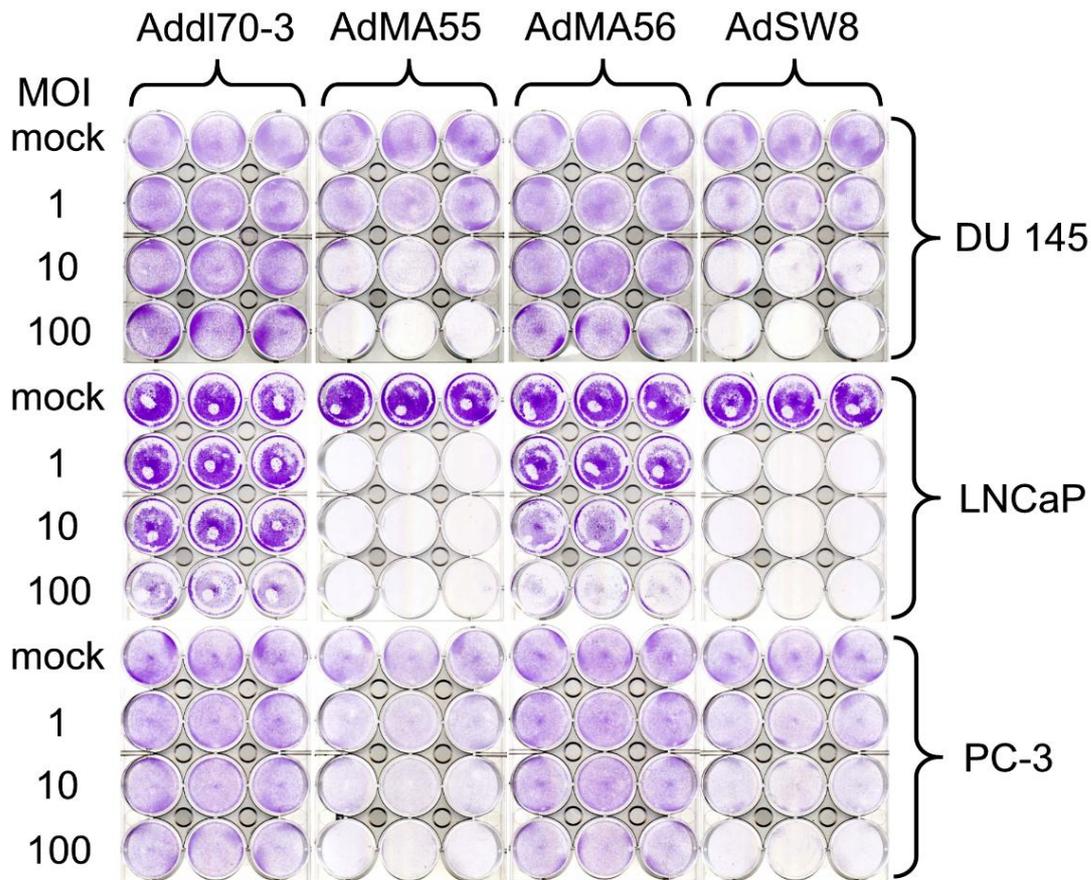
**Abbildung 18: Deutlicher zytopathischer Effekt von replizierenden Adenoviren - Kristallviolettgefärbung**

$2 \times 10^5$  (DU145 und PC-3), bzw.  $1 \times 10^6$  (LNCaP) Zellen wurden in 60mm-Zellkulturplatten mit den verschiedenen Viren mit der angegebenen MOI infiziert. Zur Infektion wurden nichtaufgereinigte Virusstammlösungen verwendet. An Tag 6 nach Infektion wurde eine Kristallviolettgefärbung durchgeführt.

durchgeführt mit CsCl-aufgereinigte Virusstammlösungen und MOIs im Bereich von 1 bis 100, als Negativkontrolle wieder mit *mock* Infektion. Auch hier kann ein deutlicher zytopathischer Effekt der replizierenden Viren, AdMA55 und AdSW8, nachgewiesen werden, jedoch schien der Effekt geringfügig in den Bereich höherer MOIs verlagert zu sein, so ist z.B. bei einer MOI von 1 bei DU145 Zellen nur ein geringer Effekt sichtbar, im Vergleich zum zuvor geschilderten Experiment. Des Weiteren wurde wieder deutlich, dass die LNCaP Zelllinie am empfindlichsten ist, was die Ablösung von Zellen von der Zellkulturplatte angeht; auch die nichtreplizierenden Adenoviren, Addl70-3 und AdMA56, erzeugen bei hohen MOIs einen zytopathischen Effekt (s. Abbildung 19).

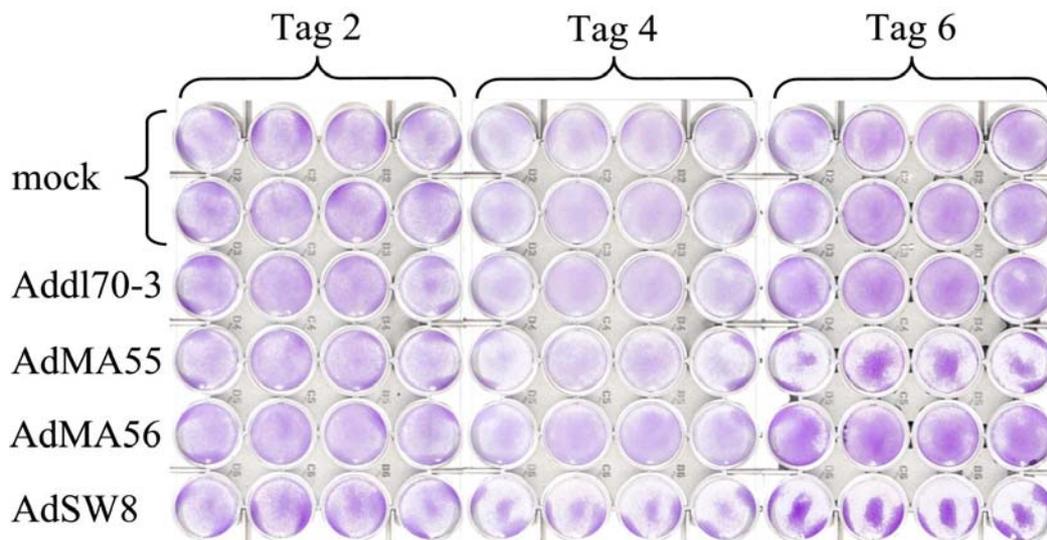
In beiden Versuchsansätzen wurden die zytopathischen Effekte sichtbar; hierbei waren diejenigen der beiden E1B55K-deletierten Viren AdMA55 (mit IL-2) und AdSW8 (ohne IL-2) vergleichbar, während die nichtreplizierenden Viren Addl70-3 und AdMA56 nur im hohen Dosisbereich (hohe MOI) einen zytopathischen Effekt erzeugten. Der zytopathische Effekt der replizierenden Adenoviren war eindeutig abhängig von der verwendeten MOI.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die Zellen in 12-well-Platten ausgelegt, mit einer deutlich höheren Ausgangszelldichte von  $2 \times 10^5$  DU145 und PC-3 Zellen und  $1 \times 10^6$  LNCaP Zellen pro well einer 12-well-Platte. Dies entspricht einem subkonfluenten Zellrasen. Ferner wurden die Zellen infiziert mit entsprechendem Medium und 0,5% FCS und Penicillin/Streptomycin inkubiert. Hierdurch befindet sich ein geringerer Teil der Zellen in Proliferation und auch sind die Zellen enger aneinander anliegend (Freshney 1987); dieses entspricht möglicherweise eher der Simulation der Situation innerhalb eines malignen Tumors (s. auch 8.4.1). Die Infektion wurde



**Abbildung 19: Abhängigkeit des zytopathischen Effekts von der verwendeten MOI**

$2 \times 10^5$  Zellen (DU145 und PC-3), bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen (LNCaP) wurden in 12-well-Zellkulturplatten mit den verschiedenen Viren mit der angegebenen MOI oder mock infiziert. Zur Infektion wurden CsCl-aufgereinigte Virusstammlösungen verwendet. An Tag 3 nach Infektion wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt.



**Abbildung 20: Zytopathischer Effekt nach Infektion mit niedrigen MOIs setzt zwischen Tag 4 und 6 ein**

$1 \times 10^5$  DU145 Zellen wurden in 24-well-Platten mit den verschiedenen Viren mit einer MOI von 1 oder mock infiziert. Zur Infektion wurden CsCl-aufgereinigte Virusstammlösungen verwendet. An Tag 2, 4 und 6 wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt.

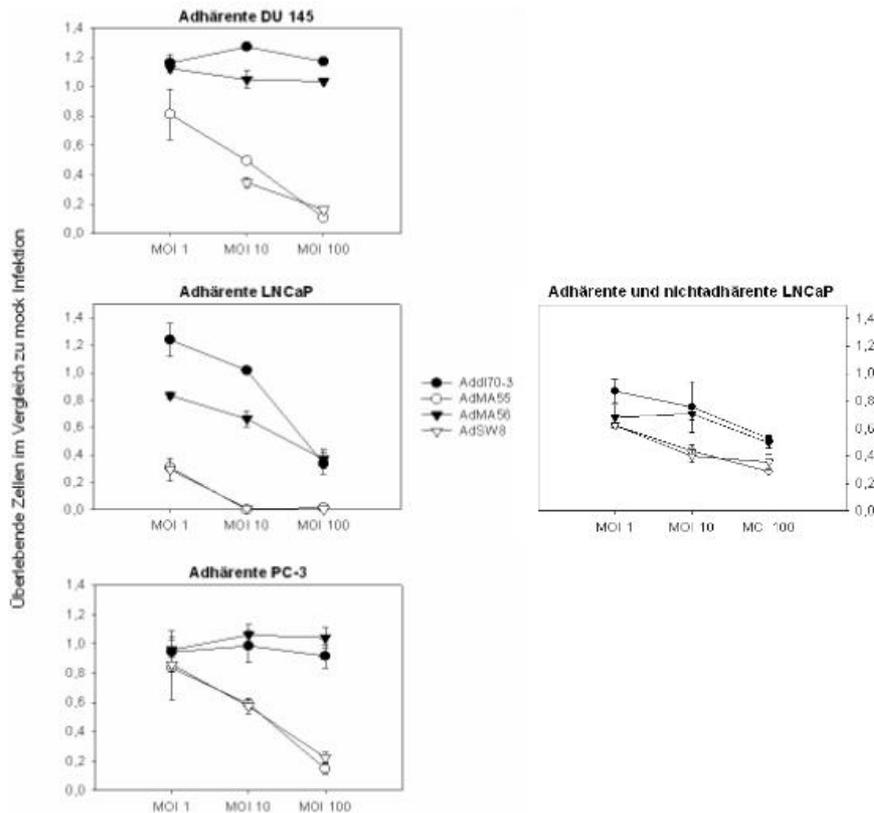
Um den Zeitverlauf des zytopathischen Effektes zu evaluieren, wurden DU145 mit verschiedenen Viren mit einer MOI von 1 oder mock infiziert. Die Zellen wurden ausgelegt mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro well einer 24-well-Platte und mit Medium und 0,5% FCS und Penicillin/Streptomycin inkubiert. Dies entspricht wieder einem nahezu konfluenten Monolayer. Der Beginn des zytopathischen Effektes der replizierenden Viren bei MOI 1 war bei DU145 Zellen zwischen Tag 4 und Tag 6 zu beziffern, während an Tag 2 praktisch kein zytopathischer Effekt nachweisbar war (s. Abbildung 20).

### **7.2.2 Darstellung mittels MTT Assay**

Um die mit der Kristallviolett-färbung erhobenen Befunde zu quantifizieren, wurden Zellproliferationsassays nach der MTT-Methode durchgeführt. Die Infektionen wurden nach Standardprotokoll äquivalent zu den mit der Kristallviolett-färbung durchgeführten Versuchen durchgeführt. Für die Infektionen wurden CsCl-aufgereinigte Virusstammlösungen verwendet. Die Zellen wurden zu den spezifizierten Zeitpunkten mittels der Trypsin/EDTA-Methode oder mittels Zellschaber geerntet, in Verdünnungsreihen auf 96-well-Zellkulturplatten aufgebracht und nach dem Protokoll des Herstellers ein Zellproliferationsassay (Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche; Mannheim) durchgeführt. Für die Auswertung wurden Standardkurven der verschiedenen Zelllinien angefertigt (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deckten sich weitgehend mit denen der aus den Kristallviolett-färbungsexperimenten.

---



**Abbildung 21: MTT Assay zeigt zytopathischen Effekt in Abhängigkeit von verwendeter MOI**

Die entsprechenden Zelllinien wurden infiziert mit den angegebenen Viren und den angegebenen MOIs. Drei Tage nach Infektion wurde ein MTT Assay nur der adhären (links) oder der adhären und nichtadhären Zellen (rechts) durchgeführt (Beschreibung im Text). Die Darstellung erfolgt als Anteil im Vergleich zu den *mock*-infizierten Zellen. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert von zwei separaten Infektionen mit der Standardabweichung.

Zahl der lebenden Zellen in *mock*-infizierten Wells und angegeben als Verhältnis (1 entspricht einer gleichen Anzahl von Zellen im infizierten Well und im *mock*-infizierten Well) (s. Abbildung 21).

Das angegebene Verhältnis ist somit ein Maß für den zytopathischen Effekt des Virus. Im Falle der Verwendung von replizierenden Adenoviren, stand die Zahl der überlebenden metabolisch aktiven Zellen in inverser Relation zu den verwendeten MOIs. Bei allen drei Zelllinien zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zahl der lebenden Zellen pro well nach Infektion mit AdMA55 und AdSW8, wiederum am stärksten ausgeprägt bei Verwendung von LNCaP Zellen; hier waren nach Infektion mit AdMA55 und AdSW8 bei einer MOI von 1 nur ca. 30% der Zellen adhären und lebend, bei höheren MOIs gar keine mehr. Dieser Effekt war geringer ausgeprägt bei DU145 und PC-3 Zellen; bei DU145 Zellen waren nach Infektion mit AdMA55 und AdSW8 bei einer MOI von 1, 10 und 100 noch ca. 80%, 40%, bzw. 10% der Zellen adhären und lebend, bei PC-3 Zellen noch ca. 80%, 50% und 20%.

Die Zahl der überlebenden Zellen bei der Verwendung von nichtreplizierenden Viren unterschied sich im Falle der Verwendung von DU145 und PC-3 Zellen nicht signifikant von der bei *mock*-Infektion, während bei der Verwendung von LNCaP Zellen im hohen MOI Bereich auch nach Infektion mit

Im ersten Versuchsansatz wurden die Zellen in 6-well-Platten mit verschiedenen MOIs im Bereich von 1 bis 100 infiziert. Die Zellen wurden hierfür in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen (DU145 und PC-3) und  $1 \times 10^6$  Zellen (LNCaP) pro Well einer 6 well Platte ausgelegt und mit entsprechendem Medium mit 10% FCS inkubiert. Für die Auswertung wurde mittels der erhobenen Standardkurven die Zahl der lebenden Zellen pro well ermittelt. Die Zahl der lebenden Zellen in den mit Adenovirus infizierten Wells wurde in Beziehung gesetzt zur

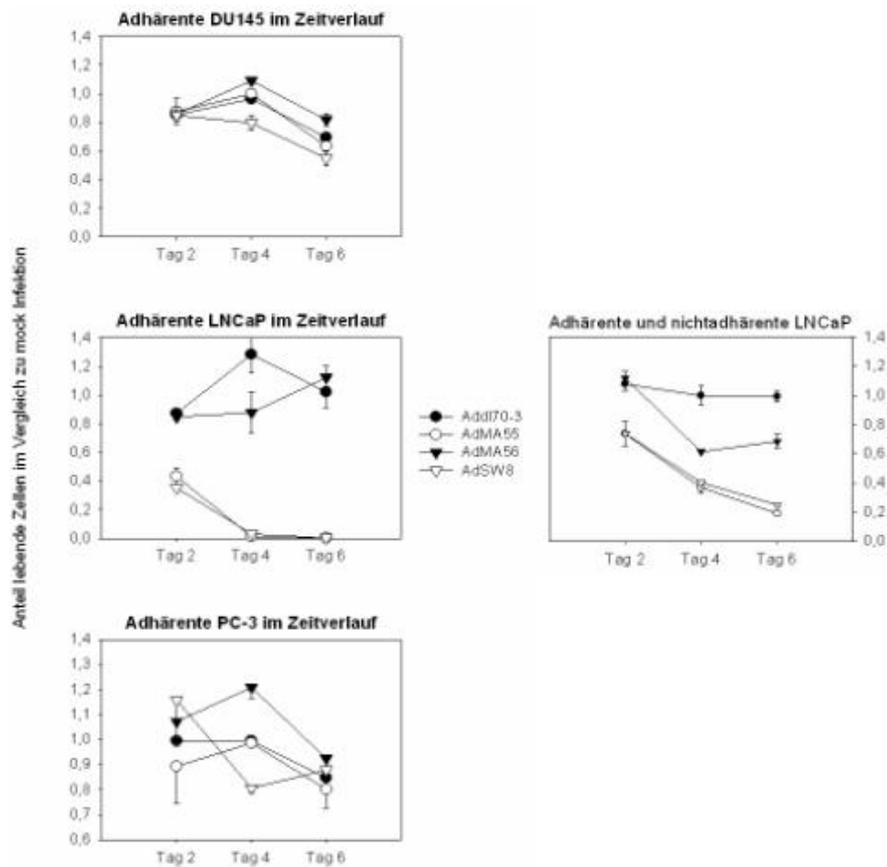
Add170-3 und AdMA56 eine Abnahme der adhärennten Zellen eintrat; so befanden sich bei einer MOI von 100 im Vergleich zur mock Infektion nur jeweils 40% der Zellen auf der Zellkulturplatte.

Besonders bei LNCaP-Zellen wurde ein anderer Effekt sichtbar; bei höheren MOIs kam es zum Ablösen des Zellmonolayers, so dass nur eine geringe Anzahl von Zellen adhärennt blieb. Die abgelösten Zellen waren jedoch noch metabolisch aktiv und lebend; dies ließ sich zeigen durch den Unterschied der metabolischen Aktivität, und damit der Anzahl lebender Zellen, bei der Untersuchung nur von adhärennten Zellen (abgelöst mittels Trypsin/EDTA) gegenüber der bei der Untersuchung aller auf der Zellkulturplatte befindlichen Zellen (Verwendung von mittels Zellschaber abgelösten Zellen und Zellen im Überstand) (s. Abbildung 21).

Dieser Effekt war bei den anderen verwendeten Zelllinien nur in geringerem Maße zu beobachten, hier entsprachen die lebenden Zellen im wesentlichen den adhärennten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Im zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen in 6-well-Platten mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden hierfür in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen (DU145 und PC-3) und  $1 \times 10^6$  Zellen (LNCaP) pro well einer 6 well

Platte ausgelegt und mit entsprechendem Medium mit 10% FCS inkubiert. 2, 4 und 6 Tage nach Infektion wurde äquivalent zum oben beschriebenen Vorgehen ein MTT Assay durchgeführt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls äquivalent dem oben beschriebenen Vorgehen. Es wird deutlich, dass sich bei der MOI von 1 nach 4 und 6 Tagen geringe Unterschiede in der Zahl der überlebenden Zellen bemerkbar machten (s. Abbildung 22).

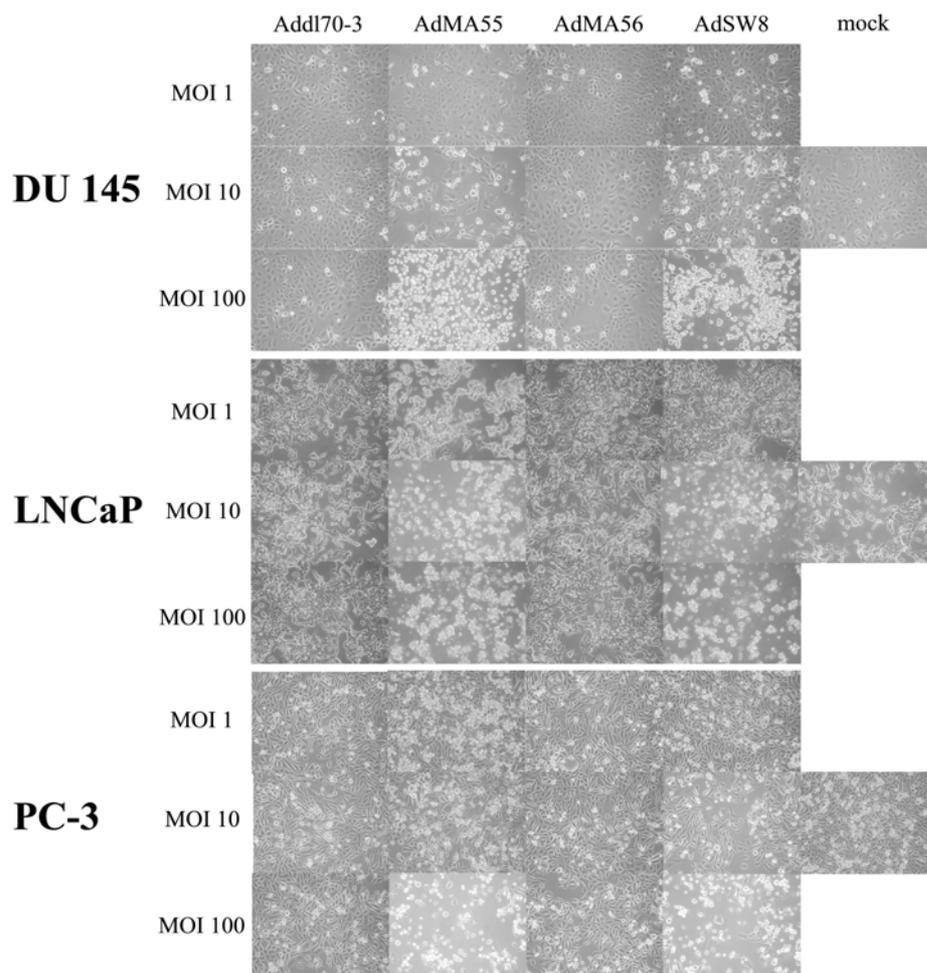


**Abbildung 22: MTT Assay zeigt zytopathischen Effekt im Zeitverlauf**

Verschiedene Zelllinien wurden mit verschiedenen Viren infiziert mit einer MOI von 1. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde ein MTT Assay der adhärennten Zellen (links) oder der adhärennten und nichtadhärennten Zellen (rechts) durchgeführt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert von zwei separaten Infektionen mit der Standardabweichung.

Deutlich war der zytopathische Effekt vor allem bei LNCaP Zellen, sehr gering jedoch bei DU145 und PC-3 Zellen. So waren 2 Tage nach Infektion mit AdMA55 und AdSW8 nur 40% Zellen lebend und adhären im Vergleich zur *mock*-Infektion, nach 4 und 6 Tagen gar keine mehr.

### 7.2.3 Darstellung mittels phasenkontrastmikroskopischer Aufnahmen



**Abbildung 23: Zytopathischer Effekt in Abhängigkeit von der verwendeten MOI - Phasenkontrastmikroskopie**

Die angegebenen Zelllinien wurden infiziert mit verschiedenen Viren und den angegebenen MOIs. 3 Tage nach Infektion wurden phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Vergrößerung ca. 120x).

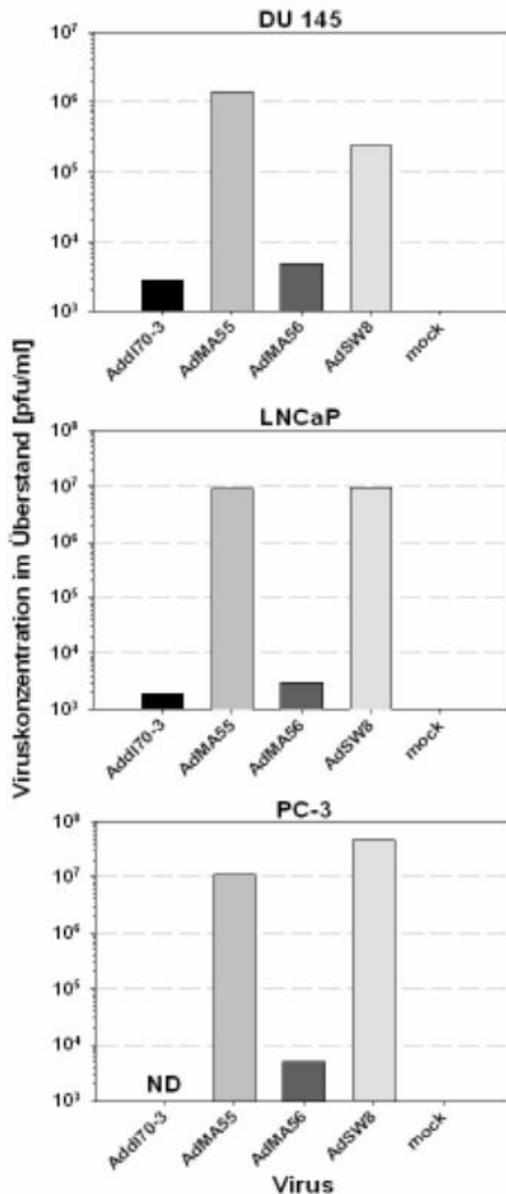
und Ablösung von Zellen, bei höheren MOIs waren keine adhären Zellen mehr erkennbar. Bei PC-3 Zellen war lediglich bei einer MOI von 100 ein zytopathischer Effekt sichtbar, mit Abrundung und Ablösung der Zellen, hingegen war bei DU145 Zellen dieser Effekt schon deutlich bei einer MOI von 10.

Die mittels Kristallviolett färbung und MTT-Assay erhobenen Befunde zeigten sich auch deutlich in den zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführten phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen des zytopathischen Effektes (s. Abbildung 23).

Wiederum war die LNCaP Zelllinie bei Verwendung der replikationskompetenten Vektoren am sensitivsten, bereits bei einer MOI von 1 kam es drei Tage nach Infektion zum zytopathischen Effekt mit Abrundung

### 7.3 Replikation von E1B55K-deletierten Adenoviren in allen verwendeten Prostatakarzinom Zelllinien

Um die Virusreplikation, gemessen an der Virusfreisetzung infizierter Zellen, in den verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurden die Zellen in 60mm-Zellkulturplatten mit den unterschiedlichen Viren



**Abbildung 24: Hohe Virusfreisetzung nach Infektion mit E1B55K-deletierten Adenoviren**

Nach Infektion von  $2 \times 10^5$  Zellen (DU145 und PC-3) und  $1 \times 10^6$  Zellen (LNCaP) in 60 mm-Zellkulturplatten mit Adenoviren mit einer MOI von 1 wurde die Viruskonzentration im Zellüberstand am Tag 6 nach Infektion mittels Plaue Assay bestimmt.

der ursprünglich eingebrachten Viren im Überstand; die restlichen Viren waren mutmaßlich in der Lage, an Zellen zu adsorbieren und sie möglicherweise zu infizieren. Somit war die Viruskonzentration im

mit einer MOI von 1 infiziert. Sechs Tage nach Infektion wurden Aliquots der Überstände entnommen und mit 10% Vol. Glycerol bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren, um dann nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen mittels Plaue-Assay die Viruskonzentration im Überstand zu bestimmen.

Die Viruskonzentration nach Infektion durch die E1B55K-deletierten Adenoviren lag deutlich über derjenigen, die der allein durch die mit der Infektion beigebrachten Viruskonzentration entspräche; diese läge, wenn alle eingebrachten Viren nicht adsorbiert worden wären und sich frei im Überstand befunden hätten bei  $4 \times 10^4$  (DU145 und PC-3), bzw.  $2 \times 10^5$  pfu/ml Überstand (s. Abbildung 24). Hier aber lag die Konzentration des Virus bei DU145 Zellen im Falle von AdMA55 und AdSW8 zwischen  $10^5$  und  $10^6$  pfu/ml und bei LNCaP und PC-3 Zellen bei ca.  $10^7$  pfu/ml. Hingegen wiesen die Überstände der E1E3-deletierten Adenoviren nur solche Viruskonzentrationen auf, die alleine durch die mit der Infektion eingebrachten Virusmenge erklärt werden konnten; so befanden sich im Falle der Infektion mit AdMA56 bei DU145, PC-3 und LNCaP Zellen noch 12,5%, bzw. 1,5% und 12,5%

---

Überstand von mit replizierenden Viren infizierten Zellen um den Faktor 100 bis 10000 größer als die im Überstand von mit nichtreplizierenden Adenoviren infizierten Zellen. Zwischen den beiden verwendeten replizierenden Adenoviren (AdMA55 und AdSW8) bestand kein nennenswerter Unterschied in der Menge des freigesetzten Virus (*burst size*). Nicht erfasst wurden mit diesem Versuchsablauf die Viruspartikel, die sich noch innerhalb adhärenter Zellen befinden, da nur freigesetzte, im Überstand befindliche Viruspartikel, und in nichtadhärenenten Zellen, durch die Einfrier-Auftau-Zyklen freigesetzte Viruspartikel, erfasst wurden. Dies spielte allerdings möglicherweise bei der Zelllinie LNCaP eine wichtige Rolle, da ein großer Teil der Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst war (s. Abschnitt 7.2.2) und sich im Überstand befand und hieraus durch die Einfrier-Auftau-Zyklen größere Mengen Virus freigesetzt werden konnte. Ein weiterer Gesichtspunkt war, dass PC-3 Zellen nach Infektion mit replikationskompetenten Adenoviren eine sehr hohe Virusfreisetzung erzielten, wobei sowohl die Infizierbarkeit (s. 7.1), als auch der zytopathische Effekt (s. 7.2) geringer ausgeprägt waren als bei den anderen verwendeten Zelllinien.

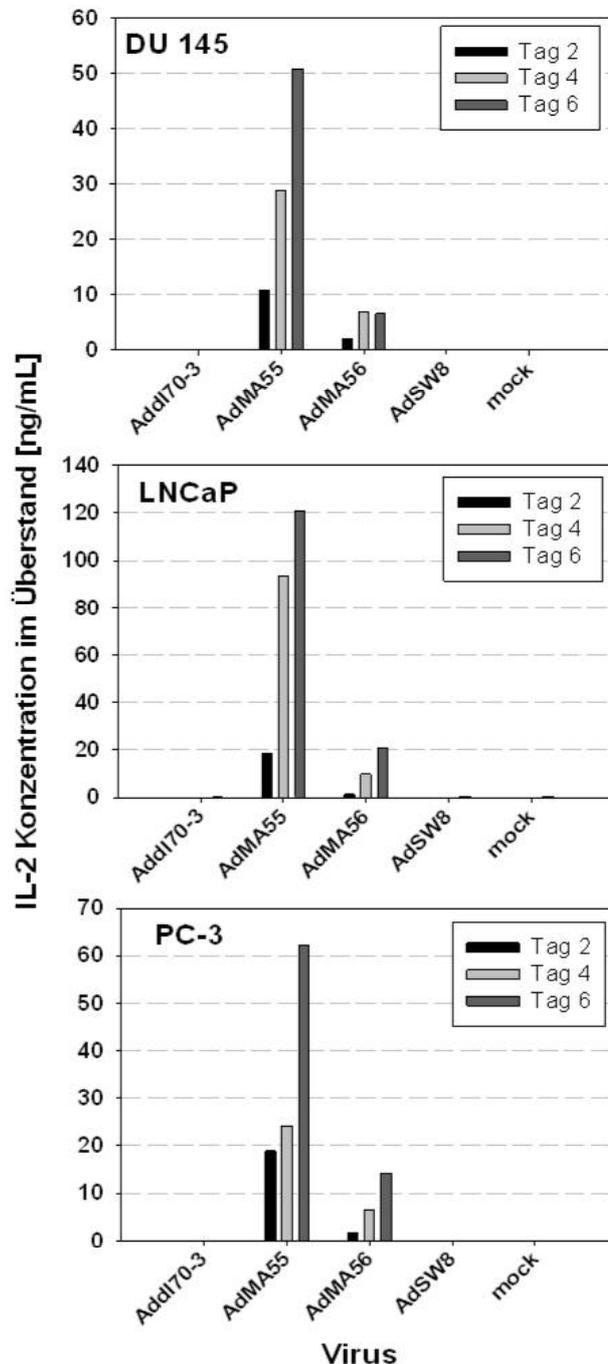
---

## 7.4 Gesteigerte IL-2 Produktion nach Infektion mit einem replikationskompetenten IL-2 Gen tragenden Adenovirus

Für die Evaluation der IL-2 Produktion nach Infektion verschiedener Prostatakarzinomzelllinien wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots der Überstände entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die IL-2-Konzentrationen der Überstände wurden bestimmt. Nach Infektion mit dem E1B55K-deletierten IL-2-tragenden Adenovirus (AdMA55) fanden sich durchweg bei allen verwendeten Zelllinien IL-2 Spiegel im Überstand, die diejenigen nach Infektion mit dem E1- und E3-deletierten IL-2 tragenden Adenovirus (AdMA56) um den Faktor 4 bis 15 überstiegen (s. Abbildung 25).

Bei allen verwendeten Zelllinien kam es bis zum Tag 6 nach Infektion zu einer Akkumulation von IL-2 im Überstand, mit Ausnahme der Zelllinie DU145, bei der es nach Infektion mit AdMA56 zu einer Akkumulation bis zum Tag 4 nach Infektion kam, danach blieb die Konzentration konstant.

Die erzielten Konzentrationen waren bei allen verwendeten Zelllinien in einer vergleichbaren Größenordnung; die höhere Konzentration im Falle der LNCaP Zellen ist mutmaßlich bedingt durch die größere Zellzahl zu Beginn des Versuchs ( $1 \times 10^6$  Zellen gegenüber  $2 \times 10^5$  Zellen).

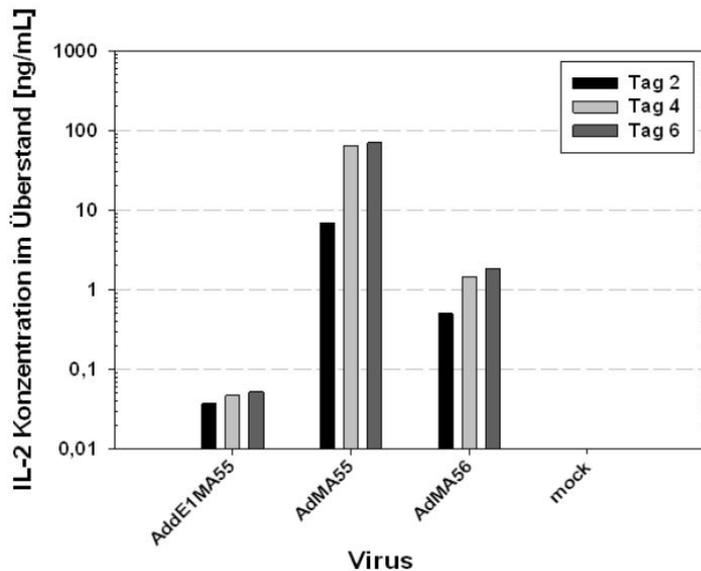


**Abbildung 25: Replikationskompetentes IL-2 Gen tragendes Adenovirus erzeugt hohe IL-2 Produktion**

$2 \times 10^5$  Zellen (DU145 und PC-3), bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen (LNCaP) wurden infiziert mit einer MOI von 1. Zwei, vier und sechs Tage nach Infektion wurde im Überstand die akkumulierte IL-2 Konzentration bestimmt.

## 7.5 Transgeninsertion in der E3 Region führt zu deutlich verminderter Transgenexpression –Überkompensation durch Replikationskompetenz

Um den Einfluss der Insertionsstelle des Transgens im viralen Genom auf das Expressionslevel zu untersuchen wurde ein E1E3-deletiertes Adenovirus produziert, das die IL-2 Expressionskassette in der



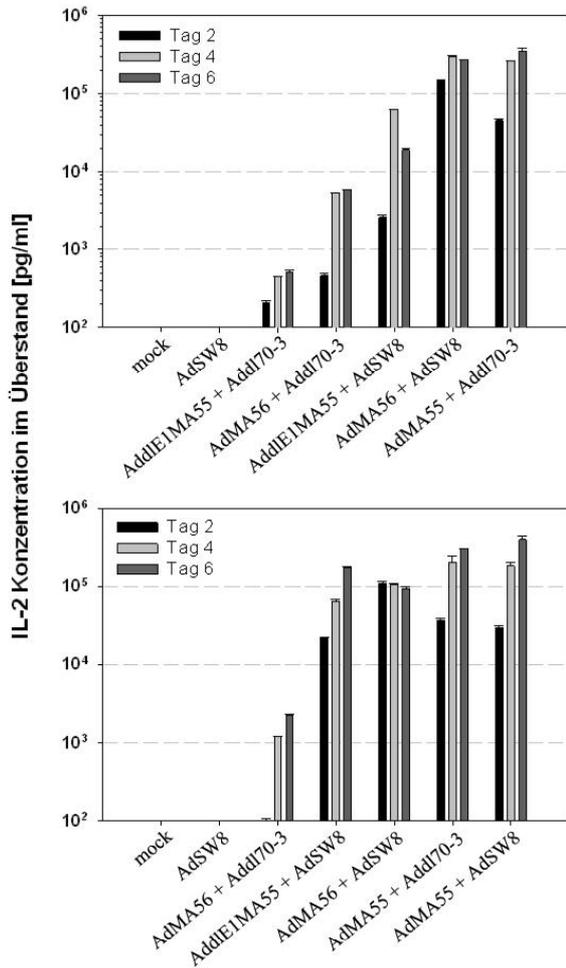
**Abbildung 26: Transgenposition hat großen Einfluss auf die IL-2 Produktion**

$2 \times 10^5$  DU145 Zellen wurden mit den bezeichneten Viren mit einer MOI von 1 infiziert. Zwei, vier und sechs Tage nach Infektion wurde im Überstand die hIL-2-Konzentration bestimmt.

unabhängig von der Transgeninsertionsstelle steigt die IL-2 Konzentration im Überstand über die Zeit an (s. Abbildung 26). Am Tag 6 nach Infektion überstieg die IL-2 Konzentration im Überstand nach Infektion mit AdMA56 (Transgen in E1) die nach Infektion mit AdΔE1MA55 (Transgen in E3) um den Faktor 35. Diese IL-2 Konzentration wurde wiederum um den Faktor 38 nach Infektion mit AdMA55 (replizierend, Transgen in E3) übertroffen. Der Vergleich zwischen den beiden Viren, die die IL-2 Expressionskassette in der E3 Region tragen, AdΔE1MA55 (nichtreplizierend) und AdMA55 (replizierend) zeigte, dass durch die virale Replikation die Transgenexpression um den Faktor 1400 anstieg (Tag 6).

E3-Region besitzt (AdΔE1MA55). Wiederum wurden Infektionsversuche mit replikationsdefizienten Adenoviren durchgeführt, zum Vergleich der IL-2-Produktion infizierter Zellen nach Infektion mit einem E1E3-deletierten Adenovirus mit IL-2-Gen in der E1-Region gegenüber dem IL-2-Gen in der E3-Region. Die Infektion von DU145 Zellen erfolgte in 60mm-Zellkulturplatten mit einer MOI von 1 der verwendeten Viren AdΔE1MA55 (AdΔE1ΔE3, IL-2-Gen in E3), AdMA55, AdMA56 und mock. Die akkumulierte IL-2 Konzentration im Überstand wurde zwei, vier und sechs Tage nach Infektion bestimmt;

## 7.6 Koinfektion zur Steigerung der Transgenexpression



**Abbildung 27: Kombinierte Infektion ermöglicht hohe IL-2 Produktion**

2 x 10<sup>5</sup> DU145 Zellen wurden infiziert mit Kombinationen von verschiedenen Viren, die Gesamt-MOI betrug immer 2; d.h. jeweils eine MOI von 1 für jedes Virus, mit Ausnahme der Negativ-Kontroll-Infektion mit AdSW8, bei der einzig dieses Virus verwendet wurde. An den Tagen 2, 4 und 6 nach Infektion wurde in den Überständen der akkumulierte IL-2 Spiegel bestimmt. Dargestellt sind zwei separate Infektionsversuche mit teilweise unterschiedlichen Viruskombinationen. Bei dem unten dargestellten Versuch wurde zusätzlich die Kombination von AdMA55 und AdSW8 verwendet, aber keine Kombination von AdΔE1MA55 und Add170-3 durchgeführt. Es wurde jeweils der Mittelwert einer Doppelbestimmung mit der Standardabweichung angegeben.

Um die Potenz einer Kombination replizierender und nichtreplizierender, transgen-tragender Viren zu ermitteln, wurden Infektionsversuche mit Kombinationen von Viren in DU145 Zellen durchgeführt.

Dazu wurden Kombinationen von Viren verwendet; zum einen die Kombination mit einem nichtreplizierenden Adenovirus der ersten Generation (Add170-3; AdΔE1ΔE3) als nichtreplizierendes System, zum anderen mit einem replizierenden, attenuierten Adenovirus (AdSW8; AdΔE1B55K) als replizierendes System. Die Parameter der durchgeführten Infektionen sind dargelegt in der Beschriftung zu Abbildung 35.

Durch Komplementierung eines nichtreplizierenden IL-2-Gen-tragenden Adenovirus, AdΔE1MA55 oder AdMA56, mit einem replizierenden Adenovirus, AdSW8,

konnte eine beträchtliche Steigerung der IL-2-Produktion erreicht werden. So wurde z.B. durch die Supplementierung von AdSW8 gegenüber Add170-3 zu AdMA56 die IL-2-Konzentration im Überstand an Tag 6 von 5,9 ng/ml auf über 267 ng/ml, um den Faktor 45 gesteigert. Ähnliches gilt für die Supplementierung von AdΔE1MA55; hier wurde eine Steigerung von 0,5 ng/ml auf 19 ng/ml, um den Faktor 38 erreicht (s. Abbildung, oben).

Der Vergleich zwischen den Insertionsstellen der IL-2-Expressionskassette und deren Einfluss auf die Höhe der IL-2-Produktion ließ sich mit den vorliegenden Daten ebenfalls auf ein replizierendes System erweitern. Durch Komplementierung

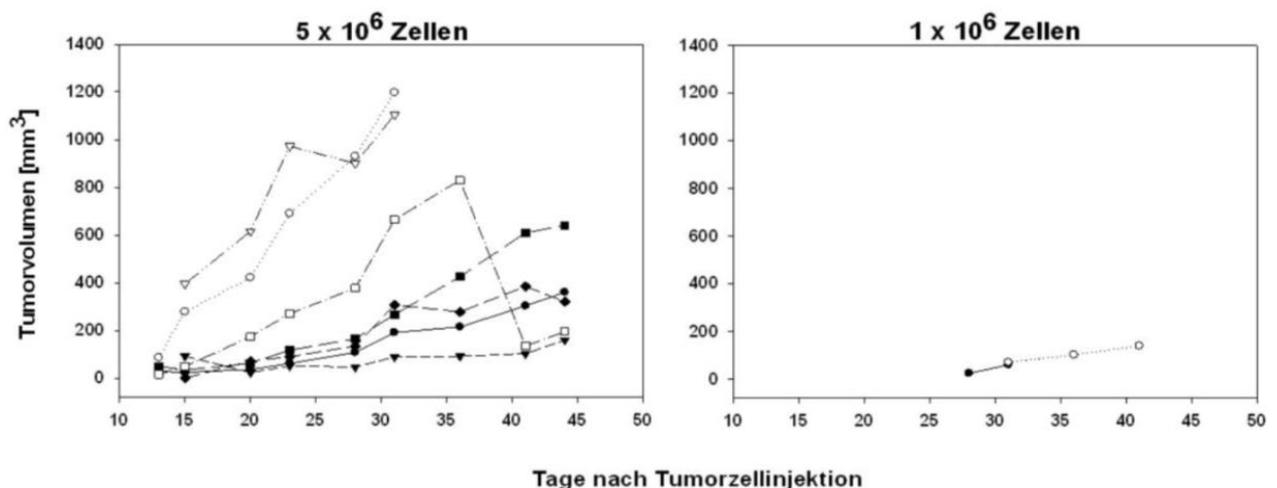
von AdMA56 mit AdSW8 ließen sich gegenüber einer Komplementierung von AdΔE1MA55 mit AdSW8 um den Faktor 14 höhere IL-2-Konzentrationen erzielen; im Vergleich 267 ng/ml zu 19 ng/ml

(Werte von Tag 6) (s. Abbildung, oben). Diese Ratio bewegte sich in etwa im Rahmen der Größenordnung, die beim separaten Vergleich von Ad $\Delta$ E1MA55 und AdMA56 festgestellt wurde (s. Abbildung 26); dort lag die Ratio der IL-2-Produktion bei ca. 35:1.

Ferner ist festzuhalten, dass die Kombination eines E1B55K-deletierten Virus (AdSW8) mit einem E1E3-deletierten IL-2 in der E1-Region tragenden Virus (AdMA56) zu maximalen IL-2-Konzentrationen im Überstand infizierter Zellen führte, die denen nach Infektion mit einem E1B55K-deletierten das IL-2-Gen in der E3-Region tragenden Adenovirus (AdMA55) entsprachen. Jedoch zeigte sich, dass die maximale Konzentration im Überstand reproduzierbar bereits nach 4 Tagen erreicht wurde, während es nach Infektion mit AdMA55 zu einem stetigen Anstieg bis zum 6. Tag nach Infektion kam (s. Abbildung, oben und unten). Auch waren bereits zwei Tage nach Infektion deutlich höhere IL-2-Spiegel mit der Kombination AdMA56 und AdSW8 zu finden, als mit der Kombination AdMA55 und Add170-3 (s. Abbildung).

## 7.7 Tumorinduktion durch DU145 Zellen in Balb/C *nu/nu* Mäusen

Um das Wachstum von DU145-Prostatakarzinom-Xenograft-Tumoren in Balb/C *nu/nu* Nacktmäusen zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen subkutan injiziert. Zur Ermittlung einer praktikablen Zellmenge wurden zwei unterschiedliche Mengen an Zellen getestet. Es wurden bei jedem Tier in die eine Flanke  $1 \times 10^6$  und die andere Flanke  $5 \times 10^6$  DU145 injiziert. Hierbei wurden die Zellen vor der Injektion in eine Spritze aufgezogen und aus dieser Spritze sämtliche Injektionen durchgeführt.



**Abbildung 28: Tumorwachstum nach Injektion unterschiedlicher Zellmengen**

Balb/C *nu/nu* Mäuse wurden mit der bezeichneten Anzahl von DU145 Zellen subkutan injiziert. Zweimal wöchentlich wurde das Tumolvolumen bestimmt. Das Wachstum von Tumoren einzelner Tiere ist in den beiden Abbildungen wiedergegeben. Von sieben mit  $5 \times 10^6$  Zellen injizierten Mäusen entwickelten sieben Mäuse messbare Tumoren, jedoch nur zwei von sieben Tieren aus der mit  $1 \times 10^6$  Zellen injizierten Gruppe.

Von den sieben injizierten Mäusen entwickelten nur zwei Tiere auf der mit  $1 \times 10^6$  Zellen injizierten Seite einen Tumor, während alle Mäuse auf der mit  $5 \times 10^6$  Zellen injizierten Seite einen Tumor entwickelten (s. Abbildung 28). Etwa drei bis vier Wochen nach Tumorzellinjektion erreichten die Tumoren ein Volumen von 100 bis 200 mm<sup>3</sup>. Daher wurden in den weiteren Tierversuchen jeweils  $5 \times 10^6$  DU145 Zellen für die Tumorinduktion verwendet. Ferner war das Tumorwachstum relativ heterogen, daher wurden in späteren Versuchen die zu injizierenden Zellsuspensionen aliquotiert, um sie direkt vor Injektion erst aufzuziehen und zu erreichen, dass alle Tiere gleiche Mengen an Zellen erhalten.

## 7.8 Hohe Plasma IL-2-Spiegel nach intratumoraler Injektion

Um die Produktion von hIL-2 nach intratumoraler Injektion von AdMA55 und AdMA56 nachzuweisen, wurden unterschiedliche Protokolle für die intratumorale Injektion der Adenoviren angewendet.

In ersten Versuchen wurden die Blutentnahmen mittels Punktion der Schwanzvene oder Vena saphena durchgeführt. Da die erhaltenen Mengen sehr gering waren und das Plasma durch Hämolyse stark kontaminiert war, und dieses nicht zu zuverlässigen h-IL-2 ELISA-Ergebnissen führen konnte, wurden in der Folge Versuche mit terminaler Blutentnahme und humaner Opferung der Tiere durchgeführt.

Erstens, nach drei Injektion von  $5 \times 10^8$  pfu intratumoral in wöchentlichem Abstand in Tumoren eines Volumens von 100-200 mm<sup>3</sup> wurde bei zwei Tieren je Gruppe zwei Tage nach der letzten intratumoralen Virusinjektion eine perkutane intrakardiale Blutentnahme mit anschließender Opferung der Tiere

durchgeführt. Von den erhaltenen Blutproben wurde das Plasma separiert und anschließend eine Bestimmung der Plasma-IL-2-Spiegel durchgeführt. Lediglich ein Tier der AdMA55-injizierten Gruppe hatte nachweisbares IL-2 im Plasma, während beide Tiere der AdMA56-injizierten Gruppe nachweisbares IL-2 im Plasma besaßen. Bei Tieren, die mit nicht-IL-2-tragenden Adenoviren injiziert wurden, ließ sich kein IL-2 nachweisen (s. Tabelle 3A).

A)		B)	
Injiziertes Virus	Plasma IL-2 [pg/ml]	Injiziertes Virus	Plasma IL-2 [pg/ml]
Addl70-3	0	AdMA55	0
	0		0
AdMA55	145,2		91,4
	0	132,8	
AdMA56	21,7	10,7	
	18,8	15,2	
	0	0	
AdSW8	0	AdSW8	0
	0		0
mock	0		0
	0		0

**Tabelle 3: Plasma IL-2 Nachweis nach intratumoraler Injektion**

**A)** Balb/C *nu/nu* Mäuse wurden intratumoral mit  $5 \times 10^8$  pfu der angegebenen Viren pro Woche über drei Wochen hinweg injiziert. Zwei Tage nach der letzten intratumoralen Injektion wurde eine intrakardiale Blutabnahme vorgenommen und der Plasma-IL-2-Spiegel gemessen. **B)** Balb/C *nu/nu* Mäuse wurden intratumoral mit  $5 \times 10^8$  pfu der angegebenen Viren pro Tag über fünf Tage hinweg injiziert. Drei Tage nach der letzten Injektion wurde eine intrakardiale Blutabnahme vorgenommen und der Plasma-IL-2-Spiegel gemessen.

Zweitens, nach fünf Injektionen von  $5 \times 10^8$  pfu intratumoral in täglichem Abstand wurden bei 4 Tieren je Gruppe drei Tage nach der letzten Injektion ebenfalls eine terminale Blutentnahme durchgeführt (Gruppen AdMA55, AdMA56, AdSW8) und Plasma-IL-2-Spiegel

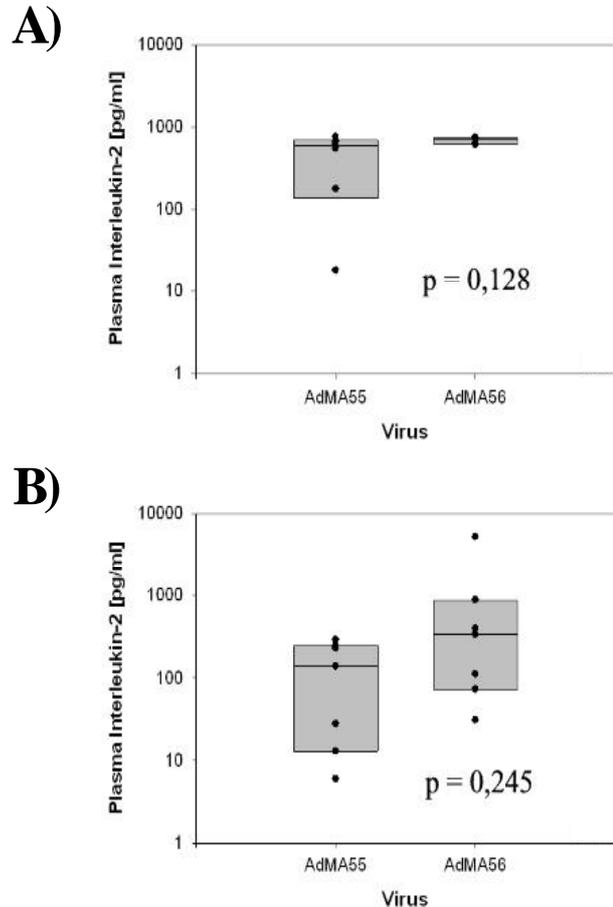
gemessen. In diesem Versuch konnte lediglich bei den Tieren der AdMA56-Gruppe Plasma-IL-2 nachgewiesen werden. Ein Tier der AdMA55-Gruppe wurde tot aufgefunden; daher wurde nur bei drei Tieren aus dieser Gruppe das Plasma-IL-2 gemessen (s. Tabelle 3B).

Drittens, nach Injektion von  $5 \times 10^8$  pfu intratumoral für drei aufeinanderfolgende Tage in Tumoren eines Volumens von 100 bis 200 mm<sup>3</sup> wurde einen Tag nach der letzten Injektion eine perkutane intrakardiale Blutentnahme mit anschließender Opfierung der Tiere durchgeführt. Von den erhaltenen Blutproben wurde das Plasma separiert und anschließend eine Bestimmung der Plasma-IL-2-Konzentrationen durchgeführt (s. Abbildung 29A). Die Durchführung erfolgte bei sechs Tieren pro Gruppe.

Viertens, nach Injektion von  $5 \times 10^8$  pfu intratumoral für drei aufeinanderfolgende Tage wurde zwei Tage nach der letzten Injektion eine perkutane intrakardiale Blutentnahme mit anschließender Opfierung der Tiere durchgeführt. Erneut wurden die Plasma-IL-2-Spiegel ermittelt (s. Abbildung 29B). Die Durchführung erfolgte bei sieben Tiere pro Gruppe.

Beide Experimente lieferten ähnliche Ergebnisse; in der Gruppe der mit AdMA56 injizierten Mäuse fanden sich im Mittel höhere hIL-2-Plasmaspiegel als in der mit AdMA55 injizierten Gruppe, erstens, 694 pg/ml gegenüber 470 pg/ml (s. Abbildung 29A), zweitens, 1020 pg/ml zu 137 pg/ml, wenn auch diese Unterschiede nicht signifikant waren (s. Abbildung 29B). Die initialen Tumorgößen unterschieden sich nicht signifikant (nicht dargestellt). Die ermittelte Variation hinsichtlich des Nachweises von humanem IL-2 im Plasma, mit hohen IL-2 Spiegeln einerseits und nicht nachweisbarem IL-2 andererseits deutet darauf hin, dass

Probleme bei der Anlieferung des Virus in das Tumorgewebe bestanden (s. auch Diskussion 8.4.4).

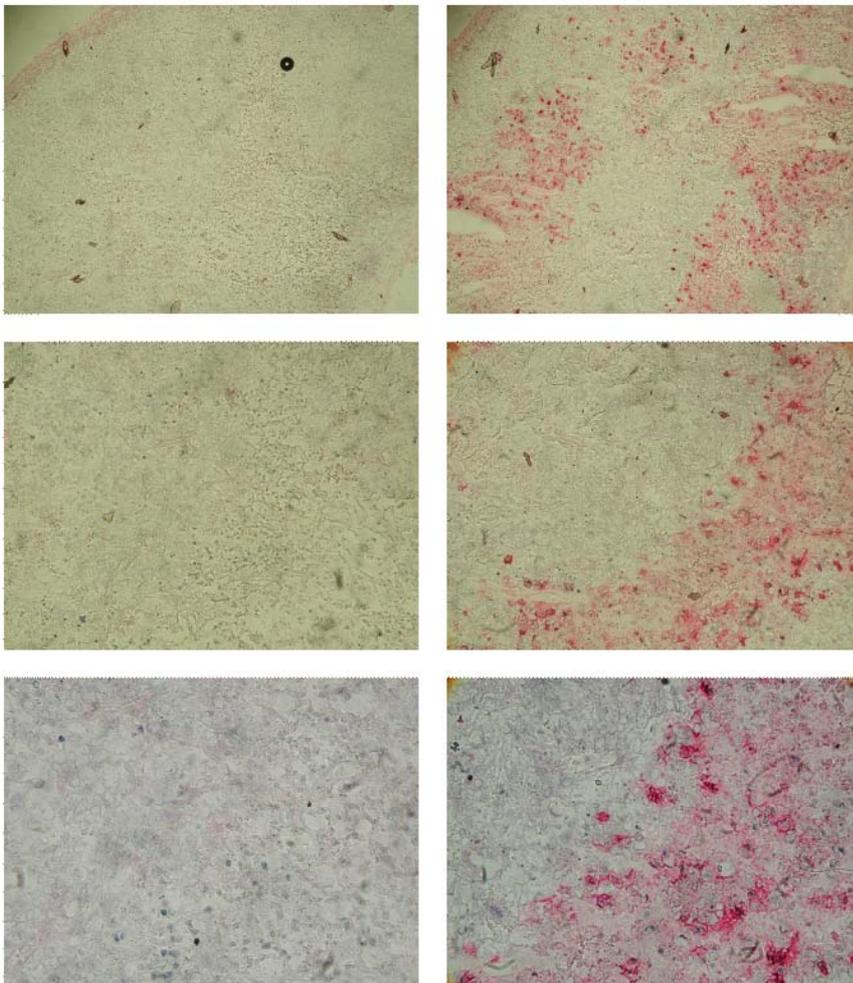


**Abbildung 29: Replizierende und nichtreplizierende Viren mit IL-2 Gen erzeugen ähnliche Plasma IL-2 Spiegel nach intratumoraler Injektion**

Dargestellt sind die hIL-2 Spiegel nach intratumoraler Injektion mit den angegebenen Adenoviren:  $8 \times 10^5$  pfu täglich für drei Tage, Blutabnahme **A)** am Tag 1 und **B)** Tag 2 nach letzter Injektion. Die Linien des Boxplots geben an: 25. Perzentile, Median und 75. Perzentile. Es handelt sich um zwei unabhängige Experimente. p beträgt 0,128 (A) und 0,245 (B) im zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben. Die dargestellten Unterschiede erreichen somit kein signifikantes Niveau ( $p < 0,05$ ).

## 7.9 Nachweis intratumoraler Adenoviruspartikel und Transgenexpression

Mittels immunhistochemischer Aufarbeitung der entnommenen Tumoren wurden diese auf die Anwesenheit von Adenovirushexonproteinen, IL-2 und die Infiltration durch NK-Zellen untersucht. Bei einem Tumor der AdMA55-injizierten Gruppe (s. Abbildung 30) und bei einem der AdSW8-injizierten Tumoren (s. Abbildung 32) konnten Adenoviruspartikel intratumoral nachgewiesen werden. Die Aufnahmen zeigen verschiedene Vergrößerungen des gleichen Tumorausschnittes; auf der linken



**Abbildung 30: Nachweis von intratumoralen Adenoviruspartikeln – AdMA55**

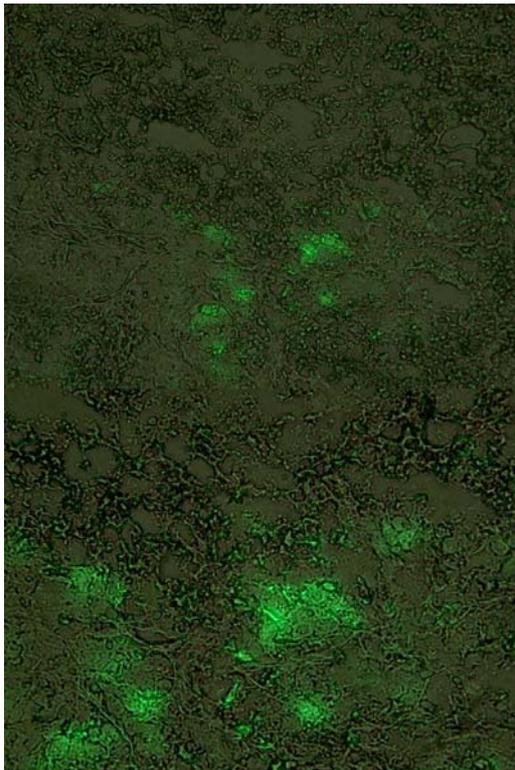
Gefrierschnitte mit immunhistochemischem Nachweis von Adenovirushexonproteinen und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in einem mit AdMA55-injizierten DU 145-Nacktmus-Xenograft. Dargestellt sind verschiedene Vergrößerungen desselben Ausschnitts. Links die Negativkontrolle, d.h. ein ähnlicher Ausschnitt des gleichen Tumors, ohne Verwendung des Primärantikörpers, mit Verwendung des Sekundärantikörpers. Rechts unter Verwendung des Primärantikörpers und des Sekundärantikörpers. In einem ringförmigen nekrotischen Bezirk des Tumors sind Adenoviruspartikel nachzuweisen (Vergrößerung oben / mitte / unten ca. 50x / 120x / 250x).

Seite die Negativkontrolle, d.h. nach Durchführung der Immunhistochemieprozedur ohne Verwendung eines Primärantikörpers, rechts mit Primärantikörper. Damit war der Nachweis der Spezifität des Adenovirusnachweises geführt.

Zusätzlich ist in Abbildung 31 eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Schnittes des gleichen Tumors dargestellt, bei dem nach intratumoraler Injektion von AdMA55 (IL-2 Expressionskassette enthält das EGFP Gen, (s. auch 6.2.1) erfolgreich eine Transduktion von Zellen innerhalb des Tumors werden konnten.

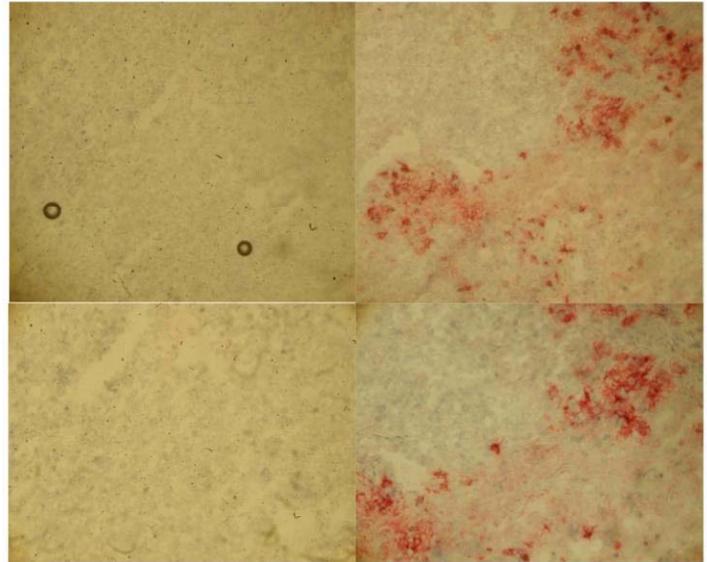
Es handelt sich bei den Aufnahmen um eine Überlagerung von durchlichtmikroskopischen und

fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des gleichen Tumorausschnittes. In einem Bereich des Tumors war ein starkes EGFP-spezifisches Signal nachweisbar. In einem weiteren AdMA55-injizierten Tumor wurde eine ringförmige Expression von EGFP nachgewiesen; auch hier findet sich die EGFP-Expression in einem ringförmigen Bereich des Tumors (s. Abbildung 33). Dieses Verfahren konnte für die anderen Tumoren, die mit anderen Adenoviren als AdMA55 injiziert wurden, nicht angewendet werden, da diese kein EGFP-Gen tragen.



**Abbildung 31: Erfolgreiche Transduktion nach intratumoraler Injektion mit AdMA55**

Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des identischen Tumorausschnittes wurden überlagert. Es handelt sich hierbei um nichtfixierte Gefrierschnitte eines Tumors, der mit AdMA55 injiziert wurde. In einem fleckförmigen Bereich des Tumors sind EGFP-exprimierende Zellen vorhanden (Vergrößerung ca. 250x).



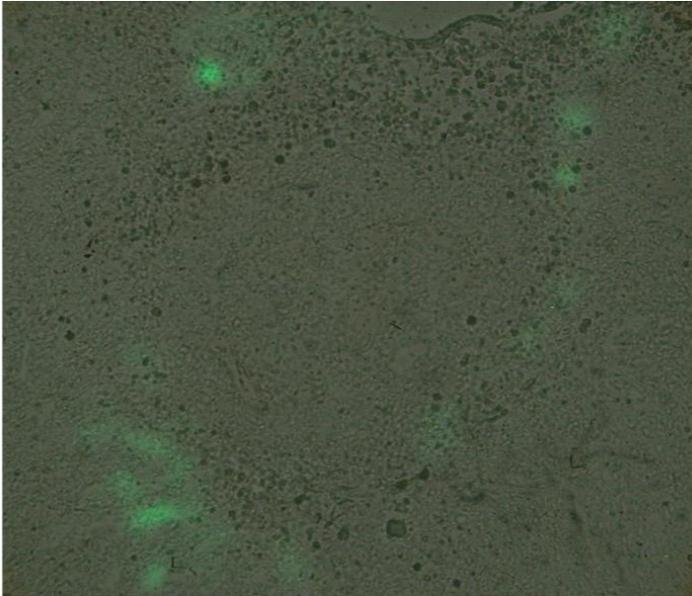
**Abbildung 32: Nachweis von intratumoralen Adenoviruspartikeln – AdSW8**

Gefrierschnitte mit immunhistochemischem Nachweis von Adenovirushexonproteinen und Gegenfärbung mit Hämatoxylin in einem mit AdSW8-injizierten DU 145-Nacktmaus-Xenograft. Dargestellt sind verschiedene Vergrößerungen desselben Ausschnitts. Links die Negativkontrolle, d.h. ein ähnlicher Ausschnitt des gleichen Tumors, ohne Verwendung des Primärantikörpers, mit Verwendung des Sekundärantikörpers. Rechts unter Verwendung des Primärantikörpers und des Sekundärantikörpers. In einem ringförmigen nekrotischen Bezirk des Tumors sind Adenoviruspartikel nachzuweisen (Vergrößerung oben/unten ca. 120x/250x).

Die Adenoviruspartikel befanden sich in Bereichen der Tumoren, der auch eine deutlich veränderte Architektur, im Sinne einer Nekrose, aufwies. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass AdMA55 in der Lage ist, innerhalb des Tumors zu replizieren und einen zytopathischen Effekt auszuüben. Das Ausmaß der Replikationsfähigkeit *in vivo*, ob z.B. der gesamte Tumor infiziert werden kann, ist jedoch aufgrund dieser Befunde nur schwer zu beurteilen. Des Weiteren war bei Färbungen von anderen AdMA55-injizierten Tumoren mit dem anti-Adenovirus-Antikörper kein eindeutiger Nachweis von Adenoviruspartikeln möglich, obgleich verschiedene Anteile dieser Tumoren aufgearbeitet wurden. Dies wies darauf hin, dass zumindest nicht die gesamten Tumoren mit dem Virus infiziert wurden.

Der Nachweis von intratumoralem hIL-2 indes gelang nicht, da die optimalen Bedingungen für die Färbung mit anti-hIL-

2-Antikörpern nicht etabliert werden konnten. Des Weiteren konnte die Frage nach dem Ausmaß der Infiltration mit NK-Zellen nicht ausreichend spezifisch beantwortet werden, da auch hier die optimalen Bedingungen nicht etabliert werden konnten.

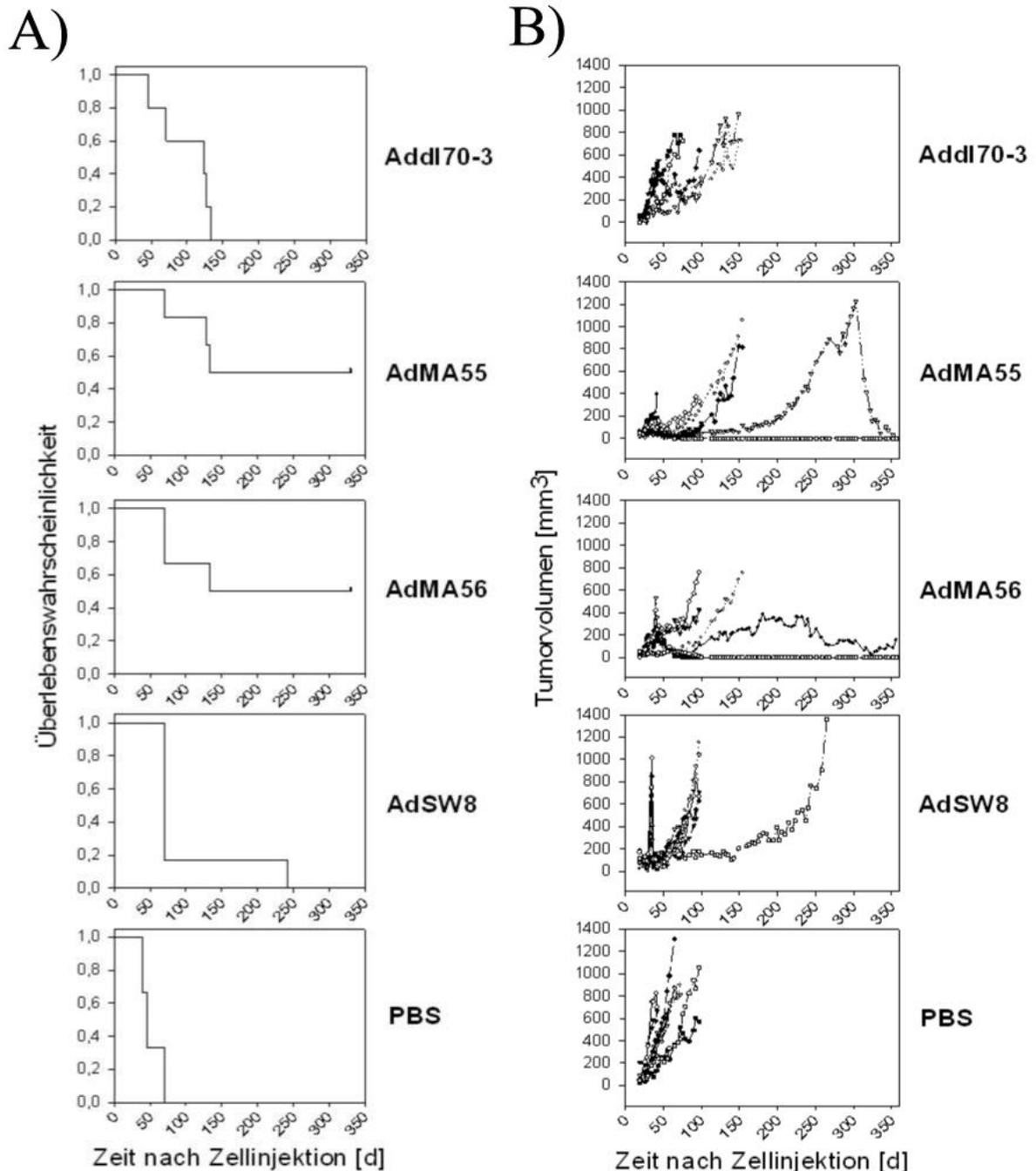


**Abbildung 33: Erfolgreiche Transduktion nach intratumoraler Injektion mit AdMA55**

Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des identischen Tumorausschnittes wurden überlagert. Es handelt sich hierbei um nichtfixierte Gefrierschnitte eines Tumors, der mit AdMA55 injiziert wurde. In einem ringförmigen Bereich des Tumors sind EGFP-exprimierende Zellen vorhanden; dieser Bereich weist gleichzeitig deutliche Veränderungen der Gewebearchitektur im Sinne einer Nekrose auf (Vergrößerung ca. 120x).

## **7.10 Verlängertes Überleben nach intratumoraler Injektion von IL-2 Gen tragenden und replizierenden Adenoviren**

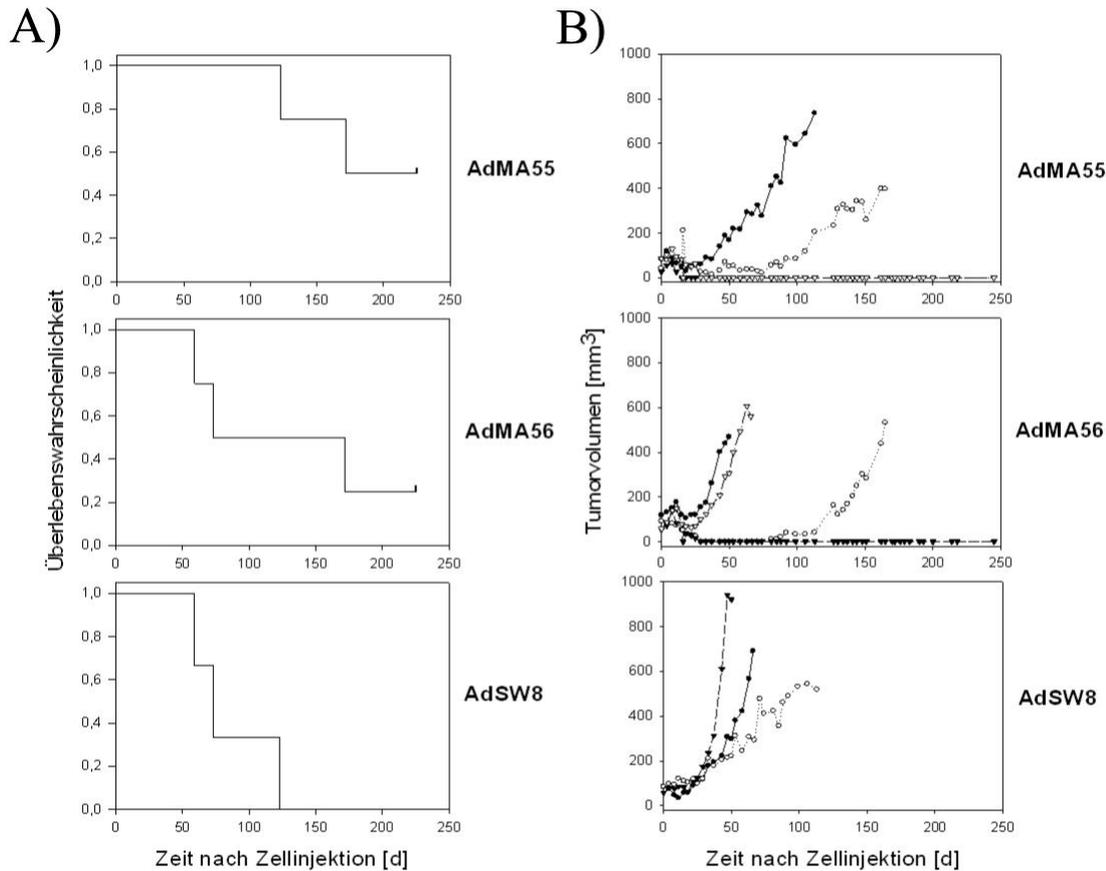
Um den Einfluss der verschiedenen Adenoviren auf das *in vivo* Wachstum von DU145 Prostatakarzinomzell-Xenografts zu untersuchen wurden Experimente mit verschiedenen Injektionsschemata angewendet. Erstens, nach dem Erreichen eines Volumens von 100-200 mm<sup>3</sup> wurden Tumoren intratumoral mit  $5 \times 10^8$  pfu in 50 µl PBS der bezeichneten Viren injiziert; die Injektionen wurden wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen injiziert, d.h. insgesamt erfolgten drei Injektionen pro Tumor. Die Tiere wurden anschließend über einen Zeitraum von bis zu 350 Tagen nach Tumorzellinjektion nachbeobachtet (s. Abbildung 34). Die Tiere wurden geopfert bei Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von rund 12 mm; dieses entspricht etwa einem Tumorumfang von 800 bis 1000 µl, bei sehr rascher Größenzunahme der Tumoren und Exulzeration oder bei Verhaltensänderung, die mutmaßlich auf das Tumorstadium zurückzuführen waren, z.B. bei intramuskulärem Wachstum der Tumoren.



**Abbildung 34: Überleben und Tumorwachstum nach i.t. Injektion I**

A) Nach dem Erreichen eines durchschnittlichen Tumordurchmessers von 100 bis 200  $\mu\text{l}$  wurden verschiedene Viren intratumoral injiziert;  $5 \times 10^8$  pfu qwk x 3 Wochen. Die Tiere wurden beim Erreichen eines durchschnittlichen Tumordurchmessers von ca. 12 mm (Volumen ca. 800 bis 1000  $\text{mm}^3$ ) geopfert. B) Darstellung des Wachstums einzelner Tumoren in den mit verschiedenen Viren injizierten Gruppen;  $5 \times 10^8$  pfu qwk x 3 Wochen.

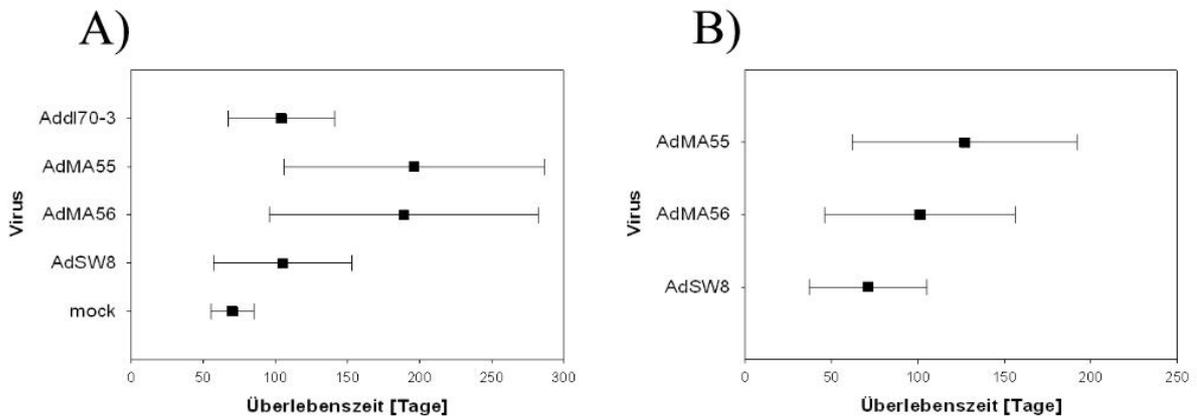
Zweitens, nach dem Erreichen eines Volumens von 100-200  $\text{mm}^3$  wurden Tumoren intratumoral mit  $5 \times 10^8$  pfu der bezeichneten Viren in 50  $\mu\text{l}$  injiziert; die Injektionen wurden täglich über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt; d.h. insgesamt fünf Injektionen pro Tumor. Die Tiere wurden anschließend über einen Zeitraum von bis zu 250 Tagen nach Tumorzellinjektion nachbeobachtet (s. Abbildung 35). Die Tumoren wurden geopfert bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 800 bis 1000  $\mu\text{l}$ .



**Abbildung 35: Überleben und Tumorwachstum nach i.t. Injektion II**

A) Kaplan-Meier Kurven zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von Balb/C *nu/nu* Mäusen nach intratumoraler Injektion von AdMA55, AdMA56 und AdSW8;  $5 \times 10^8$  pfu qd x 5 Tage, B) Darstellung des Tumorwachstums in Balb/C *nu/nu* Mäusen nach intratumoraler Injektion verschiedener Viren;  $5 \times 10^8$  pfu qd x 5 Tage

Beide Experimente ergaben ähnliche Ergebnisse. Komplette Remissionen mit einem völligen Verschwinden des Tumors wurden ausschließlich in den Mäusen beobachtet, deren Tumoren mit IL-2-Gen-tragenden Adenoviren (AdMA55 und AdMA56) intratumoral injiziert wurden. Dies war im ersten geschilderten Versuch in der Hälfte der Mäuse zu beobachten ( $n = 6$ ), s. Abbildung 34, beim zweiten Versuch bei zwei von vier Tieren (AdMA55), bzw. einem von vier Tieren (AdMA56), s. Abbildung 35. Kein Tier in den anderen Gruppen erlebte eine komplette Remission. Die mittels SPSS durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse der mittleren Überlebenszeiten ist mitsamt der 95%-Konfidenzintervalle dargestellt in Abbildung 36. Die Tendenz wies hin auf ein verlängertes Überleben der Tiere, die mit AdMA55 oder AdMA56 injiziert wurden. Allerdings war die Überlappung der Intervalle insbesondere mit denen der AdSW8-injizierten Tiere erheblich.

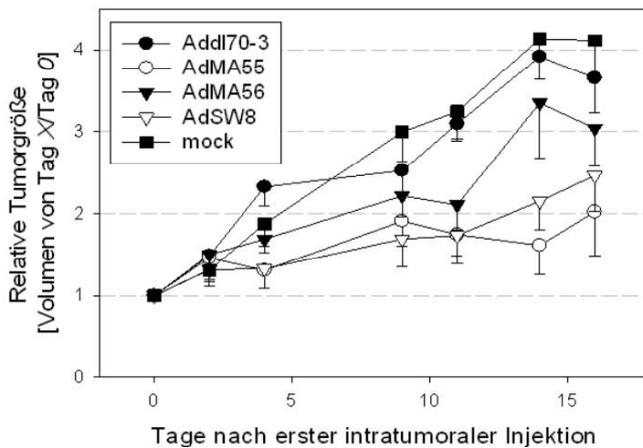


**Abbildung 36: Kaplan-Meier Analyse zeigt verlängertes Überleben von Mäusen nach i.t. Injektion von IL-2 Gen tragenden Adenoviren**

Die in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellten Daten wurden mittels einer Kaplan-Meier Analyse (SPSS, Chicago) untersucht und die mittlere Überlebenszeit in den mit verschiedenen Viren injizierten Gruppen ermittelt. Dargestellt sind die mittleren Überlebenszeiten mit dem 95% Konfidenzintervall. A) bezieht sich auf die in Abbildung 34 dargestellten Daten, B) auf die in Abbildung 35.

## 7.11 Verzögertes Tumorwachstum nach intratumoraler Adenovirusinjektion

Da, wie in der Diskussion, Abschnitt 8.2, ausführlich diskutiert werden wird, die Aussagekraft der Überlebenszeiten in einem nichtmetastasierenden Tiermodell eingeschränkt ist, ist der bevorzugte Parameter zur Beurteilung der antitumoralen Effektivität im Nacktmaus-Xenograft-Modell die Verzögerung von Tumorwachstum. Abbildung 37 stellt die relativen Wachstumsraten von Tumoren in Balb/C *nu/nu* Mäusen nach intratumoraler Injektion mit verschiedenen Adenoviren dar. Diese Daten sind Teil des schon in Abschnitt 7.10 und Abbildung 34 dargestellten Versuches; nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 100 bis 200 mm<sup>3</sup> wurden die Tumoren intratumoral über drei Wochen hinweg mit jeweils  $5 \times 10^8$  pfu pro Woche injiziert. Die mittleren relativen Tumolvolumina (Volumen an Tag x : Volumen an Tag 0) sind aufgetragen bis zu dem Zeitpunkt als erste Tiere aufgrund der Tumorgroße geopfert werden mußten. Tendenziell weisen die mit AdMA55 und AdSW8 injizierten Tumoren innerhalb der ersten 16 Tage nach der ersten Injektion das geringste Wachstum, mit einer Verdoppelung des Tumolvolumens innerhalb von 16 Tagen; die mit PBS (mock-) injizierten Tumoren hingegen wiesen im Mittel eine Vervierfachung des Tumolvolumens auf (s. Abbildung 37).



**Abbildung 37: Darstellung des verzögerten Tumorzustands nach initialer Adenovirusinjektion Ia**

Es wurden  $5 \times 10^8$  pfu pro Woche über 3 Wochen hinweg injiziert. Die Darstellung erfolgt als relatives Tumorzustand mit Standardfehler des Mittelwertes im Vergleich zum Tag der ersten Adenovirusinjektion. Dargestellt sind die Verläufe bis zur Opfertung der ersten Tiere.

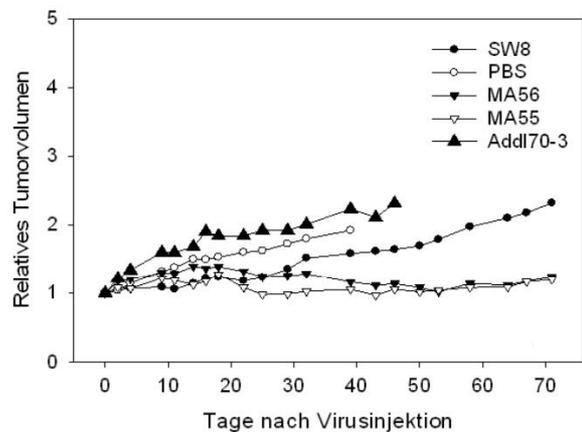
schoben war.

Die Unterschiede der Mittelwerte der Tumorzustände an Tag 16 nach intratumoraler Injektion wurden zunächst mittels des One-Way ANOVA Tests evaluiert ( $p = 0,017$ ); da somit Unterschiede hinsichtlich der Mittelwerte vorlagen, wurde eine post hoc Analyse mittels der Methode der geringsten signifikanten Differenzen durchgeführt (s. Tabelle 3).

Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte liegen vor zwischen den Gruppen Addl70-3 und AdMA55, AdMA55 und mock und AdSW8 und mock mit  $p < 0,05$ . Sämtliche anderen Unterschiede erreichten kein statistisch signifikantes Niveau von  $p < 0,05$ .

Eine ähnliche Darstellung erfolgt für einen anderen Versuch in Abbildung 39.

Abbildung 38 zeigt die mittleren Tumorzustände der Tiere im gleichen Versuch über einen Zeitraum von 70 Tagen. Hier war deutlich zu sehen, dass im weiteren Verlauf die Tumoren der mit AdMA55 und AdMA56 injizierten Tiere das geringste Wachstum zeigten, dies beruht vor allem auf dem Auftreten von kompletten Tumorzuständen, in beiden Gruppen bei drei von sechs Tieren. Die Darstellung ist nur eingeschränkt zu interpretieren, da durch die Herausnahme von Tieren aus dem Versuch ab dem 16. Tag nach intratumoraler Injektion (s. Abbildung 34) die Ermittlung der Mittelwerte der Gruppen einen Fehler aufwies und durch das Verbleiben der Tiere mit geringerem Wachstum nach unten ver-



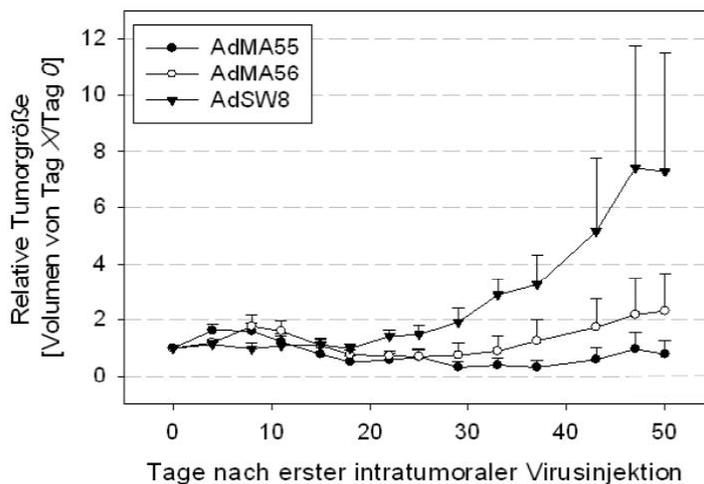
**Abbildung 38: Darstellung des verzögerten Tumorzustands nach initialer Adenovirusinjektion Ib**

Es wurden  $5 \times 10^8$  pfu pro Woche über 3 Wochen hinweg injiziert. Die Darstellung erfolgt als relatives Tumorzustand im Vergleich zum Tag der ersten Adenovirusinjektion.

	Ad170-3	AdMA55	AdMA56	AdSW8	mock
Ad170-3	x	<b>0,019*</b>	0,362	0,081	0,491
AdMA55	<b>0,019*</b>	x	0,121	0,495	<b>0,002*</b>
AdMA56	0,362	0,121	x	0,373	0,103
AdSW8	0,081	0,495	0,373	x	<b>0,014*</b>
mock	0,491	<b>0,002*</b>	0,103	<b>0,014*</b>	x

**Tabelle 4: Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Tumorumina in einigen Gruppen**

Nach Durchführung eines One-Way ANOVA Tests zur Ermittlung, ob an Tag 16 nach intratumoraler Injektion mit verschiedenen Viren signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Tumorumina bestehen (dieser besteht mit  $p = 0,017$ ), wurde eine post hoc Analyse mittels der Methode der geringsten signifikanten Differenzen (*least significant differences*) durchgeführt. Das berechnete Signifikanzniveau für das Vorliegen von Unterschieden zwischen den Mittelwerten der bezeichneten Gruppen ist in der Matrix-Tafel angegeben. Im allgemeinen wird ein Wert von  $p < 0,05$  als Maß für signifikante Unterschiede betrachtet. Signifikante Unterschiede wurden mit \* markiert.



**Abbildung 39: Darstellung des verzögerten Tumorwachstums nach initialer Adenovirusinjektion II**

Es wurden  $5 \times 10^5$  pfu pro Tag über fünf Tage hinweg injiziert. Die Darstellung erfolgt als relatives Tumorumin mit Standardfehler des Mittelwertes im Vergleich zum Tag der ersten Adenovirusinjektion. Dargestellt sind die Verläufe bis zur Opfertung der ersten Tiere.

vor allem auf der Tatsache, dass die Tumorumina, insbesondere in den mit AdSW8 injizierten Tieren sehr stark innerhalb der Gruppen variierten (s. Abbildung 35). AdMA55 und AdMA56 zeigten eine ähnliche Aktivität bei der Verzögerung des Tumorwachstums und bei der Verlängerung des Überlebens und waren AdSW8 tendenziell überlegen.

In dieser Versuchsreihe wurden Balb/C *nu/nu* Mäuse täglich mit  $5 \times 10^8$  pfu der bezeichneten Adenoviren über fünf Tage hinweg intratumoral injiziert. Die mittleren relativen Tumorumina sind wiederum aufgetragen bis zu dem Zeitpunkt (Tag 50 nach initialer intratumoraler Injektion) als erste Tiere aufgrund der Tumorgröße geopfert werden mußten. Die statistische Evaluation

mittels des One-Way ANOVA Tests (unter Annahme der Normalverteilung der Daten) zeigte jedoch, dass an Tag 50 noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Tumorumina bestehen ( $p = 0,128$ ). Die nonparametrischen Tests (unter Annahme, die Daten seien nicht normalverteilt) zeigten ebenfalls, dass an Tag 50 noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Tumorumina bestehen; so betrug  $p = 0,169$ , ermittelt mit dem Kruskal-Wallis H Test. Die Probleme bei diesen statistischen Tests beruhten

## 8 DISKUSSION

Die Verwendung eines replizierenden Adenovirus, welches gleichzeitig das IL-2 Gen trägt erschien sinnvoll, um eine additive oder synergistische Antitumorwirkung zu erzielen. Die hypothetisierten Elemente dieser Wirkung, d.h. die zytopathogenen Eigenschaften des Virus, die Virusfreisetzung und das Ausmaß der IL-2 Produktion im *in vitro* Modell werden in der Folge diskutiert; im Anschluß hieran erfolgt die Diskussion der im Xenograft Modell in der Nacktmaus erhobenen Befunde. Ein Erklärungsversuch der teilweise divergierenden Ergebnisse zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen schließt daran an. Der letzte Abschnitt bietet einen Ausblick auf weitere Entwicklungsmöglichkeiten, insbesondere auch im Hinblick auf eine Anwendung im Menschen.

### 8.1 *In vitro* Ergebnisse

#### 8.1.1 *Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien*

Mittels Infektion verschiedener Zelllinien mit einem nichtreplizierenden EGFP-Gen tragenden Adenovirus und nachfolgender durchflußzytometrischer Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die Infizierbarkeit der verschiedenen verwendeten Zelllinien *in vitro* stark unterschied. Gemessen an der ermittelten  $MOI_{50}$  waren HeLa und DU145 Zellen nahezu gleichermaßen gut infizierbar, während die Infizierbarkeit der PC-3 Zellen etwa um den Faktor 60 darunter lag; die Infizierbarkeit von LNCaP Zellen lag im mittleren Bereich (s. Tabelle 2). Diese Ergebnisse sind gut mit denen der Literatur vereinbar. So konnten Okegawa et al. zeigen, dass bei der PC-3 Zelllinie der adenovirale Rezeptor CAR stark herunterreguliert ist (Okegawa et al. 2000). Zudem konnten sie in ihrer Untersuchung zeigen, dass die Expression von CAR nicht nur die Sensitivität für eine adenovirale Infektion steigerte, sondern auch, dass die Expression von CAR selbst inhibitorisch auf das Wachstum androgen-unabhängiger Prostatakarzinomzellen wirkt. Fortgeschrittene Prostatakarzinome besitzen jedoch im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren oft eine starke CAR Expression und sind somit einer adenoviralen Gentherapie, zumindest von diesem Standpunkt her, gut zugänglich (Rauen et al. 2002; Pandha et al. 2003). Die *in vitro* Evaluation der verwendeten Viren war wichtig, um darzulegen, dass die verwendeten Zelllinien tatsächlich permissiv waren für eine adenovirale Infektion. Die Permissivität einer Zelllinie für die adenovirale Infektion und Replikation ist kein Alles-oder-Nichts-Phänomen; alle Zelllinien befinden sich in einem weiten Spektrum der Infizierbarkeit, von hervorragend infizierbar bis praktisch nicht infizierbar. Für das Ausmaß der Permissivität gibt es mehrere Parameter. Zu den wichtigsten zählt die Expression der für die virale Adhäsion und Internalisation wichtigen zellulären Oberflächenproteine. So konnte gezeigt werden, dass Zellen, die kein oder nur sehr wenig CAR (*Coxsackievirus-adenovirus-receptor*) exprimieren,

---

---

welches für die primäre Adhäsion der meisten Adenoviren, mit Ausnahme der Gruppe B Adenoviren, notwendig ist, sehr schlecht infizierbar sind (Roelvink et al. 1998; Hidaka et al. 1999). Li et al. zeigten, dass der Verlust von CAR auf Blasenkarzinomzelllinien einen großen Einfluss auf die Effektivität einer adenovirusvermittelten Gentherapie hat (Li et al. 1999). Douglas et al. konnten *in vivo* im Xenograftmodell in der Nacktmaus die Abhängigkeit einer effizienten Onkolyse durch replizierende Adenoviren von der Expression des primären zellulären Adenovirus-Rezeptors durch die Tumorzellen belegen; hierfür verwendeten sie Zelllinien, die sich einzig in der Expression eines für das Adenovirus Typ 5 *fiber-knob*-Protein artifiziellen Zelloberflächenrezeptors unterscheiden (Douglas et al. 2001). Ähnliches gilt für das Vorhandensein, der für die engere Wechselwirkung und Penetration notwendigen Internalisierungsrezeptoren, den Integrinen  $\alpha_V\beta_3$  und  $\alpha_V\beta_5$ . Pearson et al. wiesen nach, dass insbesondere die Spiegel an  $\beta_3$ -Integrin in verschiedenen humanen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien mit der Transgenexpression nach Infektion mit transgenen Adenoviren korrelieren (Pearson et al. 1999). Takayama et al. untersuchten den Einfluß der Spiegel an  $\alpha_V\beta_5$  auf die Transgenexpression nach Infektion mit einem *lacZ*-Gen-tragenden Adenovirus; hier zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen  $\alpha_V\beta_5$ -Spiegel und *lacZ*-Expression der verwendeten Zellen (Takayama et al. 1998). Kürzlich konnten Davison et al. zeigen, dass zusätzlich das  $\alpha_V\beta_1$  Integrin ebenfalls die Penetration von Adenoviren in Lungenadenokarzinomzellen moduliert (Davison et al. 2001); Li et al. evaluierten die Funktion von  $\alpha_V\beta_1$  als Adenovirus Korezeptor (Li, Brown et al. 2001). Communal et al. zeigten, dass die abnehmende Infizierbarkeit alternder Kardiomyozyten mehr von einer Herunterregulation der Integrin-Internalisierungsrezeptoren als auf einer Beeinträchtigung der Adenovirus-CAR-Interaktion abhängt (Communal et al. 2003).

Insgesamt zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass selbst bei einer Infektion mit einer berechneten pfu pro Zelle (MOI) von weniger als 0,5 mehr als die Hälfte der Zellen eine EGFP-spezifische Fluoreszenz in einem Maße zeigten, die diejenige von nicht infizierten Zellen überstieg und diese Zellen somit EGFP exprimierten. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Die Bestimmung der Viruskonzentration mittels *Plaque Assay* (s. 6.2.4) erfasst nur diejenigen Viruspartikel, die in der Lage sind, in 293 Zellen zu replizieren und einen zytopathischen Effekt zu erzeugen; es handelt sich somit um eine Messung, die stark abhängig ist von der Funktionalität des Virus. Es ist notwendig, dass das Virus den vollständigen Replikationszyklus einschließlich terminaler Lyse durchlaufen kann und hierbei intakte Viruspartikel produziert werden. Jedoch ist bekannt, dass während des adenoviralen Replikationszyklus eine große Menge überschüssiger nichtverpackter DNA und nicht komplett funktionsfähiger Virione gebildet wird (Shenk 1996). So liegt die Ratio von durch physikalisch (photometrisch) bestimmter Viruspartikelkonzentration und durch *Plaque Assay* bestimmter pfu-Konzentration bei CsCl-aufgereinigten Virusstammlösungen bei guter Präparation im Bereich von 25 bis 100. Auf ein funktionelles Viruspartikel (pfu) kommen demnach 25 bis 100 im Sinne der Plaquebildungsfähigkeit nicht voll funktionelle Viruspartikel (Mittereder et al. 1996b). Einige dieser Viruspartikel, denen die Fähigkeit fehlt, eine produktive Replikation und Lyse zu erzeugen sind mutmaßlich in der Lage die initialen Schritte des

---

---

adenoviralen Replikationszyklus in 293 Zellen durchzuführen, mit der Expression früher viraler Gene und auch von Transgenen. Der in diesem Experiment gesehene Effekt beruht daher wahrscheinlich hierauf, zumal die verwendete CsCl-aufgereinigte Virusstammlösung noch eine deutlich schlechtere Viruspartikel:*pfu*-Ratio (400:1) aufwies als die oben unter optimalen Bedingungen angegebene. Dennoch sind diese Ergebnisse aber in Bezug auf den Vergleich der verschiedenen Zellen verwertbar, da jeweils die gleiche Virusstammlösung verwendet wurde. Diese Phänomene weisen darauf hin, wie wichtig es ist, insbesondere im Hinblick auf eine klinische Anwendung, dass reproduzierbare Quantifizierungsmöglichkeiten für Adenoviren standardmäßig eingeführt werden. Die verwendeten Methoden, wie z.B. Elektronenmikroskopie, Gentransfer Assay, Plaque Assay, optische Absorption und Spektrophotometrie sind nur teilweise untereinander vergleichbar (Mittereder et al. 1996b; O'Carroll et al. 2000).

Ein weiterer Erklärungsansatz betrifft das Proliferationsverhalten der infizierten Zellen. Sollten infizierte Zellen schneller replizieren als nichtinfizierte, so exprimierten in den folgenden Generationen proportional mehr Zellen EGFP, da auch jeweils die Tochterzellen einer EGFP-exprimierenden Zelle EGFP exprimieren. Jedoch besteht kein Hinweis, dass ein solcher Effekt der adenoviralen Infektion mit einem nichtreplizierenden Adenovirus bestünde. AdEGFP als adenoviraler Vektor der ersten Generation besitzt eine Deletion der E1A Region, deren Genprodukte für einen Übertritt der infizierten Zellen in die S-Phase des Zellzyklus verantwortlich wären (s. 4.3.2.3).

Des Weiteren könnte die verwendete Virusstammlösung mit einem replikationskompetenten Adenovirus (RCA) kontaminiert gewesen sein, wie es durch homologe Rekombination während der Produktion in 293 Zellen entstehen kann. Dies würde zu einer Replikation und Propagation des Vektors führen und zu einer nicht nachvollziehbaren Verzerrung des Zusammenhangs zwischen verwendeter MOI und Proportion infizierter Zellen. Die verwendete Virusstammlösung wurde nicht auf das Vorliegen einer Kontamination mit RCA hin untersucht, daher ist diese Möglichkeit nicht auszuschließen.

### **8.1.2 Zytopathischer Effekt**

Das replizierende IL-2-Gen-tragende Adenovirus war in der Lage, bei allen untersuchten Zelllinien einen zytopathischen Effekt hervorzurufen, der den von nichtreplizierenden Viren bei weitem übertraf (s. 7.2). Die nichtreplizierenden Viren erzielten nur in hohen Konzentrationen eine zytopathische Wirkung; diese Wirkung ist mutmaßlich auf direkte toxische Effekte der viralen Capsidproteine zurückzuführen. So ist bekannt, dass insbesondere freie Penton-Capsomere einen zytopathischen Effekt zur Folge haben (Horwitz 1996). Andere Mechanismen sind beschrieben, unter anderem die vor allem *in vivo* eine wichtige Rolle spielende Capsidprotein-abhängige Aktivierung der zellulären Transkriptionsfaktorfamilie NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) (Borgland et al. 2000). Die rel-NF- $\kappa$ B Familie ist eine pleiotrope Familie von Transkriptionsfaktoren, die bei der Transkription zahlreicher Gene im Rahmen der adaptiven und

---

---

nichtadaptiven Immunantwort eine Rolle spielen (Janeway et al. 2001); sie sind auch beteiligt an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen. Des Weiteren haben Higginbotham et al. *in vitro* zeigen können, dass humane periphere mononukleäre Zellen Exposition gegenüber adenoviralen Capsidproteinen große Mengen verschiedener Zytokine, u.a. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und GM-CSF, sezernieren; diese Effekte waren nicht abhängig von dem Vorhandensein viraler DNA (Higginbotham et al. 2002). Ein zytopathischer Effekt durch die Expression viraler Gene sollte hingegen nicht stattfinden, da es durch die Deletion der E1-Region gar nicht erst zu einer Transaktivierung und Expression der für virale Replikation und lytischen Zyklus notwendigen Gene (s. 4.3.2.3) kommt.

Der zytopathische Effekt wurde zunächst dargestellt mittels Kristallviolett-färbung adhärenter Zellen nach Infektion. Auch bei geringen Infektionsintensitäten, gemessen an der MOI (*multiplicity of infection*) kam es zur deutlichen Ausprägung dieses Effektes. Diese Effekte wurden noch einmal präziser dargestellt mittels eines Zellproliferationsassays. Hierbei ergaben sich scheinbar einige kleinere Unterschiede hinsichtlich der Intensität des zytopathischen Effektes; dieser schien in den Versuchen mit Kristallviolett-färbung größer als in denen mittels MTT Assay. Dieser Unterschied war mitbedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Virusstammlösungen. So wurden für einige Versuche mit Kristallviolett-färbung nichtaufgereinigte Stammlösungen benutzt, für die mit MTT-Assay CsCl-gereinigte Virusstammlösungen. Nichtaufgereinigte Virusstammlösungen enthalten neben den Viruspartikeln zusätzlich große Mengen an zellulärem Debris und nichtintakten Capsidproteinen, die möglicherweise zusätzlich einen toxischen Effekt auf die infizierten Zellen ausüben.

*Green fluorescent protein* (GFP) als autofluoreszierendes Protein wurde ursprünglich bei *Aequorea victoria* beschrieben (Prasher et al. 1992). Seitdem gibt es zahlreiche Anwendungen als Reporter gen für GFP und modifizierte Varianten; so weist das auch in dieser Arbeit verwendete *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) zwei andere Aminosäuren im Chromophoren-Bereich auf und erzielt hierdurch eine höhere Fluoreszenzaktivität und eine Verschiebung des Emissionsspektrums in den gelbgrünen Bereich; (Misteli und Spector 1997). Zunächst wurde GFP als nicht toxisch beschrieben, mit Ausnahme von GFP-Fusionsproteinen, die im Zellkern lokalisiert waren und dort eher eine Schädigung verursachten als solche im Zytoplasma (Misteli und Spector 1997); insbesondere wurde vermutet, dass es hier bei langen Exzitationszeiten zur Bildung von freien Radikalen mit darauf folgender Schädigung zellulärer Strukturen kommen kann. Liu et al. aber zeigten in verschiedenen Zelllinien, dass die Expression von GFP in vielen Zellen zur Induktion der Apoptose führt (Liu et al. 1999); so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei EGFP nicht um ein inertes Produkt handelt (Torbett 2002).

Da in dieser Arbeit nur das replizierende IL-2-Gen tragende Virus (AdMA55) das Reporter gen EGFP trägt, ist dieser Effekt grundsätzlich nicht auszuschließen. Jedoch zeigten in den *in vitro* Versuchen sowohl das replizierende IL-2-produzierende als auch das replizierende Virus äquivalente Ergebnisse in den Zellviabilitätsuntersuchungen. Daher spielte das Reporter gen hier mutmaßlich keine oder nur eine sehr geringe Rolle in der Induktion eines zytotoxischen Effektes.

---

Der bei PC-3 Zellen in geringerem Maße auftretende zytopathische Effekt schien zunächst in gutem Einklang zu sein mit der schlechteren Infizierbarkeit dieser Zellen; eine differenzierte Betrachtung dieses Sachverhaltes, insbesondere in angesicht der Tatsache, dass diese Zellen einen hohe Virusfreisetzung aufweisen, erfolgt im nächsten Abschnitt (s. 8.1.3).

### **8.1.3 Replikationsfähigkeit**

Die *in vitro* Ergebnisse zeigten, dass das verwendete Adenovirus eine Replikationsfähigkeit in allen verwendeten Prostatakarzinomzelllinien besaß. Die gemessene Viruskonzentration im Überstand (in pfu/ml) korrelierte allerdings nicht völlig mit dem durch verschiedene Methoden demonstrierten zytopathischen Effekt; so produzierten PC-3 Zellen trotz des geringen zytopathischen Effekts hohe Viruskonzentrationen im Überstand. Das IL-2-Gen tragende Adenovirus zeigte hierbei nahezu identische Mengen an freigesetzten funktionsfähigen Viruspartikeln (pfu) wie das nicht-IL-2-Gen-tragende Adenovirus. Dies zeigte, dass die zusätzliche Insertion des IL-2-Gens keinen starken Einfluss hatte auf die Replikationsfähigkeit des Virus. Dies war deshalb ein kritischer Punkt, da die E1B55K-deletierten (und E3-deletierten) Adenoviren im Vergleich zu den E1- und E3-deletierten Adenoviren eine geringere Kapazität zur Insertion von Transgenen aufwiesen. Wie zuvor dargelegt (s. 4.3.3) liegt die maximale Kapazität des adenoviralen Genoms, limitiert durch die Verpackbarkeit, bei etwa 105% der Größe des Wildtyp-Genoms (Bett et al. 1993; Zhang 1999). Bei einer Größe des Genoms von etwa 36 kbp bedeutet dies eine zusätzlich aufnehmbare Menge von etwa 1,8 kbp, zusätzlich natürlich die durch Deletion viraler Sequenzen freigewordene Kapazitäten. Je weniger virale Sequenzen deletiert sind, desto geringer ist die Größe der inserierbaren Transgene und Expressionskassetten. Die Größe der IL-2-Expressionskassette einschließlich HCMV-Promoter, IRES, IL-2-Gen, EGFP, SV40pA beträgt etwa 2,5 kbp. Die E3 Deletion im Plasmid pBHG10, welches zur Konstruktion von AdMA55 verwendet wurde besitzt eine Länge von 2,7 kbp (Bett et al. 1994); somit ist man inklusive der oben bezeichneten Expressionskassette und der kleinen Deletion in der E1 Region bei einer Genomgröße im Bereich des Wildtypvirus.

In Vorversuchen konnte bereits in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Virusfreisetzung des E1B-55K-deletierten Adenovirus in den verwendeten Prostatakarzinomzelllinien um den Faktor 45 bis 54 unter der eines Wildtyp-Adenovirus lag (Anton 1999b).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass gezeigt werden konnte, dass der Zusammenhang zwischen Infizierbarkeit, zytopathischem Effekt und erzielter Virusfreisetzung, nicht trivial war. So erzielte die mit Abstand am schlechtesten infizierbare Zelllinie PC-3 (s. 7.1) mit dem geringsten zytopathischen Effekt nach Infektion (s. 7.2) die höchste Viruskonzentration im Überstand, die jene von DU145 Zellen um den Faktor 10 und jene von LNCaP Zellen um den Faktor 5 (nach Normierung auf die Zellzahl) überstieg (s. Abbildung 24). Hierzu stellen Kirn et al. fest, dass der Zeitpunkt des Zelltodes die wichtigste Determi-

---

---

nante für die Größe der viralen Replikation ist, so sei ein verzögertes Eintreten des Zelltodes mit einer erhöhten Virusfreisetzung assoziiert (Kirm et al. 1998). Es ist bekannt, dass virale Faktoren für den Zeitpunkt des Zelltodes eine wichtige Rolle spielen, so führt die Deletion des viralen E1B19K-Gens, dessen Genprodukt einer Apoptose entgegenwirkt, zu einem frühen Eintritt des Zelltodes und einer verminderten Virusfreisetzung (Subramanian et al. 1984). Welche zellulären Faktoren hierfür bei der adenoviralen Replikation eine wichtige Rolle spielen, ist bislang unzureichend definiert. Worauf dieses im Falle der Zelllinie PC-3 beruhte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

Eine weitere, einfachere Erklärung für die Divergenz von zytopathischem Effekt und Ausmaß der Virusfreisetzung ist, dass durch einen sehr früh eintretenden zytopathischen Effekt bei DU145 und LNCaP Zellen die Zahl der infizierbaren Zellen, die einen wiederholten Ablauf von Infektion-Replikation-Virusfreisetzung durchlaufen können, stark reduziert war.

Die in der Einleitung bereits ausführlich diskutierte ohnehin fragliche Spezifität des verwendeten E1B55K-deletierten Virus für Tumorzellen mit Störungen des p53-Signalweges (s. 4.3.7) erwies sich für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien als nicht gültig. Dies konnte in Versuchen nachgewiesen werden, die bereits vor der vorliegenden Untersuchung in der Arbeitsgruppe erhoben wurden. So war die Virusfreisetzung nach Infektion aller verwendeten Prostatakarzinomzelllinien mit einem E1B55K-deletierten Virus um den Faktor 45 bis 55 unter der nach Infektion mit einem Wildtyp-Adenovirus (s. 4.7), wobei einzig die Zelllinie LNCaP zwei Wildtyp-Allele des p53-Gens aufweist, die Zelllinien DU145 und PC-3 jedoch inaktivierende Mutationen (Carroll et al. 1993), s. auch 4.7. Dieser Befund ist in Übereinklang mit zahlreichen Publikationen, die einen einfachen Zusammenhang zwischen p53-Status der Zelle und Replikationsfähigkeit von E1B55K-deletierten Adenoviren anzweifeln (s. 4.3.7) (Goodrum und Ornelles 1998; Hall et al. 1998; Rothmann et al. 1998; Dix et al. 2000; Georger et al. 2002).

#### **8.1.4 IL-2 Produktion**

Das replizierende IL-2-Gen-tragende Adenovirus war in der Lage *in vitro* sehr hohe IL-2-Mengen zu produzieren (s. Abbildung 25). Diese überstiegen die von nichtreplizierenden IL-2-Gen-tragenden Viren produzierten Mengen erheblich, um den Faktor 10 bis 30. Diese Steigerung wurde trotz der Insertion des Gens in die deletierte E3-Region des Virusgenoms erzielt, während das nichtreplizierende IL-2-Gen-tragende Virus die Expressionskassette in der E1-Region trägt.

Wie in weiteren Experimenten in dieser Arbeit, z.B. durch Infektion mit Adenoviren mit Transgeninsertion in verschiedenen Regionen gezeigt wurde und Koinfektion solcher Viren mit einem replizierenden Virus, bewirkt die Insertion des Gens in die E1-Region gegenüber der in die E3-Region eine Steigerung der Transgenexpression um den Faktor 10 bis 30. Diese Effekte beruhten mutmaßlich auf den Effekten

---

---

der sich *upstream* der E1-Region befindlichen adenoviralen *Enhancer* (Hearing und Shenk 1983; Hearing und Shenk 1986). Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse erschließt sich, dass im replizierenden System eine große Verstärkung der Genexpression erzielt werden kann. So war die IL-2 Konzentration im Überstand infizierter Zellen nach Infektion mit einem E1B55K-deletierten das IL-2 Gen in der E3 Region tragenden Virus (AdMA55) um den Faktor 1400 erhöht gegenüber der nach Infektion mit einem E1- und E3-deletierten Virus mit dem IL-2 Gen in der E3 Region (Ad $\Delta$ E1MA55) (s. Abbildung 26). Dieser Effekt sollte zum einen auf der Propagation des Vektors über mehrere Infektionszyklen und damit Infektion von mehr Zellen als im nichtreplizierenden System beruhen, zum anderen auf der Replikation der viralen DNA selbst, da im Rahmen des Replikationszyklus die virale DNA transkribiert und die Transkriptionsprodukte translatiert werden; hierbei werden große Mengen überschüssiger DNA und mRNA gebildet (s. 4.3.2.3), auch solche des Transgens. Hiermit wurde die Hypothese von Hermiston, die besagt, dass sich durch die Verwendung eines replizierenden transgenen Virus die Transgenexpression deutlich steigern ließe, für das *in vitro* Modell bestätigt (Hermiston 2000).

## 8.2 Diskussion des Tiermodells

Das Nacktmausmodell ist in mehrfacher Hinsicht ein imperfektes Modell für die Effektivität einer adenovirusvermittelten und immunologischen Therapie.

Ein Bias gegen den Erfolg des Modells in der vorliegenden Untersuchung beruhte auf der Abwesenheit eines Hauptteils der adaptiven Immunantwort; sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort sind großen qualitativen und quantitativen Einschränkungen unterworfen; deren Einfluss konnte somit kaum oder gar nicht evaluiert werden. Ein Bias für den Erfolg des Modells war die Verwendung eines humanen (xenogenen) Tumors im Mauswirtsorganismus und der Tropie des verwendeten humanen Adenovirusderivates; die Zellen des Wirtsorganismus (Mauszellen) sind nicht permissiv für die Replikation eines humanen Adenovirus (Horwitz 1996). Hierdurch war eine idealisierte Spezifität des Vektors für das Zielgewebe vorgegeben. Das Replikationsverhalten in normalen Zellen konnte nicht mit diesem Modell evaluiert werden. Auch kann sich das Verhalten von Tumorzellen *in vivo*, im Zusammenspiel mit den anderen Geweben des Wirtes völlig von dem *in vitro* beobachteten Verhalten unterscheiden. Mögliche toxische Nebenwirkungen, z.B. durch hohe systemische IL-2-Spiegel konnten nicht evaluiert werden, da die wesentlichen Mediatoren der Hauptnebenwirkungen, T-Lymphozyten, in der Nacktmaus nicht vorhanden sind.

Zusammengefasst handelt es sich beim Nacktmausmodell jedoch um ein Standardmodell in der Evaluation onkologischer Therapiestrategien (Khleif und Curt 2000). Mäuse mit dem nude-Phänotyp weisen eine inaktivierende Mutation in beiden Allelen des *whn*-Gens auf Chromosom 11 auf (Nehls et al. 1994; Schorpp et al. 1997). Dies führt zu einer Unterbrechung des normalen Haarwuchses und der Thymusentwicklung. Daher sind Nacktmäuse immundefizient, vorwiegend bedingt durch einen schwerwiegenden

---

---

T-Zell-Mangel und gut geeignet zur Heterotransplantation von Tumoren, beispielsweise zur Transplantation von Tumorzellen menschlichen Ursprungs, insbesondere auch von DU145 Zellen (Mickey et al. 1977). Kürzlich sind mehrere Fälle einer homozygoten Nonsense-Mutation im menschlichen *whn*-Gen beschrieben worden (Frank et al. 1999). Der menschliche Nude-Phänotyp ist äquivalent und umfasst eine kongenitale Alopezie, Onychodystrophie und eine schwere T-Zell-Immundefizienz. Nacktmäuse besitzen Komponenten des nichtadaptiven Immunsystems, wie z.B. Makrophagen und NK-Zellen, und auch eine geringe Aktivität des B-Zellsystems, wobei insbesondere die Serumspiegel der IgG-Unterklassen sehr niedrig sind, hingegen die Serumspiegel von IgM im Normalbereich liegen; die Serumspiegel an IgA sind moderat vermindert (Luzzati und Jacobson 1972). Es sind sehr geringe Mengen an maternalen T-Zellen vorhanden, die von den heterozygoten Muttertieren transplazentar übertragen werden. Diese spielen im Rahmen der Immunantwort der Nacktmäuse aber keine Rolle (Khleif und Curt 2000). Nacktmäuse erlauben die Xenotransplantation humaner Tumoren. Für die meisten humanen soliden Tumoren sind stabile Zelllinien etabliert, die eine *in vivo* Untersuchung verschiedener Therapiemodalitäten erlauben. Die Tumoren können im Tiermodell auf vielfältige Weise induziert werden. Häufig verwendet wird die subkutane Injektion von Zellsuspensionen, wie auch in der vorliegenden Arbeit. Abhängig vom klonogenen Potential der verwendeten Zelllinie entstehen, bei hohem klonogenen Potential, innerhalb von Tagen, bei geringem klonogenen Potential, bis hin zu Monaten nach Injektion subkutane Tumoren. Auch die Verwendung der auch von uns im Nacktmausmodell benutzten humanen Prostatakarzinomzelllinie DU145 ist bereits in der Literatur beschrieben (Mickey et al. 1977). Andere Möglichkeiten sind die intravenöse Injektion zur Simulation des Entstehens von Lungenmetastasen, die intraperitoneale Injektion, um eine peritoneale Tumorbildung zu erreichen, intrakranial, intrasplenisch oder renal subkapsulär. Sich nach subkutaner Applikation entwickelnde Tumoren bleiben in der Regel subkutan und wachsen nichtinvasiv und bilden auch keine Metastasen, ihr Wachstum entspricht dem eines benignen Tumors; dies beruht möglicherweise auf dem Vorhandensein unspezifischer Komponenten des Immunsystems, z.B. NK-Zellen (Heberman 1978; Holden et al. 1978). Im Nacktmausmodell sind daher einige Parameter zur Überprüfung der therapeutischen Effektivität besser geeignet als andere. Zum Beispiel ist die Evaluierung der Überlebenszeit nicht angemessen, da kein invasives Wachstum oder eine Metastasierung stattfindet; der limitierende Faktor im Tierversuch ist daher häufig die Beeinträchtigung und Behinderung der Tiere durch das große Tumolvolumen, so dass eine Opferung aus humanen Gründen notwendig wird, ohne dass eine vitale Bedrohung vorhanden ist (Donovan und Brown 1995a). Im metastasierenden oder invasiv wachsenden Modell ist andererseits eine Untersuchung der Überlebensfunktion sinnvoll und praktikabel.

Hinzu kommt, dass sich auch andere Parameter der xenotransplantierten Tumoren im Vergleich zum Ursprungstumor ändern; dies trifft z.B. auf die Tumorverdoppelungszeiten und auf die Vaskularität der Tumoren zu, so wachsen xenotransplantierte Tumoren schneller und sind in der Regel besser vaskularisiert und besitzen eine geringere Nekroseneigung. Die morphologischen und biochemischen Eigen-

---

schaften der xenotransplantierten Tumoren bleiben hingegen weitestgehend erhalten. Dieses ist auch für die verwendete DU 145 Zelllinie belegt; die sich subkutan entwickelnden Tumoren entsprechen besonders in den Regionen epithelialen Wachstums den auch im ursprünglichen Patienten vorgefundenen Muster (Mickey et al. 1977).

Die aussagekräftigsten Parameter in der Evaluation von Therapiestrategien sind aus den oben erwähnten Gründen die Verzögerung des Tumorwachstums und das Erzielen kompletter Remissionen. In zahlreichen Untersuchungen ist die Korrelation zwischen diesen experimentellen Parametern und der wirklichen klinischen Ansprechrate belegt (Fodstad et al. 1980; Giovanella et al. 1983; Neely et al. 1983). In unseren Experimenten repräsentierte die Darstellung der Überlebensfunktion gewissermaßen das Tumorwachstum, da Tumoren beim Erreichen eines Volumens von 800 bis 1000  $\mu\text{l}$  oder bei Exulzeration durch rasches Tumorwachstum geopfert wurden. Diese Überlebensfunktion ist aber nicht gleichzusetzen mit Überlebensanalysen, wie sie z.B. in klinischen Studien zur Anwendung kommen.

## **8.3 *In vivo* Ergebnisse**

### **8.3.1 *Tumorwachstum***

Es konnte gezeigt werden, dass sich nach subkutaner Injektion von  $5 \times 10^6$  DU145 Zellen bei allen Balb/C *nu/nu* Mäusen nach drei bis vier Wochen eines Volumens von 100 bis 200  $\text{mm}^3$  entwickelten (s. 7.7). Die Zelllinie DU145 lag mit diesem Zeitraum im Mittelfeld der etablierten Zelllinien, was die Klonogenität betrifft. Es existieren sowohl Zelllinien, die deutlich schneller Tumoren entwickeln, innerhalb von Tagen, als auch solche, die deutlich länger benötigen, innerhalb von Monaten (Khleif und Curt 2000).

### **8.3.2 *IL-2 Produktion***

Sowohl nach Injektion des replizierenden als auch des nichtreplizierenden IL-2-Gen-tragenden Adenovirus konnten Plasma-hIL-2-Spiegel in Balb/C *nu/nu* Mäusen nachgewiesen werden (s. 7.8). Von den *in vitro* Daten ausgehend, lagen die IL-2-Konzentrationen im Falle des nichtreplizierenden Adenovirus unerwarteterweise höher als bei den replizierenden Viren, auch wenn diese Unterschiede nicht auf einem signifikanten Niveau bestanden (s. Abbildung 29). Dieser Effekt kann verschiedene Ursachen haben. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass die Replikationsfähigkeit des replizierenden Virus AdMA55 *in vivo* eingeschränkt war. Hierdurch fiel ein entscheidender Effekt weg, der für die starke Erhöhung der IL-2-Produktion eines replizierenden IL-2-Gen-tragenden Virus gegenüber einem nichtreplizierenden IL-2-Gen-tragenden Virus verantwortlich ist: die virale Replikation und Propagation in-

---

---

nerhalb einer Zellpopulation und zum anderen die Replikation viraler DNA innerhalb der einzelnen Zelle. Des Weiteren ist zu beachten, dass, die Transgenexpression bei Insertion der Expressionskassette innerhalb der E3-Region gegenüber der Insertion in der E1 Region um den Faktor 35 vermindert war (s. Abbildung 25). Sollte die *in vivo* Replikationsfähigkeit von AdMA55 vermindert oder nicht vorhanden gewesen sein, käme dieser Effekt zum Tragen. Das verwendete Virus AdMA55 besitzt die Expressionskassette in der E3 Region, das nichtreplizierende Virus der ersten Generation AdMA56 hingegen in der E1 Region. Dass nach intratumoraler Injektion von AdMA55 Plasma-IL-2-Konzentrationen ermittelt werden konnten, die in der gleichen Größenordnung wie die nach Injektion von AdMA56 lagen, bedeutet, dass der negative Effekt auf die Transgenexpression wahrscheinlich zumindest teilweise durch virale Replikation wieder aufgehoben wurde.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die gemessenen Plasma-IL-2 Konzentrationen nicht auf einer IL-2 Produktion innerhalb des Tumorexografts beruhten, sondern auf einer IL-2 Produktion in murinen Organen, z.B. in der Leber. Bekanntermaßen erlauben Zellen und Gewebe murinen Ursprungs eine Infektion mit humanen Adenoviren, aber keinen vollständig ablaufenden Replikationszyklus (Horwitz 1996). Hierdurch käme wiederum die differentielle Insertion des Transgens in der E1 Region (AdMA56) gegenüber der E3 Region (AdMA55) zum Tragen (s.o.). Leider konnte aufgrund technischer Schwierigkeiten kein verlässlicher immunhistochemischer Nachweis von intratumoralem IL-2 gelingen, jedoch wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Adenovirusnachweis durch Immunhistochemie nachgewiesen, dass tatsächlich eine Infektion und Transduktion der Tumoren stattgefunden hat (s. 7.9). Des Weiteren sprach gegen eine Produktion von IL-2 durch Lebergewebe, dass nicht bei allen mit IL-2-Gen tragenden Viren injizierten Tieren IL-2 im Plasma nachgewiesen werden konnte. Dies sollte der Fall sein, beruhte die IL-2 Expression einzig auf der Resorption der Adenoviren aus dem subkutanen Gewebe in die Zirkulation, Transport in die Leber und Transduktion von Hepatozyten. Jedoch wäre es in der Zukunft sinnvoll, diese Möglichkeit auszuschließen, z.B: durch immunhistochemische Analyse der Lebern, Bestimmung von IL-2 mittels ELISA in Leberhomogenisaten oder dem Nachweis von hIL-2 mRNA mittels rtPCR.

### **8.3.3 Tumorregression**

Enttäuschend war die fehlende Fähigkeit von AdSW8, einem Onyx-015-äquivalenten Adenovirus, eine Tumorregression herbeiführen zu können. In unserem Modell gelang es bei keinem Tier eine komplette Remission mit Verschwinden des Tumors herbeiführen zu können. Dies ist in anderen Studien gelungen. So konnten Bischoff et al. zeigen, dass mehr als die Hälfte aller C33A (Zervixkarzinom Zelllinie) Xenograft-Tumoren in der Nacktmaus nach intratumoraler Injektion eine komplette Remission aufweisen (Bischoff et al. 1996). Ähnliche Befunde gelingen im Nacktmaus-Xenograft-Modell für HLaC- (La-

---

rynkarzinom), RKO-, HCT116- und SW620-Zelllinien (Kolonkarzinom) (Bischoff et al. 1996; Heise, Williams, Olesch et al. 1999). In unseren Untersuchungen war *in vitro* die Fähigkeit von AdSW8 eine Tumorwachstumsverzögerung oder –regression zu erzeugen zwar besser als die nach Injektion von PBS oder Addl70-3 (nichtreplizierendes Virus ohne Transgen), erreichte jedoch nicht ein solches Maß an antitumoraler Wirkung wie die Injektion von AdMA55 oder AdMA56. Deren Effekte unterschieden sich nicht statistisch signifikant im Hinblick auf das Vermögen eine Tumorregression herbeizuführen. Im Vergleich zu den Angaben in der Literatur ist einschränkend darauf hinzuweisen, dass das in dieser Arbeit verwendete und in der Arbeitsgruppe konstruierte Virus AdSW8 im Gegensatz zu Onyx-015 keine Wildtyp-Ad5-E3-Region besitzt, sondern eine 2,7 kbp grosse Deletion, die unter anderem wichtige Gene enthält, die für den lytischen Infektionszyklus möglicherweise eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählt insbesondere das ADP (*adenovirus death protein*) (s. 4.3.2.3, Abbildung 7 und 8.4.5).

## **8.4 Unterschiedliche Befunde des onkolytischen Effekts im *in vitro* und im *in vivo* Modell**

Die Unterschiede im Vergleich der onkolytischen Aktivität im *in vitro* und *in vivo* Modell weisen darauf hin, dass die eindrucklichen *in vitro* erzielten Effekte des replizierenden Adenovirus in Bezug auf onkolytischen Effekt und Transgenexpression nicht in gleichem Maße *in vivo* stattfinden. Hierfür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen.

### **8.4.1 Verwendetes *in vitro* Modell**

Erstens, das *in vitro* Modell ist in mehrfacher Hinsicht ein idealisiertes Modell des Prostatakarzinoms. Die transformierten Zellen wachsen dort im Monolayer in Zellkulturschalen und es bestehen nur geringe physikalische Barrieren für die Distribution infektiöser Adenoviren. Die im *in vivo* Tumor vorhandenen desmoplastischen Elemente des Tumors, d.h. vor allem Bindegewebe und Blutgefäße, bestehen *in vitro* nicht. Dies spielt u.a. deshalb eine Rolle, weil die Zellen des Wirtsorganismus Maus nicht permissiv sind für die Replikation humaner Adenoviren (Horwitz 1996), wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden. So haben auch Sauthoff et al. kürzlich zeigen können, dass die Ausbreitung replizierender humaner Adenoviren in humanen Tumorenografts in der Nacktmaus durch Zellen und Gewebe murinen Ursprungs stark eingeschränkt ist; trotz Persistenz und Replikation von Adenoviren in den Xenograft-Anteilen humanen Ursprungs kommt es nicht zu einer Infektion aller Anteile des Xenografts und nicht zu einer Eradikation (Sauthoff et al. 2003). Hinzu kommen weitere physikalische Barrieren, z.B. Druckgradienten, die der Infiltration des Tumorgewebes entgegenwirken; der interstitielle Druck im Tumor ist häufig größer als im normalen umgebenden Gewebe (Jain 1994). Die von Sauthoff et al. beschriebenen

---

---

Schwierigkeiten bestehen in anderer Art auch in humanen Tumoren, da die Zellen des Bindegewebes und des Gefäßsystems, z.B. Fibrozyten und Endothelzellen wenig permissiv sind für eine virale Replikation. Jedoch konnte insbesondere für Gruppe C Adenoviren gezeigt werden, dass eine Adsorption, Penetration und auch Produktion früher viraler Proteine in Mauszellen stattfinden kann (Duncan et al. 1978; Ginsberg et al. 1991). Diese Barrieren sollten die Propagation replizierender Adenoviren innerhalb xenotransplanteder Tumoren deutlich erschweren.

Zweitens, ebenfalls in Bezugnahme auf die Eigenschaften des *in vitro* Modells, bestehen deutliche Unterschiede in der Zugänglichkeit des adenoviralen Rezeptors, CAR, zwischen der *in vitro* und der *in vivo* Situation. Wie Cohen et al. kürzlich gezeigt haben, ist CAR Bestandteil des *tight junction* (Zonula occludens) Komplexes, der für die Aufrechterhaltung der Diffusionsbarriere zwischen polarisierten Seiten epithelialer Gewebe und für die Aufrechterhaltung regionaler Unterschiede im Aufbau der Plasmamembranen verantwortlich ist (Bannister 1999; Cohen et al. 2001). Bei *in vitro* Infektionen, insbesondere von Zellen geringer Dichte in der Zellkulturschale, ist der virale Rezeptor, CAR, wesentlich besser zugänglich als bei dichtem konfluenten Monolayer und vor allem als bei Bildung eines Tumors mit polarisiertem Epithel *in vivo*. Dies beruht darauf, dass bei dispersem Wachstum keine *tight junctions* ausgebildet werden, und CAR daher nicht konzentriert und möglicherweise unzugänglich lokalisiert, sondern ubiquitär auf der Zelloberfläche verteilt ist.

Grill et al. verwendeten z.B. das organotypische multizelluläre Spheroidmodell, um die Eigenschaften der Virusausbreitung *in vitro* in einer dreidimensionalen Struktur zu untersuchen (Grill et al. 2002). Dieses Modell entspricht wesentlich besser den *in vivo* Bedingungen im Tumor; während in der Zellkulturschale im Monolayer praktische alle Zellen proliferieren, werden im Spheroid der größte Teil der Zellen in der G0-Phase angetroffen, die proliferierenden Zellen befinden sich dort in der Peripherie des Spheroids. Da eine deutliche Abhängigkeit der Empfindlichkeit von Zellen für einen adenovirusinduzierten Zelltod vom Zellzyklusstadium besteht ist dies ein wichtiges Kriterium für ein verbessertes *in vitro* Modell (Alemany et al. 2000).

Zusammen lassen diese beiden Phänomene den verminderten Plasma-IL-2-Spiegel bei AdMA55-injizierten gegenüber AdMA56 injizierten Mäusen erklären, da mutmaßlich die *in vitro* erzielten deutlich höheren IL-2 Spiegel mit AdMA55 auf einer Replikation des Vektors und einer überschüssigen Produktion viraler DNA und somit auch des IL-2-Transgens beruhen. Fällt diese Propagation des Vektors fort oder ist stark vermindert, so ist auch zu erwarten, dass die produzierten IL-2 Mengen deutlich geringer ausfallen.

#### **8.4.2 Position des Transgens**

---

Ein weiterer Effekt mag hier eine entscheidende Rolle spielen, denn durch die *in vivo* Daten konnte gezeigt werden, dass die IL-2 Spiegel der Tiere, die mit einem nichtreplizierenden Vektor injiziert wurden nicht nur jenen ebenbürtig waren, die durch Applikation eines replizierenden Vektors erzielt wurden, sondern dass sie diese sogar übertrafen, wenn auch nicht auf einem signifikanten Niveau. Eine mögliche Erklärung ist hier, dass die Position des Transgens innerhalb des adenoviralen Genoms eine wichtige Funktion hatte. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Insertion des Transgens in die deletierte E1-Region des adenoviralen Genoms im Gegensatz zur Insertion in die deletierte E3-Region die Expression des Transgens, in diesem Falle IL-2, um den Faktor 10 und 40, im nichtreplizierenden System und replizierenden System, respektive, steigern konnte. Da der replizierende Vektor die IL-2-Expressionskassette in der E3-Region besitzt, und der nichtreplizierende in der E1-Region, könnte bei Einschränkung der Replikation des replizierenden Vektors *in vivo* die Position des Transgens im nichtreplizierenden Vektor für dessen Nichtreplikationsfähigkeit kompensieren.

### **8.4.3 *Verwendeter Mausstamm***

Einen bemerkenswerten Einfluß des verwendeten Tierstammes auf die adenovirale Transgenexpression hinsichtlich Menge und Zeitdauer der Expression und Größenordnung der Immunantwort haben Peng et al. zeigen können (Peng et al. 2001). Nach Infektion mit nichtreplizierenden Adenoviren weisen Balb/C Mäuse deutliche höhere NK-Zell-Aktivierungsmarker und Expression von IL-12 und IFN- $\gamma$  auf als C57BL/6 Mäuse, was eine verminderte Dauer der adenoviralen Transgenexpression zur Folge hat. Peng et al. konnten gleichzeitig nachweisen, dass durch NK-Zell-Depletion eine deutlich verlängerte Transgenexpression zu erzielen ist.

Die von Peng et al. verwendeten Mäuse waren zwar keine *nu/nu* Mäuse, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, die beschriebenen Mechanismen sind jedoch größtenteils Komponenten der angeborenen nichtspezifischen Immunität, z.B. NK-Zellen, wie sie auch beim *nude* Phänotyp vorhanden sind. Daher spielt möglicherweise auch in dieser Arbeit die Verwendung von Mäusen des Balb/C Hintergrundes eine Rolle in der Hinsicht, als dass eine effiziente Virusreplikation und Propagation innerhalb des Tumors durch eine verstärkte Aktivität insbesondere der NK-Zellantwort vermindert oder sogar verhindert wurde.

### **8.4.4 *Probleme der Administration der Virussuspension***

Bei einigen Tieren der Gruppe, die für die Bestimmung der IL-2 Plasmakonzentration verwendet wurden, konnte kein IL-2 im Plasma nachgewiesen werden. Des weiteren zeigte sich bei einigen Tieren im

---

---

Versuch über das Tumorwachstum keine objektiv messbare Antwort, während bei etwa der Hälfte der mit einem IL-2-produzierenden Adenovirus injizierten Tiere eine komplette Tumorremission festzustellen war. Dies deutet darauf hin, dass die Administration des therapeutischen Virus eine Schwierigkeit darstellt. Tumoren wurden injiziert, sobald sie eine Größe von 100 bis 200 mm<sup>3</sup> erreichten, das injizierte Volumen betrug jeweils 50 mm<sup>3</sup>. Dieses alleine stellte schon ein erhebliches Problem dar, da dies bedeutet, dass Tumoren mit Virussuspensionen bis zur Hälfte des eigenen Volumens injiziert wurden. Dies führte in einigen Fällen auch dazu, dass der Tumor merkbar rupturierte und somit keine vollständige intratumorale Gabe erfolgte. Bei sehr kleinen Tumoren ist es auch möglich, dass der Tumor mit der Injektionsnadel gar nicht erst korrekt getroffen wurde.

Des Weiteren ist laut Wein et al. die diffuse Infektion des Tumors eine wichtige Bedingung für die komplette Eradikation (Wein et al. 2003). Ihr mathematisches Modell ist ausführlich beschrieben in 8.4.6.

#### **8.4.5 Effekt der Deletion der E3-Region**

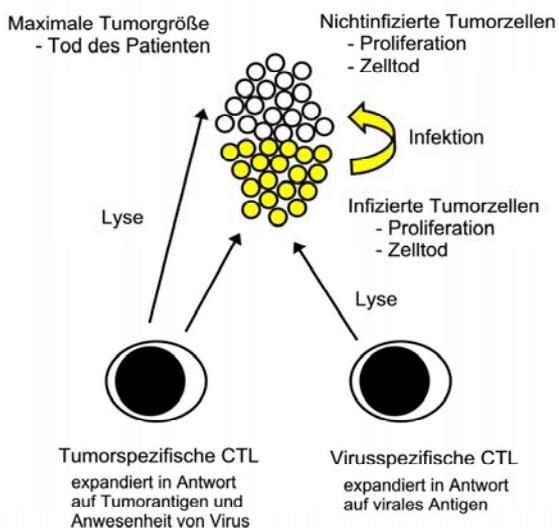
In Bezug auf die verminderte Fähigkeit von AdSW8 nach Injektion eine Tumorregression zu erzeugen, muß in Betracht gezogen werden, dass im Vergleich zu dem in der Literatur beschriebenen Onyx-015, dieses Virus zusätzlich eine Deletion in der E3-Region aufweist. Das gleiche gilt auch für das verwendete replizierende Virus AdMA55. Die E3-Region ist zwar nichtessentiell für die virale Replikation *in vitro* (Berkner und Sharp 1983), jedoch sind hier verschiedene virale Gene lokalisiert, die möglicherweise eine wichtige Rolle spielen im lytischen Zyklus des Virus. So ist das ADP (*adenovirus death protein*) verantwortlich für effiziente Lyse und die Freisetzung von Viruspartikeln im späten Stadium des Infektionszyklus (Tollefson, Ryerse et al. 1996; Tollefson, Scaria et al. 1996). Die Deletion des ADP-Gens kann die Ausbreitung des Virus verhindern oder verlangsamen. Jedoch konnten Hawkins und Hermiston zeigen, dass Zellen mit einer Substitution im Bereich des ADP-Gens aber Erhalt der entsprechenden Promoter-Sequenzen, zwar eine verlängerte Zeit bis zur Lyse und Virusfreisetzung benötigen, gleichzeitig aber auch eine vermehrte Virusproduktion aufweisen; so war die Virusfreisetzung der ADP substituierten Viren größer als die von Wildtyp-Adenovirus (Ad5) (Hawkins et al. 2001). Des Weiteren sind andere Genprodukte der E3 Region wichtig für die Suppression der antiviralen Immunantwort; das gp19K Gen bindet beispielsweise an MHC Klasse I-Moleküle und verhindert deren Transport zur Zelloberfläche und somit auch die Detektion der infizierten Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) (Wold et al. 1999). Dieses Defizit sollte in unserem Nacktmaus-Xenograft jedoch keine Rolle spielen, da keine T-Zellen vorhanden waren.

---

### 8.4.6 Einfluß der IL-2-Expression auf virale Replikation und Propagation innerhalb des Tumors

Wie zuvor dargelegt, zeigen Balb/C Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen eine deutlich stärkere NK-Zellantwort nach adenoviraler Infektion und Genexpression. Der hierdurch auftretende deletäre Effekt auf die Viruspropagation wird möglicherweise durch die Insertion des IL-2-Gens in das virale Genom und dadurch Expression dieses Transgens durch infizierte Zellen weiter verstärkt. IL-2 besitzt die Fähigkeit, NK-Zellen zu rekrutieren und zu aktivieren (s. 4.4.1) (Shaw et al. 1985; Meropol et al. 1996; Meropol et al. 1998; Yu et al. 2000; Slos et al. 2001; Basse et al. 2002).

Möglicherweise fanden durch einen replizierenden adenoviralen Vektor zum Transfer des IL-2 Gens *in vivo* keine additiven oder synergistischen Effekte statt, sondern vielmehr eine kontraproduktive Einwirkung auf den Antitumoreffekt und auf das Propagationsverhalten des replizierenden adenoviralen Vektors durch die vermehrte anti-adenovirale Immunantwort.



**Abbildung 40: Parameter des Antitumoreffektes von replizierenden Viren**

Wodarz beschreibt die Parameter, die die onkolytischen Fähigkeiten eines replizierenden Virus bestimmen; hierzu zählen die Proliferations- und Absterberate der infizierten und nichtinfizierten Zellen, die Geschwindigkeit der Infektion (Virusreplikation), die Immunantwort des Wirtes gegen Tumor- und Virusantigen und deren Effektivität, eine Lyse der Tumorzellen herbeiführen zu können. Nur bei optimaler Abstimmung dieser Parameter gelingt es theoretisch eine komplette Regression des Tumors herbeizuführen (Wodarz 2001a).

Wodarz hat hierzu ein simplifiziertes mathematisches Modell für einen zweidimensionalen Tumor aufgestellt (Wodarz 2001b). Es beschreibt die Dynamik zwischen dem Tumor, dem Virus und virus-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und beinhaltet die Variablen nichtinfizierte Tumorzellen, infizierte Tumorzellen, Menge der spezifischen CTLs, Replikationsrate des Virus, Proliferations- und Sterberate der Tumorzellen. Das Modell entspricht in den Grundzügen jenem der Jäger-Beute-Dynamik (*predator-prey*) der Populationsbiologie (s. Abbildung 40). Trotz der Simplifizierung des Modells übersteigt die detaillierte Darstellung des Modells den Rahmen dieser Diskussion. Einige Schlussfolgerungen des Modells sind jedoch äußerst interessant und bedenkenswert. Dieses theoretische Modell der Interaktion zwischen replizierendem Virus, Tumorzellen und Immunzellen liefert eine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte. So schränkt beispielsweise eine erhöhte Immunogenität des Virus die Ausbreitung des Virus ein und führt zu einer vorzeitigen Abortion der Infektion des Tumorgewebes. Ähnliches gilt für die Zytotoxizität des Virus; auch

---

hier wirkt eine zu starke Zytotoxizität kontraproduktiv auf eine disseminierte Infektion des Tumors. Wein et al. erweiterten Wodarzs Modell auf einen sphärischen Tumor (Wein et al. 2003). Sie ermittelten im Modell die Modifikation von wichtigen Parametern, die zu einer Tumoreradikation oder Tumorkontrolle führen können; die verwendeten Parameter sind in ihrem Modell die folgenden: Zahl uninfizierter Tumorzellen, Zahl infizierter Tumorzellen, Zahl nekrotischer Zellen, Menge extrazellulären Virus und das Ausmaß der antiviralen Immunantwort. Die Stärke ihres Modelles beruht auf der Einbeziehung von Daten aus klinischen Studien für die Ermittlung der Größen der Parameter. Wein et al. sagen voraus, dass eine reproduzierbare Tumoreradikation auf den folgenden Eigenschaften beruhen sollte: einer diffusen Infektion innerhalb des Tumors, auf einem Aufrechterhalten der Virusausbreitung, hierfür sei insbesondere die Verhinderung einer immunsystemvermittelten Beseitigung des Virus notwendig; des weiteren sei die Induktion eines *bystander* Effektes, d.h. die Abtötung benachbarter, nichtinfizierter Zellen wünschenswert.

Wodarzs und Weins et al. Modelle erklären die Ergebnisse anderer Gruppen. So zeigen You et al. *in vitro*, dass Onyx-015 und Paclitaxel und Cisplatin eine synergistische Aktivität hinsichtlich des zytolytischen Effektes auf primäre Lungenkarzinomzellen haben (You et al. 2000). Ein ähnlicher Effekt ist beschrieben in einem *in vivo* Nacktmausxenograftmodell von Rogulski et al.; sie konnten zeigen, dass der Antitumoreffekt von Onyx-015 in Kombination mit Strahlentherapie verstärkt wird (Rogulski et al. 2000). Khuri et al. konnten ebenfalls einen verstärkten Effekt der Kombination von Onyx-015 und Cisplatin/5-FU in einer klinischen Phase-II Studie bei rezidivierendem oropharyngealem Karzinom zeigen; die Kombination ist sowohl einer alleinigen Therapie mit Onyx-015 als auch einer alleinigen Chemotherapie überlegen (Khuri et al. 2000).

Sauthoff et al. haben jedoch kürzlich zeigen können, dass entgegen der theoretischen Annahmen von Wodarz und Wein et al. eine langdauernde Persistenz und Replikation von replizierenden Adenoviren in Tumoren möglich ist, ohne dass diese durch Komponenten des nichtadaptiven Immunsystems des Wirtsorganismus beseitigt würden (Sauthoff et al. 2003). In ihrem humanen Tumorexograftmodell in der Nacktmaus mit intratumoraler Injektion von replizierenden Adenoviren konnten sie eine Viruspersistenz und –replikation über wenigstens acht Wochen hinweg beobachten. Dass es dennoch in ihrem Modell nicht zu einer Tumoreradikation kam, führen sie auf die fleckförmige Verteilung der infizierten Areale und nicht völligen Durchsetzung des Tumors zurück, die durch die Hinderniseigenschaften murinen Gewebes bedingt sei. Diese Hinderniseigenschaften murinen Gewebes sind zu einem großen Teil bedingt durch die Nichtpermissivität muriner Zellen und Gewebe für eine adenovirale Replikation. Jedoch ist zu beachten, dass eine ähnliche Schwierigkeit auch in einem syngenen Modell bestünde, da gerade die Elemente des Bindegewebes und des Gefäßsystems, z.B. Fibroblasten/Fibrozyten und Endothelzellen wenig permissiv sind für eine adenovirale Replikation (Horwitz 1996).

---

## 8.5 Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei Anwendung im Menschen

### 8.5.1 Toxizität von IL-2

In der vorliegenden Arbeit wurden keine toxischen Effekte aufgrund der IL-2 Produktion beobachtet. Die ermittelten Plasma-IL-2 Spiegel lagen jedoch schon in einem sehr hohen Bereich, in dem in der klinischen Anwendung bereits toxische Effekte im Menschen beobachtet wurden, wie z.B. das *capillary leak* Syndrom mit einer Fehlfunktion zahlreicher Organsysteme. Dass diese Effekte nicht beobachtet wurden, lag sicherlich zum großen Teil daran, dass die Nacktmäuse die wichtigen Mediatoren für die Entstehung einer systemischen Entzündungsantwort, d.h. insbesondere T-Lymphozyten, die wiederum zur Sekretion von sekundären Mediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 führen könnten, nicht besitzen. In einem System mit einer intakten adaptiven Immunantwort könnten derart hohe systemische IL-2 Konzentrationen deletäre Auswirkungen haben.

In klinischen Studien werden verschiedene Administrationsarten der IL-2-Gabe evaluiert. Bei intravenöser Gabe werden im Falle des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms z.B.  $1,8 \times 10^6$  IU IV über 24 h gegeben (1 mg entspricht etwa  $1,8 \times 10^7$  IU) (Negrier et al. 1998). In der Publikation sind keine resultierenden IL-2-Plasmakonzentrationen angegeben; diese können jedoch aufgrund der bekannten pharmakokinetischen Eigenschaften von IL-2 einfach berechnet werden. Bei einem Verteilungsvolumen  $V_D$  von 0,09-0,18 l/kg und einer initialen Eliminationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  von 6-13 min können Plasmaspiegel von etwa 50 bis 200 pg/ml erwartet werden.

Bei der angegebenen Dosisrate erlitten in der Studie von Negrier et al. 68% der Patienten eine vasopressorresistente Hypotonie, 43% Fieber, 34% Übelkeit und Erbrechen, und zwischen 11 bis 15% erhöhte Transaminasen, neurologische, renale oder pulmonale Symptome (Negrier et al. 1998). In dieser Arbeit hatten nahezu alle Tiere, bei denen IL-2 im Plasma nachweisbar war, Plasmaspiegel oberhalb dieses Bereiches, und bei Immunkompetenz wäre es sicherlich zu einer hohen Rate an toxischen Nebenwirkungen gekommen.

### 8.5.2 Toxizität von Adenoviren

Die toxischen Effekte von Adenoviren sind ausführlich beschrieben worden (s. 4.3.9). Spätestens nach dem Todesfall eines Probanden im Rahmen einer gentherapeutischen klinischen Studie zur Behandlung der OTC-Defizienz ist hier zur Vorsicht gemahnt. Diese toxischen Effekte lassen sich aufgrund des speziesspezifischen Tropismus der Adenoviren auch nur ungenügend *in vitro* und in Tierversuchen simulie-

---

---

ren; allenfalls Versuche mit Primaten können hier aussagekräftige Hinweise geben (Lozier et al. 2002; Morral et al. 2002).

### **8.5.3 Immunität**

Wie bereits beschrieben, besitzt ein Großteil der Population neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren, insbesondere gegen jene der Gruppe C. Dieser Anteil liegt im Bereich von 40 bis 60% (Horwitz 1996). Sowohl das in unserer Arbeit verwendete Virus, als auch Onyx-015 sind Derivate von Gruppe C Adenoviren - Adenovirus Typ 2 und 5, respektive. Dies bedeutet, dass möglicherweise hierdurch bereits eine erhebliche Einschränkung der *in vivo* Aktivität des Virus gegeben ist. Dieses ist für Onyx-015 bereits in klinischen Studien deutlich geworden; Patienten, die vor Behandlungsbeginn erhöhte Spiegel an neutralisierenden Antikörpern aufwiesen, haben eine geringere Wahrscheinlichkeit, dass virale DNA drei bis fünf Tage nach Virusinjektion im peripheren Blut nachweisbar war; außerdem war dieser Effekt bei intravasaler Gabe, intravenös oder intraarteriell, stärker ausgeprägt als bei intratumoraler Injektion (Kirn 2001a).

In Tierversuchen kommt es in nahezu allen Spezies nach Gabe eines Adenovirus zur Entwicklung einer spezifischen humoralen Immunantwort mit Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Diese Antwort läuft in der Regel innerhalb von zwei bis vier Wochen nach Erstgabe ab und ist äußerst robust. Harvey et al. konnten jedoch zeigen, dass diese Ergebnisse nicht einfach auf den Menschen übertragbar sind, sondern dass dort eine wesentlich variablere Antwort zu beobachten ist (Harvey et al. 1999). Es zeigte sich, dass die Intensität der Produktion neutralisierender Antikörper wesentlich abhängt vom präexistierenden Antikörperspiegel; je mehr präexistierende Antikörper vorhanden, desto stärker der Anstieg. Auch der Administrationsweg spielt eine große Rolle; so kommt es selbst nach wiederholter intrabronchialer Gabe nicht oder nur zu minimalem Anstieg, jedoch nach intrakutaner, intratumoraler und intramyokardialer Gabe zu einer starken Antwort. Eine starke humorale Immunantwort schließt die wiederholte Gabe eines therapeutischen Adenovirus aus und dezimiert so die die Erfolgsaussichten einer solchen Therapie.

### **8.5.4 Noch verstärkte subtraktive Aktivität des replizierenden IL-2-produzierenden Adenovirus**

Die möglicherweise deletären Effekte des Zusammenspiels von erhöhter antiviraler Immunität, Zytotoxizität und Replikationsrate des Virus und Proliferationseigenschaften der Tumorzellen wurden bereits diskutiert (s. 8.4.6). Dieser Effekt war möglicherweise dafür verantwortlich, dass keine erhöhte Trans-

---

genexpression, keine virale Replikation und kein verstärkter Antitumoreffekt des replizierenden Virus im in dieser Arbeit verwendeten *in vivo* Modell erzielt wurden. Ein solcher Effekt ist auch zu erwarten, wenn das Virus in einer klinischen Anwendung beim Menschen zum Einsatz käme. Eine vermehrte antivirale Immunität, durch die Sekretion von IL-2 führt unter Umständen dazu, dass es nur zu einer abortiven Tumorzellinfektion durch das Virus kommen könnte und die Ausbreitung im Tumorgewebe erheblich beeinträchtigt würde. Der beim Menschen zu erwartende Effekt sollte aller Voraussicht nach noch stärker ausfallen, da eine voll kompetente T-Zellantwort bestünde. Die klinische Anwendung erscheint aus dieser Sicht nicht sinnvoll.

## 8.6 Ausblick

Es gibt verschiedene Ansatzmöglichkeiten, die diskutierten Probleme bei der Anwendung der in dieser Arbeit verwendeten replizierenden Adenoviren zum Immungentransfer zu beheben.

### 8.6.1 Erhalt der ADP Region

Die Funktion des ADP Gens im Hinblick auf den lytischen Infektionszyklus und die sich durch die Deletion des ADP Gens in der E3 Region ergebenden Folgen sind diskutiert worden (s. 4.3.2.3 und 8.4.5). Durch Reinsertion des ADP Gens oder die Verwendung eines Vektors mit kleinerer Deletion der E3 Region, die das ADP Gen erhält, kann möglicherweise eine verbesserte und beschleunigte Virusausbreitung erreicht werden, da ADP eine wichtige Rolle im terminalen Infektionszyklus und der Virusfreisetzung spielt (Tollefson, Ryerse et al. 1996; Tollefson, Scaria et al. 1996).

### 8.6.2 Besserer Zielzelltropismus

Als ein Problem wurde diskutiert, dass die Zielzellen möglicherweise den adenoviralen Rezeptor, d.h. sowohl den für die initiale Adsorption notwendigen Rezeptor CAR, als auch die Internalisierungsrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ , nicht mehr, oder nur in sehr geringem Maße, exprimieren. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Transduktionseffizienz.

Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu umgehen, besteht in der Verwendung von *fiber*-Protein-Mutanten. Die *fiber*-Struktur ist verantwortlich für die Bindung an den primären Rezeptor, CAR. Shinoura et al. verwendeten ein E1B55K-deletiertes Adenovirus mit einer veränderten *fiber*-Struktur; an das C-terminale Ende war ein zusätzlicher Abschnitt von 20 Lysinresten angefügt worden (Shinoura et al. 1999).

---

---

Durch diese Alteration konnte eine erheblich verbesserte Transduktionseffizienz im Nacktmaus-Gliom-Modell erzielt werden. Zuvor konnten Yoshida et al. das gleiche Phänomen mit einem veränderten Wildtypadenovirus nachweisen (Yoshida et al. 1998).

Dmitriev et al. zeigten, dass durch die Inkorporation eines die RGD-Sequenz enthaltenden Peptids in die *fiber*-Struktur die Transduktionseffizienz um den Faktor 100 bis 1000 gesteigert werden konnte (Dmitriev et al. 1998). Die virale Infektion ist in diesem Fall nicht abhängig von der Expression des adenoviralen Rezeptors CAR.

Andererseits mag es unter Umständen wünschenswert sein, das Zielzellspektrum einzuengen und nicht, wie oben beschrieben, zu diversifizieren. Curiel et al. verwendeten dazu Konjugate, bestehend aus einem anti-*fiber*-Abschnitt und einem Abschnitt, der für die Bindung an die Zielzelle verantwortlich ist, z.B. einen Liganden oder einen anti-Rezeptor-Antikörper (Curiel 1999). Durch diese Konjugate kommt es einerseits zu einer Ablation des nativen Tropismus, und, andererseits, zu einem Tropismus für die Rezeptor-exprimierende Zelle (Douglas et al. 1996; Haisma et al. 2000).

Die Möglichkeit, durch Deletionen im viralen Genom eine spezifische Replikation in den Tumorzellen zu erreichen, kann möglicherweise durch ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Zellzyklusregulatoren, Onkogenen und viralen Genprodukten verbessert werden. Die zunächst in der Literatur angenommene Spezifität von Onyx-015 für Zellen mit fehlreguliertem p53-Signalweg kann als nicht gültig betrachtet werden (s. hierzu ausführliche Erläuterung und Diskussion in 4.3.7 und 8.1.3). Dies schließt jedoch nicht aus, dass dieses nicht für andere Viren möglich sein könnte. Verschieden Systeme sind bereits hierfür evaluiert worden, z.B. das für Zellen mit fehlreguliertem pRb-Signalweg spezifische Ad $\Delta$ 24 (Fueyo et al. 2000b) (s. auch 4.3.5).

### ***8.6.3 Geringere immunologische Antwort und Toxizität***

Wie oben erwähnt, ist die Auslösung einer starken zellulären und humoralen Immunantwort ein fundamentales Problem bei der Gabe von Adenoviren. Dieses führt zu einer verminderten Dauer der Genexpression und hat auch einen erheblichen Anteil an der Toxizität. Außerdem wird durch die Immunantwort eine Readministration erschwert, da die Viruspartikel durch Antikörper gegen Capsid-Strukturen neutralisiert werden (Yang et al. 1995; Worgall et al. 1997). Es existieren verschiedene Strategien, diese Phänomene zu umgehen. So wurde versucht, eine Toleranz zu erzeugen durch eine orale Gabe des Virus oder durch Gabe an neugeborene Tiere (Walter et al. 1996; Ilan 1999). Des Weiteren kann durch die gleichzeitige Gabe von immunsuppressiven Medikamenten, wie z.B. Cyclophosphamid, FK506 und Cyclosporin A eine verminderte Toxizität und eine verlängerte Transgenexpression erzielt werden (Fang et al. 1995; Jooss et al. 1996; Ilan et al. 1997). Jedoch sind diese Vorgehensweisen wenig praktikabel,

---

da bei jeder weiteren Gabe des Vektors die immunsuppressiven Medikamente ebenfalls gegeben werden müssen; zudem weisen die verwendeten Immunsuppressiva selbst eine erhebliche Toxizität auf.

Daher erscheint die Modulation des Adenovirus selbst ein sinnvolleres Vorgehen als die Immunantwort des Wirtsorganismus zu beeinflussen. So wurden hier Vektoren mit Deletionen von großen Teilen des viralen Genoms (*gutless* Vektoren) entwickelt, die eine deutliche Verminderung der Immuninduktion und Toxizität aufweisen. Helfervirus-abhängige Viren besitzen keine Protein-kodierenden Gensequenzen mehr und zeigen eine geringe Toxizität und Immunogenität. Trotz dieser Fortschritte kommt es immer noch zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern, so dass letztendlich nur durch Variation der Serotypen des Vektors langfristig angemessene Transgenexpressionsspiegel entstehen (Parks et al. 1999). Dieses stellt jedoch eine erhebliche Schwierigkeit dar.

Ein weiteres mögliches Vorgehen ist die biochemische Modifikation der Capsid-Proteine. Croyle et al. verwendeten in einem Tiemodell die PEGylierung von Capsidstrukturen und erreichten hiermit eine verringerte Aktivierung von T-Lymphozyten und auch einer verringerte Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Croyle et al. 2002).

#### **8.6.4 Regulierbares Transgen**

Wie in Abschnitt 8.4.6 diskutiert, wirkt die Expression eines immunstimulatorischen Transgens, in diesem Falle von IL-2, möglicherweise deletär auf die Ausbreitung des Virus innerhalb des Tumors, durch eine übermäßige Aktivierung einer antiviralen Immunantwort. Daher wäre es wünschenswert den Zeitpunkt der Transgenexpression zu kontrollieren, um z.B. nach vollständiger Dissemination des Virus innerhalb des Tumors eine Transgenexpression „einzuschalten“ und für eine starke Immunantwort gegen Virus und Tumorzellen zu sorgen. Hierdurch kann eventuell ein Durchbrechen der ungewünschten Immuntoleranz gegen den Tumor erzielt werden. Hierfür wären z.B. Tetrazyklin-abhängige Expressionssysteme geeignet (Agha-Mohammadi und Lotze 2000).

#### **8.6.5 Bessere Administrationstechnik**

Wie zuvor beschrieben, stellt, insbesondere beim Tierversuch, die Gabe der Adenoviren ein erhebliches Problem dar, u.a. das große injizierte Volumen im Vergleich zum Tumolvolumen. Um eine optimale Verteilung des Virus im Tumor zu erreichen, ist eine möglichst multilokuläre Injektionstechnik wünschenswert. Dieses ist bereits von Khuri et al. in klinischen Studien durchgeführt worden (Khuri et al. 2000), des weiteren von Wein et al. in theoretischen Überlegungen untermauert worden (Wein et al.

---

---

2003), aber schwer zu erreichen im Falle sehr kleiner Tumoren, wie sie im Tierversuch vorlagen (100 bis 200 mm<sup>3</sup>).

### **8.6.6 Verbesserte Tiermodelle**

Die Einschränkungen des verwendeten Tiermodells im Hinblick auf eine Aussagekraft für eine zukünftige klinische Anwendung wurden bereits ausführlich diskutiert (s. 8.2). Zusammengefasst spielt hier die Abwesenheit von großen Teilen der adaptiven Immunantwort, die Verwendung von xenogenen Tumoren, die Verwendung von humanen Adenoviren und die Erzeugung subkutaner Tumoren, die keine einem malignen Tumor äquivalentes Wachstumsverhalten aufweisen, eine große Rolle. Nicht zuletzt ist auch die Größeneinschränkung des Mausmodells eine Schwierigkeit, da die erreichbaren Tumorgößen Probleme bei der intratumoralen Gabe von Viruslösungen bereiten, wie in Abschnitt 8.6.5 dargelegt.

Für die Evaluation der Interaktion vom Immunsystem des Wirtsorganismus, Tumor und appliziertem Adenovirus wäre ein syngenes Modell sehr vorteilhaft. Hemminki et al. haben z.B. canine konditionell replikationskompetente Adenoviren (*conditionally replicating adenovirus – CRAD*) entwickelt, die eine solche Gelegenheit bieten (Hemminki et al. 2003). Die Expression der E1A Region wurde im entwickelten Virus unter die Kontrolle des Osteocalcin-Promoters gestellt, um eine gewisse Selektivität für osteocalcinexprimierende Tumorzelllinien und Tumoren zu erreichen, z.B. für Osteosarkome.

### **8.6.7 Besseres Verständnis der Interaktion von onkolytischen Adenoviren, Tumorgewebe und Immunantwort**

Der Zusammenhang zwischen der onkolytischen Aktivität eines Adenovirus und der Interaktion mit Tumorgewebe und Immunsystem des Wirtsorganismus muß in Zukunft besser verstanden werden. Erste Ansätze hierfür bieten die bereits diskutierten, von Wodarz und Wein et al. entwickelten theoretische Modelle (Wodarz 2001a; Wein et al. 2003) (s. 8.5.4). Bisher bezog die Entwicklung von onkolytischen Viren diese Faktoren nur in ungenügendem Maße ein. Dieses drückt sich aus in dem relativ enttäuschenden Abschneiden der onkolytischen Viren in klinischen Therapiestudien (Nemunaitis et al. 2000; Kirn 2001b; Nemunaitis, Khuri et al. 2001), und auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wiesen darauf hin, dass ein einfacher additiver oder synergistischer Effekt bei der Verwendung von replizierenden, onkolytischen Viren als Immungenvektoren nicht zu erwarten ist. Die Entwicklung und optimale Modifizierung von Faktoren wie Zytotoxizität, Immunogenität und Replikationsfähigkeit von onkolytischen Viren sollte eine Verbesserung dieser Ergebnisse ermöglichen. Ferner kann in Zukunft durch Integration der oben erwähnten Vorschläge zum verbesserten Zielzelltropismus und einer regu-

---

lierten Transgenexpression eine weitere Verbesserung der Spezifität von onkolytischen Adenoviren erwartet werden. Positiv stimmen auch die Befunde von Sauthoff et al., dass eine langdauernde Viruspersistenz und –replikation in Tumorxenografts in der Nacktmaus nach intratumoraler Injektion von replizierenden Adenoviren nachgewiesen werden konnte (Sauthoff et al. 2003).

---

---

## 9 ZUSAMMENFASSUNG

In der Literatur konnte in präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass ein replikationskompetentes Adenovirus mit einer Deletion des E1B55K-Gens (Onyx-015) eine ausgeprägte onkolytische Aktivität besitzt. Des weiteren ist seit langem bekannt, dass IL-2 in der Lage ist, spezifische und unspezifische Komponenten des Immunsystems zu stimulieren.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass mit einem E1B55K-deletierten IL-2-Gen tragenden Adenovirus durch die immunmodulatorischen Effekte von IL-2 eine zusätzliche Antitumorwirkung zu erzielen sei. Hierfür wurden in der Zellkultur mit verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien die angenommenen verschiedenen Komponenten des Antitumoreffektes, d.h. Zytotoxizität, Ausmaß der Virusfreisetzung und der IL-2 Produktion von verschiedenen Adenoviren verglichen. Für den Vergleich wurde ein E1B55K-deletiertes IL-2 Gen tragendes Virus, ein E1B55K-deletiertes Virus ohne IL-2 Gen, und nichtreplizierende Adenoviren der ersten Generation mit IL-2 Gen Insertion in der E1 oder der E3 Region verwendet.

Die zytotoxischen Effekte und das Ausmaß der Virusfreisetzung des replikationskompetenten Virus mit IL-2 Gen waren ähnlich der des replikationskompetenten Virus ohne IL-2 Gen, während die Produktion von IL-2 gegenüber der nach Infektion mit einem replikationsdefizienten Virus mit IL-2 Gen stark erhöht war. Die Transgenexpression war bei Insertion des Transgens in der adenoviralen E3 Region deutlich vermindert gegenüber einer Insertion in der E1 Region.

Des weiteren wurden *in vivo* Untersuchungen mit Tumoren in der Nacktmaus durchgeführt. Hier zeigte sich, dass das IL-2 Gen tragende replikationskompetente Adenovirus und das replikationsdefiziente Virus ohne IL-2 Gen in bezug auf die Verzögerung von Tumorzustand, die Fähigkeit komplette Remissionen herbeizuführen, das Ausmaß der IL-2 Produktion und das Überleben eine ähnliche Effektivität besaßen. Immunhistochemisch konnte eine lokale Transduktion von Zellen und Replikation nachgewiesen werden, jedoch fand keine den ganzen Tumor erfassende Infektion statt. Dies deutete darauf hin, dass die Replikation des replikationskompetenten Virus im Tumoren eingeschränkt war.

Diese Befunde zeigen, dass das *in vivo* Verhalten von onkolytischen Viren, Tumorgewebe und Geweben des Wirtsorganismus komplexer ist als von *in vitro* Studien geschlossen werden kann, und dass möglicherweise *in vivo* eine erhöhte Immunogenität schädliche Einflüsse hat auf die Virusinfektion und Replikationsverhalten im Tumorgewebe.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die komplexe Interaktion zwischen onkolytischen Viren, Tumorgewebe und Immunsystem darzustellen, mit dem letztendlichen Ziel, onkolytische Viren zu entwickeln, die in der Lage sind, gezielt und spezifisch eine langfristige Antitumorwirkung zu erzielen.

---

# 10 MATERIAL UND BEZUGSQUELLENNACHWEIS

## 10.1 Material

### 10.1.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Deoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Riedel-de Haën, Seelze
Eisessig	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Ethanol absolut	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Riedel-de Haën, Seelze
Isopropanol reinst	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Kaliumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumchlorid	Merck; Darmstadt
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka BioChemika; Neu-Ulm
NaHCO <sub>3</sub>	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
NaOH	Fluka BioChemika; Neu-Ulm
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenol (Aqua-Roti <sup>®</sup> )	Roth; Karlsruhe
SDS	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
Tris	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween-20	Fluka BioChemika, Neu-Ulm

**10.1.1.2 Zelllinien**

293	ATCC* CRL-1573 (primäre humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit abgescherter Ad Typ 5 DNA)
DU 145	ATCC* HTB-81 (humane Prostata Adenokarzinomzellen, isoliert aus Gehirnetastasen)
HeLa	ATCC* CCL-2 (humane Zervixkarzinomzellen)
LNCaP	ATCC* CRL-1740 (humane Prostata Adenokarzinomzellen, isoliert aus Lymphknotenmetastasen)
MCF7	ATCC* HTB-22 (humane Mammakarzinomzellen)
PC-3	ATCC* CRL-1435 (humane Prostata Adenokarzinomzellen, isoliert aus Knochenmetastasen)

\* *American Type Culture Collection*: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

**10.1.1.3 Zellkulturmedien, -seren und -zusätze**

Medium	Bezugsquelle
Dulbecco's MEM (1x) mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat	Biochrom AG; Berlin
MEM-Earle (1x) mit 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 0,518 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine	Biochrom AG; Berlin
Minimum Essential Medium-Eagle (10x) mit Earles Salzen, ohne L-Glutamin und NaHCO <sub>3</sub>	Gibco; Paisley, U.K.
RPMI 1640 Medium (1x) mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 0,532 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine	Biochrom AG; Berlin
Serum	Bezugsquelle
SeraPlus, prozessiertes FBS	PAN Biotech GmbH; Aidenbach
Fötale Kälberserum	Biochrom AG; Berlin
Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zusätze/Anderes	

---

Penicillin / Streptomycin (10000 U / 10000 µg/ml)	Biochrom AG; Berlin
L-Glutamine (200 mM)	Biochrom AG; Berlin
Natriumpyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG; Berlin
Trypsin / EDTA Lösung 0,25% / 0,02% in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG; Berlin
Amphotericin B (Fungizone®)	Roche; Mannheim
SeaKem® LE Agarose	FMC® BioProducts

#### 10.1.1.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Parafilm „M“	American National Can; Chicago, IL
Serologische Pipetten ADVANTAGE	Falcon®; Heidelberg
Pipettenspitzen ungestopft und gestopft	Josef Peske oHG; Aindling-Pichl
Zellkulturschalen, Zentrifugenröhrchen	TPP; Trasadingen, Schweiz
Cryodevice	Nalgene; Hereford, UK
Cryoröhrchen	Josef Peske oHG; Aindling-Pichl
1,5 ml <i>ClickFit</i> Reaktionsgefäße	Treff Lab; Degersheim, Schweiz
Ultra-Clear™ Zentrifugenröhrchen (14x89 mm)	Beckman Instruments; Palo Alto, CA
Zellschaber	Corning Incorporated; Corning, N.Y.
Slide-A-Lyzer 10 K Dialysekassetten	Pierce; Rockford, IL
Pasteur Pipetten	Josef Peske oHG; Aindling-Pichl
Optiseal™ Polyallomer Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments; Palo Alto, CA
Zubehör	Bezugsquelle
Research Pipetten	Eppendorf; Wesseling-Berzdorf
Accu-Jet®, Transferpette®	Brand; Dietenhofen
MS2 Minishaker	IKA®; Staufen
Model 1575 ImmunoWash	Bio-Rad; München
CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator	Forma Scientific; Marietta, OH
Hera Safe Sterilbank	Heraeus Instruments / Kendro; Hanau
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld; Lauda-Königshofen

---

## Mikroskope/Kamera

## Bezugsquelle

Axiovert 135 Phasenkontrast-/Fluoreszenzmikroskop	Zeiss; Jena
Coolpix Kamera	Nikon

## Zentrifugen/Rotoren

Biofuge fresco, Megafuge 2.0 R, Varifuge 3.0 R	Heraeus Instruments / Kendro; Hanau
EBA 12	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
J2-HS Centrifuge	Beckman Instruments; Palo Alto, CA
Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge mit Rotor SW41T1 Rotor und 80 Ti	Beckman Instruments; Palo Alto, CA

**10.1.1.5 Enzyme/Anderes**

Verwendete Enzyme wurden von Roche Biochemicals bezogen.

**10.1.1.6 Tierversuch**

## Tiere

## Bezugsquelle

Balb/C <i>nu/nu</i> , männlich	Charles River Laboratories, Frankreich
--------------------------------	--

## Material / Medikamente für Tierversuch

## Bezugsquelle

1 ml Luer lock Spritze	Codan Medical ApS; Lensahn
Kanüle 23G x 1 ¼	Microlance®3
Kanüle Sterican® Insulin Gauge 30 x 5/16"	B. Braun; Melsungen
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Jung; Nussloch
Messschieber Absolute Digimatic	Mitutoyo; Neuss
Anästhesiegerät	Dräger, Lübeck
Medetomidin (Domitor®) 1 mg/ml	Gräub AG; Bern
Midazolam (Dormicum®) 50 mg/10ml	Roche; Mannheim
Fentanyl (Fentanyl-ratiopharm®) 50 µg/ml	Ratiopharm; Ulm
Isofluran	Baxter; München
Heparin (Liquemin® N 25000)	Roche

**10.1.1.7 Durchflusszytometrie**

Gerät	Bezugsquelle
FACS Vantage mit Software CELLQuest Version 3.1f	Becton-Dickinson; Heidelberg

**10.1.1.8 ELISA**

ELISA-Kit	Bezugsquelle
h-Interleukin-2 ELISA OptEIA™ Set: Human Interleukin-2	Boehringer Mannheim / Roche Pharmingen; San Diego, CA

Zubehör	Bezugsquelle
96-well Nunc Maxisorp P/N	Nunc GmbH; Wiesbaden
50 mL Reagent Reservoir	Corning Incorporated; Corning, N.Y.
Assay Diluent	Pharmingen; San Diego

**10.1.1.9 Zellproliferationsassay**

Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche; Mannheim
--------------------------------	-----------------

**10.1.1.10 Photometer**

Biolumin 960	Molecular Dynamics
DU® 640 Spectrophotometer	Beckman Instruments; Palo Alto, CA

**10.1.1.11 Immunhistochemie**

Kryostat HM 500 O	Microm; Walldorf
Objektträger SuperFrost® Plus und Deckgläser	Menzel-Gläser; Braunschweig
Hämalaun nach Mayer (in 1 l wäßriger Lösung: 1 g Hämatoxylin, 0,2 g NI, 50 g KAlSO <sub>4</sub> -12-hydrat, 50 g Chloralhydrat, 0,91 g Zitronensäure wasserfrei)	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

---

DAKO Envision™ System, AP	DAKO, Hamburg
Monoclonal Antibody to human Interleukin-2, Clone B-G5	DPC Biermann, Bad Nauheim
Mouse Anti-Adenovirus (Blend) Monoclonal Antibody , MAB 805	Chemicon International, Temecula, USA
Rabbit Anti-Maus-Gangliosid-GM1 (NK-Zelle)	DPC Biermann, Bad Nauheim
PAP PEN	Kisker
Aqua-Poly/Mount Medium	Polysciences, Eppelheim

### 10.1.1.12 Statistische Auswertung

SPSS for Windows Release 11.0.1	SPSS Inc., Chicago, USA
Sigma Plot Version 8.0	SPSS Inc., Chicago, USA

## 10.2 Rezepte

Die Sterilisation der verwendeten Lösungen erfolgte im Autoklaven bei 120°C und 1 bar für 20 min.

### Kristallviolettlösung für Zellfärbung

60,8	vol% Ethanol
26,1	vol% ddH <sub>2</sub> O
8,7	vol% Formalin
4,3	vol% Essigsäure
1 %	Kristallviolett

### SSC (20x)

175,3 g NaCl  
 88,2 g Natriumcitrat  
 auflösen in 800 ml Aqua bidest.  
 einstellen des pH auf 7,0 mit 10 N NaOH-Lösung

### Citratsalzlösung (10x)

50 g KCl  
 22 g Natriumcitrat  
 auffüllen auf 500 ml mit Aqua bidest.

### MEMF11-Overlay für Plaque Assay / Plaque Purification (260 ml)

100 ml MEM-Earle (1x),  
 12 ml Minimum Essential Medium-Eagle (10x),  
 3,2 ml NaHCO<sub>3</sub> 7,5% (sterilfiltriert),

---

0,4 ml Amphotericin B,  
2 ml Penicillin / Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml,  
2 ml Glutamin 200 mM,  
2 ml Hefeextrakt 5% (sterilfiltriert) und  
10 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert,  
mischen und im Wasserbad auf 37°C erwärmen, dann 5 min auf 44°C. 130 ml 1% sterile Agarose (SeaKem® LE Agarose) erhitzen mit der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung, und danach Abkühlung im Wasserbad auf 44°C. Anschliessend Mischung des Mediums mit der Agarose.

#### Lösungen für Plasmidpräparation mit CsCl-Gradientenzentrifugation

LysozymbLösung (frisch anzusetzen, auf Eis)

5 mg/ml Lysozym  
10 mM EDTA  
50 mM Glucose  
25 mM Tris pH 8,0

Alkalische SDS-Lösung: 1% SDS, 0,2 N NaOH

3 M Kaliumacetat: 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Aqua bidest.

CsCl-gesättigtes Isopropanol

25 mM Tris  
10 mM EDTA  
gesättigt mit CsCl

#### Immunhistochemie Waschpuffer

50 mM Tris  
300 mM NaCl  
0,1% Tween 20  
ad pH 7,4 mit konzentrierter HCl (aq)

#### Antikörperverdünnungslösung

50 mM Tris in ddH<sub>2</sub>O  
ad pH 7,6 mit konzentrierter HCl (aq)  
1% BSA

PBS<sup>2+</sup>: 0,68 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,49 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS

#### 1 x HBS (*HEPES-buffered saline*) für Kotransfektion

21 mM HEPES  
0,137 M NaCl  
5 mM KCl  
0,7 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5,5 mM Glucose  
ad pH 7,1 und Lagerung bei 4°C

---

# 11 ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
Ad	Adenovirus
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADP	<i>adenovirus death protein</i>
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (doppelt destilliertes Wasser)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Clusters of differentiation</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
E1, E2, E3, E4	<i>early unit 1, 2, 3, 4</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetate</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIA	<i>Enzyme immuno assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
G	<i>Gauge</i>
g	Erdbeschleunigung (= 9,81 ms <sup>-2</sup> )
g	Gramm
h	Stunde
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i>
hIL-2	<i>human Interleukin-2</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IL-2	Interleukin-2
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
i.t.	intratumoral
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
<i>lacZ</i>	Gen für β-Galactosidase
MDR	<i>multiple drug resistance</i>

MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	milli mol/l
mm	Millimeter
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
ND	<i>not determined</i> ; nicht bestimmt
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK-Zellen	<i>Natural killer-Zellen</i>
<i>nu</i>	<i>nude</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
orf	<i>Open reading frame</i>
OTC	<i>Ornithine transcarbamoylase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS <sup>2+</sup>	PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
RAC	<i>recombinant DNA advisory committee</i>
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
STAT	<i>signal transduction and activator of transcription</i>
SV40pA	<i>Simian virus 40 polyadenylation signal</i>
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
V.	Vena
whn	<i>Winged helix nude</i>

---

---

## 12 BIBLIOGRAPHIE

Addison, C., J. Bramson, M. Hitt, W. Muller, J. Gauldie and F. Graham. 1998. Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors. *Gene Therapy* 5: 1400-1409.

Addison, C. L., T. Braciak, R. Ralston, W. J. Muller, J. Gauldie and F. L. Graham. 1995a. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8522-8526.

Addison, C. L., T. Braciak, R. Ralston, W. J. Muller, J. Gauldie and F. L. Graham. 1995b. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(18): 8522-8526.

Agha-Mohammadi, S. and M. T. Lotze. 2000. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *The Journal of Clinical Investigation* 105(9): 1177-1183.

Ahlert, T. and V. Schirmacher. 1990. Isolation of a human melanomaadapted Newcastle disease virus mutant with highly selective replication patterns. *Cancer Research* 50: 5962-5968.

Aleman, R., C. Balague and D. T. Curiel. 2000. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nature Biotechnology* 18: 723-727.

Amalfitano, A., M. A. Hauser, H. Hu, D. Serra, C. R. Begy and J. S. Chamberlain. 1998. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *Journal of Virology* 72(2): 926-933.

Anderson, W. F. 1998. Human Gene Therapy. *Nature* 392: 25-30.

Anton, M. (1999a) (*persönliche Mitteilung*)

Anton, M. (1999b) (*persönliche Mitteilung*)

Arnberg, N., K. Edlund, A. H. Kidd and G. Wadell. 2000. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *Journal of Virology* 74: 42-48.

Bajorin, D. F., P. B. Chapman, G. Wong, D. G. Coit, J. Kunicka, J. Dimaggio, C. Cordon-Cardo, C. Urmacher, L. Dantes and M. A. Templeton. 1990. Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and interleukin 2 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Research* 50(7490-7495).

Balague, C., J. Zhou, Y. Dai, R. Aleman, S. F. Josephs, G. Andreason, M. Hariharan, E. Sethi, E. Prokopenko, H. Y. Jan, Y. C. Lou, D. Hubert-Leslie, L. Ruiz and W. W. Zhang. 2000. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 95(3): 820-828.

---

Bannister, L. H. (1999). Cells and Tissues. in: Gray's Anatomy. London, Harcourt Brace and Company Limited.

Barker, D. and A. Berk. 1987. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 156(1): 107-121.

Basse, P. H., T. L. Whiteside and R. B. Herberman. 2002. Cancer immunotherapy with interleukin-2-activated natural killer cells. *Molecular Biotechnology* 21(2): 161-170.

Belloc, F., P. Dumain, M. R. Boisseau, C. Jalloustre, J. Reiffers, P. Bernard and F. Lacombe. 1994. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17(1): 59-65.

Bergelson, J. M. 1999. Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol* 57(9): 975-979.

Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323.

Bergelson, J. M., A. Krithivas, L. Celi, G. Droguett, M. S. Horwitz, T. Wickham, R. L. Crowell and R. W. Finberg. 1998. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *Journal of Virology* 72(1): 415-419.

Berkner, K. L. and P. A. Sharp. 1983. Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* 11: 6003-6020.

Bett, A., L. Prevec and F. Graham. 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *Journal of Virology* 67: 5911-5921.

Bett, A. J., W. Haddara, L. Prevec and F. L. Graham. 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8802-8806.

Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 100: 243-255.

Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.

Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey and F. McCormick. 1996. An Adenovirus Mutant That Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor Cells. *Science* 274: 373-376.

Blaese, R. M. 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480.

---

- 
- Bleackley, R. C., P. J. Barr, C. Havele, J. Hooton, J. Ng, M. Meier, J. P. Merryweather, C. Gibbs and V. Paetkau. 1985. Biologic activities of recombinant human interleukin 2 on murine lymphocytes. *Lymphokine Research* 4(2): 117-131.
- Borgland, S. L., G. P. Bowen, W. Norman C. W, T. A. Liebermann and D. A. Muruve. 2000. Adenovirus Vector-Induced Expression of the C-X-C Chemokine IP-10 Is Mediated through Capsid-Dependent Activation of NF-kappaB. *Journal of Virology* 74(9): 3941-3947.
- Braithwaite, A. W. and I. A. Russell. 2001. Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis* 6(5): 359-370.
- Bretscher, P. and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169: 1042-1049.
- Brinster, R. L. and R. D. Palmiter. 1984. Introduction of genes into the germ line of animals. *Harvey Lectures* 80: 1-38.
- Carroll, A. G., H. J. Voeller, L. Sugars and E. P. Gelmann. 1993. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23(2): 123-134.
- Chiocca, E. A. (1999). A phase I, open-label, dose-escalation, trial of intratumoral injection with an E1B-attenuated adenovirus, Onyx-015, into recurrent gliomas. U. o. Pennsylvania, Massachusetts General Hospital.
- Chiocca, E. A. 2002. Oncolytic Viruses. *Nature Reviews Cancer* 2: 938-951.
- Clontech Living Colors User Manual. BD Biosciences Clontech.
- Cohen, C. J., J. T. Shieh, R. J. Pickles, T. Okegawa, J. T. Hsieh and J. M. Bergelson. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26): 15191-15196.
- Communal, C., F. Huq, D. Lebeche, C. Mestel, J. K. Gwathmey and R. J. Hajjar. 2003. Decreased efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in aging cardiomyocytes. *Circulation* 107(8): 1170-1175.
- Constenla-Figueiras, M., C. Betticher and J. D. Campo (1999). A phase II trial with Ad5CMV-p53 as a single agent in recurrent/refractory SCCHN looking at vector biodistribution and horizontal transmission under normal life conditions. Meeting of the American Association of Cancer Research. 40: 189
- Crompton, T., M. C. Peitsch, H. R. MacDonald and J. Tschopp. 1992. Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183(2): 532-537.
- Croyle, M. A., N. Chirmule, Y. Zhang and J. M. Wilson. 2002. PEGylation of E1-Deleted Adenovirus Vectors Allows Significant Gene Expression on Readministration to Liver. *Human Gene Therapy* 13: 1887-1900.
-

Curiel, D. T. 1999. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Annals of the New York Academy of Sciences* 886: 158-171.

DAKO Instructions: DAKO EnVision™ System, Alkaline Phosphatase Universal. DAKO. Carpinteria, USA

Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota and F. Traganos. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13(8): 795-808.

Davis, I. D., M. Jefford, P. Parente and J. Cebon. 2003. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology* 73: 3-29.

Davison, E., R. M. Diaz, I. R. Hart, G. Santis and J. F. Marshall. 1997. Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *Journal of Virology* 71(8): 6204-6207.

Davison, E., I. Kirby, J. Whitehouse, I. Hart, J. F. Marshall and G. Santis. 2001. Adenovirus type 5 uptake by lung adenocarcinoma cells in culture correlates with Ad5 fibre binding is mediated by alpha(v)beta1 integrin and can be modulated by changes in beta1 integrin function. *J Gene Med* 3(6): 550-559.

de Caestecker, M. P., B. A. Telfer, I. V. Hutchinson and F. W. Ballardie. 1992. The detection of intracytoplasmic interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha expression in human monocytes using two colour immunofluorescence flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 154(1): 11-20.

Debbas, M. and E. White. 1993. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes and Development* 7(4): 546-554.

Dix, B. R., S. J. Edwards and A. W. Braithwaite. 2001. Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *Journal of Virology* 75(12): 5443-5447.

Dix, B. R., S. J. O'Carroll, C. J. Myers, S. J. Edwards and A. W. Braithwaite. 2000. Efficient induction of cell death by adenoviruses requires binding of E1B55k and p53. *Cancer Research* 60(10): 2666-2672.

Djeu, J. Y., J. H. Liu, S. Wei, H. Rui, C. A. Pearson, W. J. Leonard and D. K. Blanchard. 1993. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *Journal of Immunology* 150(3): 960-970.

Dmitriev, I., V. Krasnykh, C. R. Miller, M. Wang, E. Kashentseva, G. Mikheeva, N. Belousova and D. T. Curiel. 1998. An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism. *Journal of Virology* 72(12): 9706-9713.

Donovan, J. and P. Brown (1995a). Blood Collection. in: *Current Protocols in Immunology*. J. E. Coligan, John Wiley & Sons, Inc. 1: 1.7.1-1.7.8.

---

- 
- Donovan, J. and P. Brown (1995b). Euthanasia. in: *Current Protocols in Immunology*. J. E. Coligan, John Wiley & Sons, Inc. 1: 1.8.1-1.8.4.
- Donovan, J. and P. Brown (1995c). Use of Mouse, Rat, Hamster, and Rabbit. in: *Current Protocols in Immunology*. J. E. Coligan, John Wiley & Sons, Inc. 1: 1.6.1-1.6.10.
- Douglas, J. T., M. Kim, L. A. Sumerel, D. E. Carey and D. T. Curiel. 2001. Efficient Oncolysis by a Replicating Adenovirus (Ad) in Vivo Is Critically Dependent on Tumor Expression of Primary Ad Receptors. *Cancer Research* 61: 813-817.
- Douglas, J. T., B. E. Rogers, M. E. Rosenfeld, S. I. Michael, M. Feng and D. T. Curiel. 1996. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nature Biotechnology* 14(11): 1574-1578.
- Duncan, S. J., F. C. A. Gordon, D. W. Gregory, J. L. McPhie, R. Postlethwaite, R. White and H. N. A. Willcox. 1978. Infection of mouse liver by human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 40: 45-61.
- Dutcher, J., S. Creekmore, G. Weiss, K. Margolin, A. Markowitz, M. Roper, D. Parkinson, N. Ciobanu, R. Fisher and D. Boldt. 1989. A phase II study of interleukin-2 and lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with metastatic malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 7: 477.
- Espinoza-Delgado, I., M. C. Bosco, T. Musso, G. L. Gusella, D. L. Longo and L. Varesio. 1995. Interleukin-2 and human monocyte activation. *Journal of Leukocyte Biology* 57(1): 13-19.
- Fang, B., R. Eisensmith, H. Wang, M. Kay, R. Cross, C. Landen, G. Gordon, D. Bellinger, M. Read and P. Hu. 1995. Gene therapy for hemophilia B: Host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression. *Human Gene Therapy* 6: 1039-1044.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (2000). Tumor Suppressor Gene Defects in Human Cancer. in: *Cancer Medicine*. E. Frei. Hamilton, London, B.C. Decker Inc.: 67-87.
- Fletcher, J. C. and W. F. Anderson. 1992. Germ-line gene therapy: a new stage of debate. *Law Med. Health Care* 20: 26-39.
- Fodstad, O., N. Aass and A. Pihl. 1980. Response to chemotherapy of human, malignant melanoma xenografts in athymic, nude mice. *International Journal of Cancer* 25: 453-458.
- Frank, J., C. Pignata, A. A. Panteleyev, D. M. Prowse, H. Baden, L. Weiner, L. Gaetaniello, W. Ahmad, N. Pozzi, P. B. Cserhalmi-Friedman, V. M. Aita, H. Uyttendaele, D. Gordon, J. Ott, J. L. Brissette and A. M. Christiano. 1999. Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398(6727): 473-474.
- Freeman, S. M., C. N. Abboud, K. A. Whartenby, C. H. Packman, D. S. Koeplin, F. L. Moolten and G. N. Abraham. 1993. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Research* 53: 5274-5283.
-

Freshney, R. I. (1987). Quantitation and Experimental Design. in: Culture of Animal Cells. New York, Alan R. Liss, Inc.: 240-241.

Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, R. Alemany, P. S. Lee, T. J. McDonnell, P. Mitlianga, Y. X. Shi, V. A. Levin, W. K. Yung and A. P. Kyritsis. 2000a. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19(1): 2-12.

Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, R. Alemany, P. S. Lee, T. J. McDonnell, P. Mitlianga, Y. X. Shi, V. A. Levin, W. K. Yung and A. P. Kyritsis. 2000b. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19(1): 2-12.

Gansbacher, B., K. Zier, B. Daniels, K. Cronin, R. Bannerji and E. Gilboa. 1990. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *Journal of Experimental Medicine* 172(4): 1217-1224.

Gao, G.-P., R. K. Engdahl and J. M. Wilson. 2000. A Cell Line for High-Yield Production of E1-Deleted Adenovirus Vectors without the Emergence of Replication-Competent Virus. *Human Gene Therapy* 11: 213-219.

Garcia-Sanchez, F., G. Pizzorno, S. Q. Fu, T. Nanakorn, D. S. Krause, J. Liang, E. Adams, J. J. Leffert, L. H. Yin, M. R. Cooperberg, E. Hanania, W. L. Wang, J. H. Won, X. Y. Peng, R. Cote, R. Brown, B. Burtness, R. Giles, R. Crystal and A. B. Deisseroth. 1998. Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1 million-fold when they contaminate hematopoietic cells: a potential purging method for autologous transplantation. *Blood* 92(2): 672-682.

Georger, B., J. Grill, P. Opolon, J. Morizet, G. Aubert, M. J. Terrier-Lacombe, B. Bressac De-Paillerets, M. Barrois, J. Feunteun, D. H. Kirn and G. Vassal. 2002. Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus ONYX-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts. *Cancer Research* 62(3): 764-772.

Ginsberg, H. S., L. L. Moldawer, P. B. Sehgal, M. Redington, P. L. Kilian, R. M. Chanock and G. A. Prince. 1991. A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 1651-1655.

Giovanella, B. C., J. J.S. Stehlin, R. C. Shepard and J. I.J. Williams. 1983. Correlation between response to chemotherapy of human tumors in patients and in nude mice. *Cancer* 52: 1146-1152.

Goodrum, F. D. and D. A. Ornelles. 1998. p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *Journal of Virology* 72(12): 9479-9490.

Graham, F. L. and L. Prevec (1991). Manipulation of adenovirus vectors. in: *Methods in Molecular Biology*. E. J. Murray and N. J. Clifton, Humana: 109-128.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairu. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36: 59-72.

---

- 
- Greber, U. F., M. Willets, P. Webster and A. Helenius. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477-486.
- Griffiths, A., J. Miller, D. Suzuki, R. Lewontin and W. Gelbart (2000). in: *An Introduction to Genetic Analysis*. New York, W.H. Freeman.
- Grill, J., M. L. M. Lamfers, V. W. v. Beusechem, C. M. Dirven, D. S. Pherai, G. M. Kater, P. V. d. Valk, R. Vogels, W. P. Vandertop, H. M. Pinedo, D. T. Curiel and W. R. Gerritsen. 2002. The Organotypic Multicellular Spheroid Is a Relevant Three-Dimensional Model to Study Adenovirus Replication and Penetration in Human Tumors in Vitro. *Molecular Therapy* 6(5): 609-614.
- Gromeier, M., S. Lachmann, M. R. Rosenfield, P. H. Gutin and E. Wimmer. 2000. Inter-genic poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6803-6808.
- Habib, N., H. Salama, A. Abd El Latif Abu Median, I. Isac Anis, R. A. Abd Al Aziz, C. Sarraf, R. Mitry, R. Havlik, P. Seth, J. Hartwigsen, R. Bhushan, J. Nicholls and S. Jensen. 2002. Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 9(3): 254-259.
- Haisma, H. J., J. Grill, D. T. Curiel, S. Hoogeland, V. W. van Beusechem, H. M. Pinedo and W. R. Gerritsen. 2000. Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther* 7(6): 901-904.
- Hall, A. R., B. R. Dix, S. J. O'Carroll and A. W. Braithwaite. 1998. p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nature Medicine* 4(9): 1068-1072.
- Hallenbeck, P. L., Y. N. Chang, C. Hay, D. Golightly, D. Stewart, J. Lin, S. Phipps and Y. L. Chiang. 1999. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Human Gene Therapy* 10(10): 1721-1733.
- Harvey, B.-G., N. R. Hackett, T. El-Sawy, T. K. Rosengart, E. A. Hirschowitz, M. D. Lieberman, M. L. Lesser and R. G. Crystal. 1999. Variability of Human Systemic Humoral Immune Responses to Adenovirus Gene Transfer Vectors Administered to Different Organs. *Journal of Virology* 73(8): 6729-6742.
- Hawkins, L. K., L. Johnson, M. Bauzon, J. A. Nye, D. Castro, G. A. Kitzes, M. D. Young, J. K. Holt, P. Trown and T. W. Hermiston. 2001. Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the 6.7 K/gp19 K region. *Gene Therapy* 8(15): 1123-1131.
- Hearing, P. and T. Shenk. 1983. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 33: 695-703.
- Hearing, P. and T. Shenk. 1986. Adenovirus 5 E1A enhancer contains two distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates expression of all early units in *cis*. *Cell* 45: 229-236.
-

Heberman, R. (1978). Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. in: The nude mice in experimental and clinical research. J. Fogh and R. Heberman. New York, Academic Press: 135.

Heise, C. and D. H. Kirn. 2000. Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *The Journal of Clinical Investigation* 105(7): 847-851.

Heise, C., M. Lemmon and D. Kirn. 2000. Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clinical Cancer Research* 6(12): 4908-4914.

Heise, C., A. Sampson-Johannes, A. Williams, F. McCormick, D. D. Von Hoff and D. H. Kirn. 1997. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine* 3(6): 639-645.

Heise, C. C., A. Williams, J. Olesch and D. H. Kirn. 1999. Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther* 6(6): 499-504.

Heise, C. C., A. M. Williams, S. Xue, M. Propst and D. H. Kirn. 1999. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Research* 59(11): 2623-2628.

Hem, A. and A. Smith (2000) Laboratory Animal Veterinary Services, Universitetet i Bergen. [http://www.uib.no/vivariet/mou\\_blood/Blood\\_coll\\_mice\\_.htm](http://www.uib.no/vivariet/mou_blood/Blood_coll_mice_.htm). (2000)

Hemminki, A., A. Kanerva, E. J. Kremer, G. J. Bauerschmitz, B. F. Smith, B. Liu, M. Wang, R. A. Desmond, A. Keriell, B. Barnett, H. J. Baker, G. P. Siegal and D. T. Curiel. 2003. A Canine Conditionally Replicating Adenovirus for Evaluating Oncolytic Virotherapy in a Syngeneic Animal Model. *Molecular Therapy* 7(2): 163-173.

Herberman, R. B. 2002. Cancer immunotherapy with natural killer cells. *Seminars in Oncology* 29(3 Suppl 7): 27-30.

Hermiston, T. 2000. Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 105(9): 1169-1172.

Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Sumarski, C. R. Brandt and P. G. Spear. 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulfate and glycoprotein B. *Journal of General Virology* 75: 1211-1222.

Hidaka, C., E. Milano, P. L. Leopold, J. M. Bergelson, N. R. Hackett, R. W. Finberg, T. J. Wickham, I. Kovessi, P. Roelvink and R. G. Crystal. 1999. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* 103(4): 579-587.

Higginbotham, J. N., P. Seth, R. M. Blaese and W. J. Ramsey. 2002. Human Gene The Release of Inflammatory Cytokines from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro Following Exposure to Adenovirus Variants and Capsid. *Human Gene Therapy* 13: 129-141.

---

- 
- Hilleman, M. R. 1957. Epidemiology of adenovirus respiratory infections in military recruit populations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 67: 262-272.
- Hitt, M., A. J. Bett, C. L. Addison, L. Prevec and F. L. Graham. 1995. Techniques for Human Adenovirus Vector Construction and Characterization. *Methods in Molecular Genetics* 7: 13-30.
- Holden, H., R. Herberman and A. Santoni (1978). Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. *Symposium on the Use of Athymic Mice in Cancer Research*, Gustav Fischer. 81
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49.
- Hong, S. S., L. Karayan, J. Tournier, D. T. Curiel and P. A. Boulanger. 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO Journal* 16(9): 2294-2306.
- Horwitz, M. S. (1996). Adenoviruses. in: *Fields Virology*. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Raven Publishers: 2149-2171.
- Huebner, R., W. Rowe, T. Ward, R. Parrott and J. Bell. 1954. Adenoidalpharyngoconjunctival agents. *New England Journal of Medicine* 251: 1077-1086.
- Huggins, C., R. Stevens and C. Hodges. 1941. Studies on prostatic cancer II: The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Archives of Surgery* 43: 209-233.
- Ilan, Y. 1999. Oral Tolerance: A new tool for the treatment of gastrointestinal inflammatory disorders and liver-directed gene therapy. *Can J Gastroenterol* 13: 829-835.
- Ilan, Y., V. Jona, K. Sengupta, A. Davidson, M. Horwitz, N. Roy-Chowdhury and J. Roy-Chowdhury. 1997. Transient immunosuppression with FK506 permits long-term expression of therapeutic genes introduced into the liver using recombinant adenoviruses in the rat. *Hepatology* 26: 949-956.
- Jacobson, E. L., F. Pilaro and K. A. Smith. 1996. Rational interleukin-2 therapy for HIV positive individuals: Daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10405-10410.
- Jain, K. K. (1998). Chapter 3: Techniques of Gene Therapy. in: *Textbook of Gene Therapy*. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe & Huber Publishers: 15-33.
- Jain, R. 1994. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American* 271: 58-65.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001). Chapter 2: Innate Immunity. in: *Immunobiology*. New York, Garland Publishing: 35-92.
-

Jin, X., D. Nguyen, W. W. Zhang, A. P. Kyritsis and J. A. Roth. 1995. Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector. *Cancer Res* 55(15): 3250-3253.

Jooss, K., Y. Yang and J. Wilson. 1996. Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung. *Human Gene Therapy* 7: 1555-1566.

Kay, M., D. Liu and P. M. Hoogerbrugge. 1997. Gene Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12744-12746.

Khleif, S. N. and G. A. Curt (2000). Animal Models in Developmental Therapeutics. in: *Holland Frei Cancer Medicine*. Hamilton, B. C. Decker Inc.: 573-584.

Khuri, F. R., J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I. F. Tannock, L. Romel, M. Gore, J. Ironside, R. H. MacDougall, C. Heise, B. Randlev, A. M. Gillenwater, P. Bruso, S. B. Kaye, W. K. Hong and D. H. Kirn. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 6(8): 879-885.

Kirn, D. 2001a. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Therapy* 8(2): 89-98.

Kirn, D. 2001b. Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther* 1(3): 525-538.

Kirn, D., T. Hermiston and F. McCormick. 1998. ONYX-015: clinical data are encouraging. *Nature Medicine* 4(12): 1341-1342.

Kjeldsen-Kragh, J., A. J. Quayle, B. S. Skalhegg, M. Sioud and O. Forre. 1993. Selective activation of resting human gamma delta T lymphocytes by interleukin-2. *European Journal of Immunology* 23(9): 2092-2099.

Klempner, M., R. Noring, J. Mier and M. Atkins. 1990. An acquired chemotactic defect in neutrophils from patients receiving interleukin-2 immunotherapy. *New England Journal of Medicine* 322: 959.

Kochanek, S. 1999. High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Human Gene Therapy* 10(15): 2451-2459.

Kovacs, J. A., S. Vogel, J. M. Albert, J. Falloon, R. T. Davey, R. E. Walker, M. A. Polis, K. Spooner, J. A. Metcalf, M. Baseler, G. Fyfe and H. C. Lane. 1996. Controlled Trial of Interleukin-2 Infusions in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *The New England Journal of Medicine* 335(18): 1350-1356.

Kurihara, T., D. E. Brough, I. Kovesdi and D. W. Kufe. 2000. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *Journal of Clinical Investigation* 106(6): 763-771.

Lafferty, K. J. and A. J. Cunningham. 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 53(1): 27-42.

---

---

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Mathews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelson, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, J. Szustakowski, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi and Y. J. Chen. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.

Lewin, B. (2000). DNA. in: *Genes VII*. New York, Oxford University Press: 366-369.

Li, E., S. L. Brown, D. G. Stupack, X. S. Puente, D. A. Cheresh and G. R. Nemerow. 2001. Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *Journal of Virology* 75(11): 5405-5409.

Li, Y., R. C. Pong, J. M. Bergelson, M. C. Hall, A. I. Sagalowsky, C. P. Tseng, Z. Wang and J. T. Hsieh. 1999. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Research* 59(2): 325-330.

---

Li, Y., D. C. Yu, Y. Chen, P. Amin, H. Zhang, N. Nguyen and D. R. Henderson. 2001. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Research* 61(17): 6428-6436.

Lindl, T. and J. Bauer (1994). in: *Zell- und Gewebekultur Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Stuttgart Jena New York, Gustav Fischer Verlag.

Linke, S. P. 1998. Cancer. Has the smart bomb been defused? *Nature* 395(6697): 13, 15.

Liu, H.-S., M.-S. Jan, C.-K. Chou, P.-H. Chen and N.-J. Ke. 1999. Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 712-717.

Lowe, S. W. 1997. Progress of the smart bomb cancer virus. *Nat Med* 3(6): 606-608.

Lozier, J. N., G. Csako, T. H. Mondoro, D. Krizek, M. E. Metzger, R. Costello, J. G. Vostal, M. Rick, R. E. Donahue and R. A. Morgan. 2002. Toxicity of a First-Generation Adenoviral Vector in Rhesus Macaques. *Human Gene Therapy* 13: 113-124.

Luzzati, A. L. and E. B. Jacobson. 1972. Serum immunoglobulin levels in nude mice. *European Journal of Immunology* 2(5): 473-474.

Mannheim, B. h-Interleukin- 2 ELISA Instruction Manual. Boehringer Mannheim. Mannheim

Marr, R. A., M. Hitt, W. J. Muller, J. Gaultie and F. L. Graham. 1998. Tumour therapy in mice using adenovirus vectors expressing human TNF $\alpha$ . *Int J Oncol* 12(3): 509-515.

Marshall, E. 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286(5448): 2244-2245.

McCormick, F. 2001. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 1(2): 130-141.

Meropol, N. J., G. M. Barresi, T. A. Fehniger, J. Hitt, M. Franklin and M. A. Caligiuri. 1998. Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediate-dose pulsing. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 46: 318-326.

Meropol, N. J., M. Porter, L. E. Blumenson, M. J. Lindemann, R. P. Perez, L. Vaickus, G. M. Loewen, P. J. Creaven, K. A. Wilkes, M. A. Giedlin and M. A. Caligiuri. 1996. Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells in vivo without significant toxicity. *Clinical Cancer Research* 2: 669-677.

Mickey, D. D., K. R. Stone, H. Wunderli, G. H. Mickey, R. T. Vollmer and D. F. Paulson. 1977. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Research* 37(11): 4049-4058.

---

- 
- Mier, J. and R. Gallo. 1980. Purification and some characteristics of human T cell growth factor (TCGF) from PHA-stimulated lymphocyte conditioned media. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 6134.
- Miller, N. and R. Vile. 1995. Targeted vectors for gene therapy. *FASEB Journal* 9: 190-199.
- Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology* 15: 961-964.
- Mitani, K., F. L. Graham, C. T. Caskey and S. Kochanek. 1995. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus- dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9): 3854-3858.
- Mittereder, N., K. L. March and B. C. Trapnell. 1996a. Evaluation of the Concentration and Bioactivity of Adenovirus Vectors for Gene Therapy. *Journal of Virology* 70(11): 7498-7509.
- Mittereder, N., K. L. March and B. C. Trapnell. 1996b. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *Journal of Virology* 70(11): 7498-7509.
- Morgan, D., F. Ruscetti and R. Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal bone marrows. *Science* 193: 1007.
- Morral, N., W. K. O'Neal, K. Rice, M. M. Leland, P. A. Piedra, E. Aguilar-Córdova, K. D. Carey, A. L. Beaudet and C. Langston. 2002. Lethal Toxicity, Severe Endothelial Injury, and a Threshold Effects with High Doses of an Adenoviral Vector in Baboons. *Human Gene Therapy* 13: 143-154.
- Morral, N., R. J. Parks, H. Zhou, C. Langston, G. Schiedner, J. Quinones, F. L. Graham, S. Kochanek and A. L. Beaudet. 1998. High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity. *Human Gene Therapy* 9(18): 2709-2716.
- Morsy, M. A. and C. T. Caskey. 1999. Expanded-capacity adenoviral vectors - the helper-dependent vectors. *Molecular Medicine Today*(January): 18-24.
- Motoi, F., M. Sunamura, L. Ding, D. G. Duda, Y. Yoshida, W. Zhang, S. Matsuno and H. Hamada. 2000. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Therapy* 11(2): 223-235.
- Müller-Heidelberg, M. (2003). Immunologisches Monitoring der Gentherapie des Fibrosarkoms der Katze. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde. Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung. Technische Universität München
- Neely, J. E., E. T. Ballard, A. L. Britt and L. Workman. 1983. Characteristics of 85 pediatric tumors heterotransplanted into nude mice. *Experimental Cell Biology* 51: 217-227.
- Negrier, S., B. Escudier, C. Lasset, J. Y. Douillard, J. Savary, C. Chevreau, A. Ravaud, A. Mercatello, J. Peny, M. Mousseau, T. Philip and T. Tursz. 1998. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carci-
-

terleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *New England Journal of Medicine* 338(18): 1272-1278.

Nehls, M., D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich and T. Boehm. 1994. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372(6501): 103-107.

Nemunaitis, J., C. Cunningham, A. Buchanan, A. Blackburn, G. Edelman, P. Maples, G. Netto, A. Tong, B. Randlev, S. Olson and D. Kirn. 2001. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Therapy* 8(10): 746-759.

Nemunaitis, J., I. Ganly, F. Khuri, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples, L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye and D. Kirn. 2000. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Research* 60(22): 6359-6366.

Nemunaitis, J., F. Khuri, I. Ganly, J. Arseneau, M. Posner, E. Vokes, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, A. Blackburn, L. Romel, B. Randlev, S. Kaye and D. Kirn. 2001. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology* 19(2): 289-298.

Nomura, A., G. Stemmermann, P. Chyou, B. Henderson and F. Stanczyk. 1996. Serum androgens and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 5: 621-625.

O'Carroll, S. J., A. R. Hall, C. J. Myers, A. W. Braithwaite and B. R. Dix. 2000. Quantifying adenoviral titers by spectrophotometry. *Biotechniques* 28(3): 408-410, 412.

Ochsenbein, A. F., S. Sierro, B. Odermatt, M. Pericin, U. Karrer, J. Hermans, S. Hemmi, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411(6841): 1058-1064.

Okegawa, T., Y. Li, R. C. Pong, J. M. Bergelson, J. Zhou and J. T. Hsieh. 2000. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Research* 60(18): 5031-5036.

Osterman, J., A. Waddell and A. HV. 1970. DNA and gene therapy: uncoating of polyoma pseudovirus in mouse embryo cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67(1): 37-40.

Pandha, H. S., L. H. Stockwin, J. Eaton, I. A. Clarke, A. G. Dalglish, S. M. Todryk and G. E. Blair. 2003. Coxsackie B and adenovirus receptor, integrin and major histocompatibility complex class I expression in human prostate cancer cell lines: implications for gene therapy strategies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6(1): 6-11.

Parkinson, D., J. Abrams, P. Wiernik and e. al. 1990. Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 8: 1650.

---

- 
- Parkinson, D. R., J. S. Abrams, P. H. Wiernik, A. A. Rayner, K. A. Margolin, D. A. Van Echo, M. Sznol, J. P. Dutcher, F. R. Aronson and J. H. Doroshow. 1990. Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: a phase II study. *Journal of Clinical Oncology* 8(10): 1650-1656.
- Parks, R., C. Eveleigh and F. Graham. 1999. Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Therapy* 6: 1565-1573.
- Parks, R. J., L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M. A. Rudnicki and F. L. Graham. 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13565-13570.
- Pearson, A. S., P. E. Koch, N. Atkinson, M. Xiong, R. W. Finberg, J. A. Roth and B. Fang. 1999. Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* 5(12): 4208-4213.
- Peng, Y., E. Falck-Pedersen and K. B. Elkon. 2001. Variation in adenovirus transgene expression between BALB/c and C57BL/6 mice is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production and NK cell activation. *Journal of Virology* 75(10): 4540-4550.
- Pennisi, E. 1996. Oncology: Will a Twist of Viral Fate Lead to a New Cancer Treatment? *Science* 274: 342.
- Pierotti, M. A., S. A. Schichman, G. Sozzi and C. M. Croce (2000). Chapter 4: Oncogenes. in: *Cancer Medicine*. E. Frei. Hamilton, London, B.C. Decker Inc.: 57-66.
- Pollice, A. A., J. P. McCoy, Jr., S. E. Shackney, C. A. Smith, J. Agarwal, D. R. Burholt, L. E. Janocko, F. J. Hornicek, S. G. Singh and R. J. Hartsock. 1992. Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry* 13(4): 432-444.
- Prasher, D., V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast and M. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- Putzer, B. M., J. L. Bramson, C. L. Addison, M. Hitt, P. M. Siegel, W. J. Muller and F. L. Graham. 1998. Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum Gene Ther* 9(5): 707-718.
- Putzer, B. M., M. Hitt, W. J. Muller, P. Emtage, J. Gauldie and F. L. Graham. 1997. Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10889-10894.
- Rancourt, C., A. Piche, J. Gomez-Navarro, M. Wang, R. D. Alvarez, G. P. Siegal, G. M. Fuller, S. A. Jones and D. T. Curiel. 1999. Interleukin-6 modulated conditionally replicative adenovirus as an antitumor/cytotoxic agent for cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 5: 43-50.
- Rauen, K. A., D. Sudilovsky, J. L. Le, K. L. Chew, B. Hann, V. Weinberg, L. D. Schmitt and F. McCormick. 2002. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate
-

and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Research* 62(13): 3812-3818.

Reid, T., E. Galanis, J. Abbruzzese, D. Sze, J. Andrews, L. Romel, M. Hatfield, J. Rubin and D. Kirn. 2001. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Therapy* 8(21): 1618-1626.

Richards, C. A., E. A. Austin and B. E. Huber. 1995. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. *Human Gene Therapy* 6: 881-893.

Ries, S. J., C. H. Brandts, A. S. Chung, C. H. Biederer, B. C. Hann, E. M. Lipner, F. McCormick and W. M. Korn. 2000. Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nature Medicine* 6(10): 1128-1133.

Rodriguez, R., E. R. Schuur, H. Y. Lim, G. A. Henderson, J. W. Simons and D. R. Henderson. 1997. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Research* 57: 2559-2563.

Roelvink, P. W., A. Lizonova, J. G. Lee, Y. Li, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, D. E. Brough, I. Kovesdi and T. J. Wickham. 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of Virology* 72(10): 7909-7915.

Rogulski, K. R., S. O. Freytag, K. Zhang, J. D. Gilbert, D. L. Paielli, J. H. Kim, C. C. Heise and D. H. Kirn. 2000. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Research* 60(5): 1193-1196.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn and D. E. White. 1994. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271(12): 907-913.

Rothmann, T., A. Hengstermann, N. J. Whitaker, M. Scheffner and H. zur Hausen. 1998. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *Journal of Virology* 72(12): 9470-9478.

Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott and T. G. Ward. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 84: 570-573.

Rubenwolf, S., H. Schutt, M. Nevels, H. Wolf and T. Dobner. 1997. Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *Journal of Virology* 71(2): 1115-1123.

Sauthoff, H., J. Hu, C. Maca, M. Goldman, S. Heitner, H. Yee, T. Pipiya, W. N. Rom and J. G. Hay. 2003. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Human Gene Therapy* 14(5): 425-433.

---

- 
- Schiedner, G., N. Morral and R. Parks. 1998. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nature Genetics* 18: 180-183.
- Schmidt, W., T. Schweighoffer, E. Herbst, G. Maass, M. Berger, F. Schilcher, G. Schaffner and M. L. Birnstiel. 1995. Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4711-4714.
- Schorpp, M., M. Hofmann, T. N. Dear and T. Boehm. 1997. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics* 46: 509-515.
- Schrump, D. S., G. A. Chen, U. Consuli, X. Jin and J. A. Roth. 1996. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene Ther* 3(6): 357-364.
- Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248(4961): 1349-1356.
- Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71(7): 1065-1068.
- Shahidi, H. and R. Kilbourn. 1998. The role of nitric oxide in interleukin-2 therapy induced hypotension. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 119-126.
- Shaw, A. R., R. C. Bleackley, J. P. Merryweather and P. J. Barr. 1985. Modulation of human natural killer cell activity by recombinant human interleukin 2. *Cellular Immunology* 91(1): 193-200.
- Shenk, T. (1996). *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*. in: *Fields Virology*. F. B.N., K. D.M. and H. P.M. Philadelphia, Raven Publishers: 2111-2148.
- Shinoura, N., Y. Yoshida, R. Tsunoda, M. Ohashi, W. Zhang, A. Asai, T. Kirino and H. Hamada. 1999. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Research* 59(14): 3411-3416.
- Slos, P., M. De Meyer, P. Leroy, C. Rousseau and B. Acres. 2001. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8(+) T-cell immunity and NK activity. *Cancer Gene Ther* 8(5): 321-332.
- Smaglik, P. 2000. Clinical trials end at gene-therapy institute. *Nature* 405(6786): 497.
- Smith, R. R., R. J. Huebner, W. P. Rowe, W. E. Schatten and L. B. Thomas. 1956. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9(November-December): 1211-1218.
- Spitzweg, C., S. Zhang and E. R. Bergert. 1999. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Research* 59: 2136-2141.
-

- Stolberg, S. G. 1999. F.D.A. officials fault Penn team in gene therapy death. *New York Times (Print)*: A22.
- Subramanian, T., M. Kuppuswamy, J. Gysbers, S. Mak and G. Chinnadurai. 1984. 19-kDa tumor antigen coded by early region E1b of adenovirus 2 is required for efficient synthesis and for protection of viral DNA. *Journal of Biological Chemistry* 259(19): 11777-11783.
- Takayama, K., H. Ueno, X. H. Pei, Y. Nakanishi, J. Yatsunami and N. Hara. 1998. The levels of integrin alpha v beta 5 may predict the susceptibility to adenovirus-mediated gene transfer in human lung cancer cells. *Gene Therapy* 5(3): 361-368.
- Tanaka, F., M. Abe, T. Akiyoshi, T. Nomura, K. Sugimachi, T. Kishimoto, T. Suzuki and M. Okada. 1997. The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the in vivo transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 57(7): 1335-1343.
- Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto and J. Hamuro. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*: 302-305.
- Taniguchi, T. and Y. Minami. 1993. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell* 73: 5-8.
- Teodoro, J. G. and P. E. Branton. 1997. Regulation of Apoptosis by Viral Gene Products. *Journal of Virology* 71(3): 1739-1746.
- Tollefson, A. E., J. S. Ryerse, A. Scaria, T. W. Hermiston and W. S. Wold. 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220: 152-162.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, T. W. Hermiston, J. S. Ryerse, L. J. Wold and W. S. Wold. 1996. The adenovirus death protein (E3-11.6 K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *Journal of Virology* 70: 2296-2306.
- Tolozza, E. M., K. Hunt, S. Swisher, W. McBride, R. Lau, S. Pang, K. Rhoades, T. Drake, A. Belldegrun, J. Glaspy and J. S. Economou. 1996. In vivo cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector. *Cancer Gene Ther* 3(1): 11-17.
- Torbett, B. E. 2002. Reporter genes: too much of a good thing? *The Journal of Gene Medicine* 4: 478-479.
- Vasey, P. A., L. N. Shulman, S. Campos, J. Davis, M. Gore, S. Johnston, D. H. Kirn, V. O'Neill, N. Siddiqui, M. V. Seiden and S. B. Kaye. 2002. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20(6): 1562-1569.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G.
-

---

Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Nee-lam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hat-ton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levit-sky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351.

Verma, I. M. 2001. Germline gene therapy: yes or no? *Mol Ther* 4(1): 1.

Verma, I. M. and N. Somia. 1997. Gene Therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242.

Wade, N. 1999. Death leads to concerns for future of gene therapy. *New York Times* (Print): A22.

Wadman, M. 1998. Germline gene therapy 'must be spared excessive regulation'. *Nature* 392: 317.

Walter, J., Q. You, J. Hagstrom, M. Sands and K. High. 1996. Successful expression of human factor IX following repeat administration of adenoviral vector in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3056-3061.

---

Walters, R. W., P. Freimuth, T. O. Moninger, I. Ganske, J. Zabner and M. J. Welsh. 2002. Adenovirus Fiber Disrupts CAR-Mediated Intercellular Adhesion Allowing Virus Escape. *Cell* 110: 789-799.

Wein, L. M., J. T. Wu and D. H. Kirn. 2003. Validation and Analysis of a Mathematical Model of a Replication-competent Oncolytic Virus for Cancer Treatment: Implications for Virus Design and Delivery. *Cancer Research* 63: 1317-1324.

Welte, T., D. Leitenberg, B. N. Dittel, B. K. al-Ramadi, W. R. Hansen, B. Xie, C. A. Janeway, Jr., A. L. Bothwell, K. Bottomly and X. Y. Fu. 1999. The PTK-STAT signaling pathway has essential roles in T-cell activation in response to antigen stimulation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 64: 291-302.

Wickham, T., P. Mathias, D. A. Cheresh and G. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73: 309-319.

Wickham, T. J., P. W. Roelvink, D. E. Brough and I. Kovesdi. 1996. Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnology* 14(11): 1570-1573.

Wickham, T. J., D. M. Segal, P. W. Roelvink, M. E. Carrion, A. Lizonova, G. M. Lee and I. Kovesdi. 1996. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *Journal of Virology* 70(10): 6831-6838.

Wickham, T. J., E. Tzeng, L. L. Shears, 2nd, P. W. Roelvink, Y. Li, G. M. Lee, D. E. Brough, A. Lizonova and I. Kovesdi. 1997. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 71(11): 8221-8229.

Wilson, J. M. 1996. Adenoviruses as Gene-Delivery Vehicles. *The New England Journal of Medicine* 334(18): 1185-1187.

Wivel, N. A. and L. Walters. 1993. Germ-line modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262: 533-538.

Wodarz, D. 2001a. Viruses as antitumor weapons: defining conditions for tumor remission. *Cancer Research* 61(8): 3501-3507.

Wodarz, D. 2001b. Viruses as Antitumor Weapons: Defining Conditions for Tumor Remission. *Cancer Res* 61: 3501-3507.

Wold, W. S., K. Doronin, K. Toth, M. Kuppuswamy, D. L. Lichtenstein and A. E. Tollefson. 1999. Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Current Opinion in Immunology* 11(4): 380-386.

Worgall, S., G. Wolff, E. Falck-Pedersen and R. G. Crystal. 1997. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Human Gene Therapy* 8(1): 37-44.

---

- 
- Yang, Y., Q. Li, H. Ertl and J. Wilson. 1995. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *Journal of Virology* 69: 2004-2015.
- Yew, P. and A. Berk. 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357: 82-85.
- Yoshida, Y., A. Sadata, W. Zhang, K. Saito, N. Shinoura and H. Hamada. 1998. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9: 2503-2515.
- You, L., C. T. Yang and D. M. Jablons. 2000. ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients. *Cancer Research* 60(4): 1009-1013.
- Yu, D. C., G. T. Sakamoto and D. R. Henderson. 1999. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Research* 59: 1498-1504.
- Yu, T. K., E. G. Caudell, C. Smid and E. A. Grimm. 2000. IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. *Journal of Immunology* 164(12): 6244-6251.
- Yver, A. 2001. Does detection of circulating ONYX-015 genome by polymerase chain reaction indicate vector replication? *Journal of Clinical Oncology* 19(12): 3155-3157.
- Zhang, J. F., C. Hu, Y. Geng, J. Selm, S. B. Klein, A. Orazi and M. W. Taylor. 1996. Treatment of a human breast cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4513-4518.
- Zhang, W.-W. 1999. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy* 6(2): 113-138.
- Ziegler, L. D., P. Palazzolo, J. A. Cunningham, M. Janus, K. Itoh, K. Hayakawa, I. Hellstrom, K. Hellstrom, C. Nicaise and R. Dennin. 1992. Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in combination with subcutaneous interleukin-2 in patients with advanced carcinoma of the breast, colorectum, and lung. *Journal of Clinical Oncology* 10: 1470-1478.
-

## 13 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Bernd Gänsbacher für die Möglichkeit, in seinem Institut und unter seiner Leitung diese Arbeit anzufertigen; seine Anregungen und sein Enthusiasmus für Forschung und Wissenschaft haben mich begeistert.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Martina Anton, Gruppenleiterin im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, für die unermüdliche und engagierte Betreuung während der ganzen Zeit und für die Möglichkeit, mit ihren Viruskonstrukten arbeiten zu können.

Den MTAs und LTAs des Instituts danke ich für die hervorragende Unterstützung während der gesamten Zeit, u.a. Frau Sieglinde Wegerer für die Einführung in die Arbeiten in der Zellkultur und molekularbiologische Arbeitstechniken, Frau Gerlinde Stejskal für die Einführung in die Arbeiten mit dem ELISA und Photometer, Frau Edelburga Hammerschmidt für die Hilfe bei der Durchführung der Durchflussszytometrie, Frau Christine Heinze für die Einführung in die Anfertigung von Kryoschnittpräparaten und histologische Färbemethoden und Herrn Josef Straßmair für das zuverlässige Herstellen von Lösungen und Autoklavieren von Glaswaren.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Brill und Frau Dr. Julia Henke vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die Einführung in die Anästhesie und Injektion von Nacktmäusen.

Den Schwestern und Pflegern der Tierabteilung des Instituts danke ich für die sehr gute Pflege der Nacktmäuse und die Unterstützung während der Tierversuche.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Anton, insbesondere Herrn Matthias Strobl, danke ich herzlich für das stets angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima für angeregte Diskussionen und technische Unterstützung. Elisabeth Vögele danke ich für die gelegentliche Ablenkung und zahlreiche abendliche Memory Spiele (die ich fast alle verloren habe...).

Meiner Familie gilt der größte Dank. Ich bin meinen Eltern und meinem Bruder Martin tief verbunden für die immerwährende Unterstützung während der Studien- und Forschungszeit fern der norddeutschen Heimat. Für sie hatte ich weniger Zeit, als ich mir gewünscht hätte.

---

---

# LEBENS LAUF

Claas Heinrich Hinze

geboren am 27.09.1974 in Aurich

email: [claas.hinze@gmx.de](mailto:claas.hinze@gmx.de)

## Anstellungen:

- |                   |   |
|-------------------|---|
| ab 06/2003        | Resident in Pediatrics, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA                                |
| 06/2002 – 05/2003 | Wissenschaftlicher Assistent, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung, Klinikum rechts der Isar, München |

## Medizinische Ausbildung:

- |             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| 1998 – 2002 | Technische Universität München     |
| 1995 – 1998 | Medizinische Universität zu Lübeck |

## Klinische Rotationen / Famulaturen:

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 12/2001 - 03/2002 | Allgemeinchirurgie (PJ), Krankenhaus München-Bogenhausen   |
| 10/2001 - 12/2001 | Pädiatrische Infektionserkrankungen und Immunologie (PJ), Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA   |
| 08/2001 - 10/2001 | Pädiatrische Rheumatologie und Kardiologie (PJ), Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA   |
| 04/2001 - 08/2001 | Innere Medizin (PJ): Infektionserkrankungen, Hämatologie/Onkologie, Rheumatologie und Notfallmedizin, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, USA |
| 08/2000           | Neurologie (Famulatur); Technische Universität München   |
| 03/1999           | Pädiatrie (Famulatur); Kinderkrankenhaus an der Lachnerstraße, München   |
| 09/1998           | Chirurgie (Famulatur); Auguste-Viktoria Krankenhaus, Berlin  |
| 03/1998           | Innere Medizin (Famulatur); Nordstadt Krankenhaus, Hannover  |
-

**Prüfungen:**

12/2002	Clinical Skills Assessment (CSA), Atlanta, GA, USA
09/2002	USMLE Step 2
05/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998	USMLE Step 1
08/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1997	Ärztliche Vorprüfung

**Freiwillige Aktivitäten:**

1999-2003	Koordinator und Tutor der <i>Clinical Case Discussions</i> , Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
1999-2001	Studentischer Koordinator des Austauschprogramms zwischen der Technischen Universität München und des Weill Medical College of Cornell University, New York
10/2000	Studentischer Koordinator der zweiwöchigen Ferienakademie der Technischen Universität München und der Universität Erlangen im Sarntal, Südtirol, Kurs "Molekulare Medizin und klinische Fallpräsentationen"

**Zivildienst:**

09/1994-11/1995	Pflegedienst in der Abteilung für Innere Medizin des Nordstadt Krankenhauses, Hannover
-----------------	--

**Schulbildung:**

1981-1994	Grund- und weiterführende Schule in Seelze und Letter
-----------	---

---