

Angiostatische Gentherapie mittels adenoviral
vermittelter löslicher VEGF-Rezeptor-Komplexe
im murinen Metastasenmodell
des kolorektalen Karzinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tobias Christian Hilbert
aus Bonn

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. W. H. Caselmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Chr. Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2007

Medizinische Klinik und Poliklinik I der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn,
Direktor Prof. Dr. T. Sauerbruch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver
der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert

für Lena-Marie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das kolorektale Karzinom	8
1.2	Onkologische Gentherapie	9
1.3	Angiogenese und tumorales Wachstum	13
1.4	Murines CRC-Tumormodell	21
1.5	Ziel der Arbeit	22
2	Material	23
2.1	Geräte	23
2.2	Chemikalien	24
2.3	sonstiges Material	25
2.4	Medien und Lösungen	26
2.4.1	Reagenzien	26
2.4.2	Medien für Zellkultur	26
2.4.3	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	26
2.5	Zelllinien	28
2.6	Mausstämme	29
3	Methoden	31
3.1	Zellbiologische Methoden	31
3.1.1	Zellkultur	31
3.1.2	Nachweis der VEGF-Proteinexpression durch CT26-Zellen	33
3.1.3	Vorbereitung der CT26-Zellen für eine Tumorinduktion	33
3.2	Produktion der rekombinanten adenoviralen Vektoren	34
3.2.1	Grundlagen	34
3.2.2	Amplifikation der rekombinanten adenoviralen Vektoren	35
3.2.3	Viruskonzentration	39
3.2.4	Ausschluss Wildtypkontamination	41
3.2.5	Transgenexpression des Kontrollvektors AdLacZ <i>in vitro</i>	41
3.2.6	Nachweis des Transgens in infizierten Zellen	42
3.2.7	Nachweis der Transgenexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	42
3.3	Funktionelle Untersuchungen	43
3.3.1	<i>In vitro</i>	43
3.3.2	<i>In vivo</i>	44
3.4	Tiermodell für das metastasierte kolorektale Karzinom (CRC)	44
3.4.1	Allgemeine Bedingungen	44
3.4.2	Induktion subkutaner Tumoren	45
3.4.3	Tumorverlauf des subkutanen CRC-Modells	45
3.4.4	Induktion intrahepatischer Tumoren	46
3.4.5	Tumorverlauf des intrahepatischen CRC-Modells	47
3.4.6	Intravenöse Vektorinjektion	48
3.5	Laborchemische Analyse	48

3.5.1	Gewinnung von Untersuchungsmaterial.....	48
3.5.2	Lebertoxizität.....	48
3.5.3	VEGF-Aktivität im Serum.....	49
3.5.4	Transgenexpression im Serum.....	49
3.5.5	Nachweis der VEGF-Expression <i>in vivo</i>	49
3.5.6	VEGF-Aktivität in Gewebeproben.....	50
3.6	Histologische Methoden.....	50
3.6.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	50
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung von Paraffinschnitten...	50
3.7	Statistische Analysen.....	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Zellkultur.....	52
4.1.1	Nachweis der VEGF-Sekretion durch CT26-Zellen.....	52
4.2	Rekombinante adenovirale Vektoren.....	53
4.2.1	Virusamplifikation.....	53
4.2.2	Konzentrationsbestimmung.....	53
4.2.3	Ausschluss Wildtypkontamination.....	53
4.2.4	Transgenexpression des Kontrollvektors AdLacZ <i>in vitro</i> ...	54
4.2.5	Nachweis der Transduktion in infizierten Zellen.....	54
4.2.6	Transgenexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	55
4.3	Funktionelle Untersuchungen.....	56
4.3.1	<i>in vitro</i>	56
4.3.2	<i>in vivo</i>	57
4.4	Subkutanes murines CRC-Tumormodell.....	58
4.4.1	Etablierung eines subkutanen CRC-Tumormodells in der Balb/c-Maus.....	58
4.4.2	Systemische Therapie mit adenoviralen Vektoren.....	59
4.5	Intrahepatisches murines CRC-Tumormodell.....	64
4.5.1	Etablierung eines intrahepatischen CRC-Tumormodells in der Balb/c-Maus.....	64
4.5.2	Systemische Therapie mit adenoviralen Vektoren.....	64
4.6	Laborchemische Analyse.....	68
4.6.1	Lebertoxizität.....	68
4.6.2	Aktivität des VEGF im Serum.....	69
4.6.3	Transgenexpression im Serum.....	73
4.6.4	Untersuchung der organspezifischen VEGF-Expression....	74
4.6.5	VEGF-Aktivität in entnommenen Gewebeproben.....	75
5	Diskussion	77
5.1	Rekombinante Adenoviren.....	78
5.2	Angiostatische Konstrukte.....	80
5.3	Murines CRC-Versuchsmodell.....	82

5.4	Tumorwachstum unter systemischer Gabe von sFlk-1 bzw. sFlt-1	83
5.5	Auswirkungen der systemischen Gabe von sFlk-1 bzw. sFlt-1 auf das Überleben.....	85
5.6	Toxizität bei systemischer Gabe	86
5.7	VEGF unter Therapie	88
5.8	Ausblick.....	90
6	Zusammenfassung	91
7	Literaturverzeichnis	93
	Danksagung	106
	Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) zählt in der westlichen Welt nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen mit einer zunehmenden Inzidenzrate pro Jahr von wenigstens 1.000.000 Fällen weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen und ist für mehr als 500.000 Todesfälle jedes Jahr verantwortlich. Dabei zeigt sich eine deutlich inhomogene Altersverteilung, da mit zunehmendem Lebensalter die Inzidenz sprunghaft ansteigt und sich bei über 40 jährigen alle 10 Jahre verdoppelt.

Ätiopathogenetisch muß von einer multifaktoriellen Entstehung ausgegangen werden. So findet sich in ungefähr 10% der Krankheitsfälle ein genetischer Hintergrund, z.B. in Form einer Familiären Adenomatösen Polypose (FAP, diese eine obligate Präkanzerose) [Gardner, 1951; Vavra et al., 2002] oder eines Lynch-Syndroms (HNPCC) [Knaebel et al., 2005]. Langjährig bestehende chronisch entzündliche Darmerkrankungen, hierbei besonders zu nennen die Colitis ulcerosa mit high grade-Dysplasien [Boese-Landgraf, 1998], ein Z.n. Ureterosigmoideostomie [Azimuddin et al., 1999; Jansen et al., 1998], ein Schistosomenbefall des Darms [Yosry, 2006] sowie kolorektale Adenome und auch andere Malignomerkrankungen z.B. von Mamma, Ovar oder Uterus gelten als Risikoerkrankungen für die Entwicklung eines CRC. Darüber hinaus existieren gewisse prädisponierende Faktoren wie z.B. eine fett- und fleischreiche Kost oder Adipositas und auch der Konsum von Alkohol und Tabak [Giovannucci et al., 1995].

Mehr als 50% aller CRC-Patienten entwickeln über hämatogene Metastasierung Absiedelungen in der Leber [Ballantyne und Quin, 1993], in 25% der Fälle können diese bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fernmetastasen bedeutet hierbei eine enorme Verschlechterung der Prognose, Patienten im Tumorstadium IV nach UICC haben eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 5%.

In 30% der Fälle von metastasierten kolorektalen Karzinomen ist die

Leber der einzige Ort der Metastasierung [Fong, 1999]. Isolierte Lebermetastasen können mit kurativer Intention chirurgisch behandelt werden, bei disseminierter Metastasierung verbleiben nur mehr palliative Therapieansätze. Jedoch sind auch hier die Möglichkeiten begrenzt. Multiple Absiedelungen können mit Irinotecan, 5-FU und Folsäure und neuerdings auch in Kombinationstherapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab chemotherapeutisch behandelt werden. Daneben existieren CT- bzw. Ultraschall-gesteuerte lokale Therapieverfahren wie die Kryo- und Laserbehandlung oder die Radiofrequenzablation. Scheinbar besteht jedoch ein dringender Bedarf an verbesserten therapeutischen Möglichkeiten.

Der Umstand der frühzeitigen hepatischen Metastasierung und die dadurch bedingte Verschlechterung der Prognose einerseits und der begrenzten therapeutischen Optionen des metastasierten CRC andererseits wecken den Wunsch nach alternativen Therapieverfahren im Hinblick auf kurative und verbesserte palliative Möglichkeiten.

1.2 Onkologische Gentherapie

Ein gentherapeutischer Ansatz könnte eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, die an sich begrenzten Behandlungsoptionen des (metastasierten) kolorektalen Karzinoms zu erweitern. Hierbei wird genetisches Material (als Wildtypform oder auch genetisch modifiziert), das sog. „Transgen“, in Zellen eingeschleust, wo dessen Expression das maligne Geschehen zurückdrängen soll. Bei der Transfektion, also der Einbringung des Transgens, kommen verschiedene Verfahren zur Anwendung: 1. chemisch (u.a. Phosphatpräzipitation, kationische Polymere, Liposomen, molekulare Konjugate), 2. physikalisch (u.a. Elektroporation, Mikroinjektion, ‚gene gun‘), 3. biologisch (rekombinante Viren werden als Vektoren benutzt). Dabei sollte ein optimaler Vektor eine hohe und gezielte Zelltransduktion verursachen, wenig antigen wirken, eine große Kapazität für fremde DNA besitzen, eine gezielte und regulierbare Transgenexpression vermitteln und für Patienten sowie Umwelt gleichermaßen verträglich und sicher sein. Der Begriff „Vektor“ kann dabei einerseits sowohl im weiteren Sinne als „Gentaxi“ übersetzt werden (also z.B. ein Adenovirus), im engeren

Sinne beschreibt es auch genetische Sequenzen, in welche das Transgen eingebettet ist (beispielsweise ein Plasmid).

Grundsätzliche Vorteile der Gentherapie gegenüber der konventionellen medikamentösen Therapie sind im Idealfall die Langzeitwirkung, die sowohl systemische als auch lokale Regulierbarkeit der Genexpression mit hohen erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen vor Ort, die relativ milde Einflussnahme auf physiologische Prozesse und die geringen Nebenwirkungen [Nikol und Höfling, 1993]. Es lassen sich mit der Gentherapie darüber hinaus bestimmte Erkrankungen, wie z.B. Stoffwechselstörungen aufgrund des Fehlens bestimmter Enzyme, ursächlich therapieren.

Virale Vektoren in der Gentherapie

Virale Vektoren haben sich für den Gentransfer als außerordentlich effektiv erwiesen. Sie stellen ein natürliches Vektorsystem dar, das bereits Millionen von Jahren Zeit hatte, sich zu entwickeln und bezüglich Spezifität, Expressionseffizienz und Verringerung der Pathogenität während der Infektion optimiert ist [Nikol und Höfling, 1993; Walther und Stein, 2000; Robbins und Ghivizzani, 1998]. Gegenüber den anderen Methoden des Gentransfers wie z.B. der Elektroporation sind Vorteile beschrieben [Lefesvre et al., 2002], so ist u.a. die Transduktionseffizienz *in vivo* ungleich höher.

Bislang wurden in der Gentherapie u.a. Adenoviren, Herpesviren, Retroviren, adenoassoziierte Viren, Lentiviren, Baculoviren, SV40 und Vacciniaviren eingesetzt. Dabei hängt die Wahl des Vektors nicht zuletzt von der Art der zu therapierenden Erkrankung ab. Will man eine besonders hohe Transduktionseffizienz erreichen, verwendet man z.B. die unselektiven Adeno- und Sendaiviren. Wird dagegen eher eine Limitierung auf proliferierendes Gewebe gewünscht wie z.B. bei immunmodulatorischen Ansätzen der Tumorthherapie, wird man sich eher für selektive Retroviren und adenoassoziierte Viren entscheiden [Nikol und Höfling, 1993]. Daneben entscheidet aber auch der Therapieansatz an sich über die Wahl des Virus. Ist das Produkt des eingebrachten Gens z.B. toxisch, würde man eher eine transiente, also vorübergehende Expression erreichen wollen, soll hingegen z.B. ein Enzym-

mangel langfristig ursächlich behoben werden, sollte der Vektor sein Gen stabil in die transfizierten Zellen einbringen und dieses dort dauerhaft exprimiert werden. Nachteile viraler Vektoren gegenüber nicht-viralen Transfersystemen sind die aufwändigere Herstellung. Außerdem weisen sie eine größere Toxizität und Immunogenität bei niedrigerer Kapazität für fremde DNA auf.

Zur Integration *retroviralen* Genoms müssen sich die Zellen in der Teilungsphase befinden, womit eine Selektion von Geweben mit höherer Teilungsaktivität wie bei Tumoren erreicht werden kann. Immunologische Reaktionen sind selten. Die Transduktionseffizienz ist hoch [Walther und Stein, 2000], das Transgen wird stabil in die chromosomale DNA der Zielzelle eingebracht, was allerdings eine geringere Sicherheit mit sich bringt. Die Integration des genetischen Materials in das Erbgut der Zelle erfolgt oft ungerichtet, was zu einer Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Auch lassen sich Retroviren nur in relativ niedrigen Konzentrationen herstellen, und die Kapazität an aufzunehmender Fremd-DNA ist, verglichen mit anderen viralen Vektorsystemen, eher gering. Daher werden Retroviren heutzutage für den viralen Gentransfer nicht mehr so häufig eingesetzt wie zu Anfang.

Lentiviren auf Basis von HI-Viren als Vektorsysteme befinden sich noch im vorklinischen Untersuchungsstadium, effizienter Gentransfer *in vivo* ist bereits gelungen [Zufferey et al., 1997].

Die neuere Gruppe der *onkolytischen* Viren soll besonders selektiv Tumorzellen infizieren und diese als replikationskompetente Viren zerstören können. Es handelt sich hierbei um modifizierte Adenoviren [Nemunaitis et al., 2001; Kirn, 2001], Vertreter der Herpetoviridae [Markert et al., 2000; Martuza, 2000] oder auch Parvoviren [Moehler et al., 2001]. Auch diese Viren lassen sich als Vektoren benutzen und können so kombiniert antitumoral wirksam werden.

Die Steuerbarkeit des Gentransfers lässt sich durch die Verwendung bestimmter Promotoren, welche die Transkription der viralen DNA in RNA beeinflussen, noch verbessern. Diese lassen sich sowohl z.B. medikamentös aktivieren als dass auch solche Promotoren zur Verfü-

gung stehen, die selektiv in bestimmten Geweben bzw. Zelltypen aktiv sind.

Adenovirale Vektoren

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren. Sie werden über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und integrieren nicht in das Genom der Wirtszelle, sondern deponieren ihre DNA episomal im Zellkern. Es kann dadurch theoretisch nicht zu einer Tumorinduktion durch Erbgutschädigung wie z.B. bei Retroviren kommen. Da die übertragenen Gene meist nur kurze Zeit aktiv sind, werden diese lediglich „transient“ exprimiert. Die Applikation als therapeutische Maßnahme müsste also theoretisch wiederholt werden, allerdings werden adenovirale Proteine vom Immunsystem des Wirtsorganismus erkannt und es wird eine starke Immunantwort gegen diese ausgelöst, was eine wiederholte Gabe eigentlich unmöglich macht.

Vorteilhaft ist, dass Adenoviren über den ubiquitär vorkommenden Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor [Bergelson et al., 1997] auch sehr gut Zellen infizieren können, welche niedrige Proliferationsraten aufweisen [Block et al., 1997; Ragot et al., 1998] und in hohen Titerstufen hergestellt werden können [Romano et al., 1999]. Diese Tatsachen machen rekombinante Adenoviren als Vektoren für die Zwecke der Gentherapie attraktiv. Sie besitzen ferner einen natürlichen Hepatotropismus, was sie einerseits interessant macht für den therapeutischen Einsatz bei Erkrankungen im Bereich der Leber. Andererseits führen sie auch selbst zu einer Leberschädigung und es wurden bereits gravierende hepatische Dysfunktionen nach ihrer Anwendung beobachtet [van der Eb et al., 1998; Brand et al., 1997].

Mittlerweile existieren mehrere Generationen an gentherapeutisch eingesetzten Adenoviren. Modifikationen u.a. im Bereich der Kapazität für fremde DNA, der Fähigkeit zur autonomen Replikation, der Stärke der ausgelösten Immunantwort oder der Höhe erreichbarer Virustiter führten zur Entwicklung von Zweit- bzw. Drittgenerationsadenoviren. Sog. *adenoassoziierte Viren* haben kein eigenes Genom, welches z.B. Hüllproteine exprimieren könnte, eine Immunantwort wird hier weitgehend unterdrückt.

Für diese Arbeit wurden Adenoviren der ersten Generation eingesetzt. Hierbei ist die E1-Region deletiert, was einerseits Platz schafft für 3,2 kbp Fremd-DNA, andererseits dazu führt, dass die Viren nur noch *in vitro* in bestimmten Zelllinien replizieren können, welche das E1-Gen *in trans* anbieten. Nach zusätzlicher Deletion von E3 besteht Platz für mehr als zwei weitere kbp. Da das Adenovirus mit insgesamt 105 Prozent seines Genoms bepackt werden kann, ergibt sich für die adenoviralen Vektoren der ersten Generation Platz von maximal 7,5 kbp. Ein Nachteil der Deletion von E3 ist eine mögliche Zunahme der Immunreaktion gegen das Adenovirus, da E3 dem Virus hilft, der Immunantwort des Organismus zu entgehen [Nikol und Höfling, 1993; Imperiale und Kochanek, 2004].

Verschiedene gentherapeutische Strategien wurden bislang in vorwiegend experimenteller Form zur Behandlung des metastasierten CRC eingesetzt. Dabei kann auf verschiedenen Ebenen durch den Einsatz gentechnischer Verfahren versucht werden, die Tumorentstehung zu verhindern bzw. eine Wachstumsregredienz zu erreichen, u.a. durch Substitution von Tumorsuppressorgenen wie p53, durch Transfer von Suizidgenen in Tumorzellen, durch genetische Immunmodulation mittels Cytokinen oder, wie in der vorliegenden Arbeit, die Suppression des Tumorwachstums mittels antiangiogenetischer Substanzen mit Hilfe der Gentechnik.

1.3 Angiogenese und tumorales Wachstum

Bei der Angiogenese entwickeln sich neue Blutgefäße aus bereits vorhandenen. Bei Stimulation durch bestimmte Wachstumsfaktoren können ruhende Endothelzellen sich aus dem stabilen Zellverband lösen, wieder in den Zellzyklus eintreten, migrieren, die Basalmembran auflösen und ein Lumen bilden (Intussuszeption) [Folkman 1985, 1986]. Bei der Vaskulogenese hingegen entsteht ein primitiver uniformer Gefäßplexus aus mesodermalen Vorläuferzellen, Hämangioblasten und Angioblasten, welcher im Rahmen der Angiogenese schließlich zum reifen Gefäßsystem umgebaut wird [Ellis et al., 2001; Jain, 2003; Yancopoulos et al., 2000; Bhushan et al., 2002]. Beide Prozesse, Angio-

genese und Vaskulogenese, spielen während der Vaskularisierung im Rahmen der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Im Erwachsenen ergibt sich die physiologische Bildung der Blutgefäße maßgeblich durch Angiogenese. Diese ist essentiell während der Wundheilung, der Entwicklung des Menschen und der Reproduktion. Sie ist in allen diesen Fällen sehr eng reguliert. War man jedoch lange Zeit der Meinung, dass in der postnatalen Phase Neovaskularisation bei physiologischen als auch pathologischen Vorgängen ausschließlich durch die Umformung bereits vorhandener Gefäßstrukturen, also durch Angiogenese, geschieht, so gibt es in letzter Zeit Hinweise darauf, dass bei ischämischen, entzündlichen oder tumorösen Prozessen auch die Vaskulogenese eine Rolle spielt. So können Vorläufer von Endothelzellen das Knochenmark verlassen, im Blut zirkulieren und sich am Orte der Angiogenese festsetzen und dort die Gefäßneubildung unterstützen [Asahara et al., 1999]. Neovaskularisation ist heutzutage als Voraussetzung für das Fortschreiten des Tumor- und Metastasenwachstums anerkannt.

Im gesunden adulten Organismus wird Angiogenese durch ein Gleichgewicht zwischen negativ und positiv regulierenden Faktoren reguliert. Ohne die positiven Moderatoren ist sie normalerweise nicht nachweisbar [Shweiki et al., 1993]. Die Verlagerung dieses Gleichgewichts in Richtung der proangiogenen Faktoren wird als „angiogenic switch“ bezeichnet, in dessen Verlauf die Endothelzellen aktiviert werden [Distler et al., 2002]. Dabei nimmt die Angiogenese ihren Ausgangspunkt von postkapillären Venulen und Kapillaren, deren Wände lediglich aus Endothelzellen, Basallamina und Perizyten bestehen [Folkman, 1985]. Eine muskuläre Wand findet sich bei diesem Gefäßtyp nicht. Die Endothelzellen proliferieren normalerweise nicht, sie sind ruhende Zellen. Bei Aktivierung allerdings können sie eine Verdopplungszeit von 48 – 24 Stunden erreichen. Diese Aktivierung wird durch einen humoralen Stimulus bewirkt, dessen Auslöser eine mechanische Traumatisierung, eine immunologische Reaktion oder (wie im Fall der Tumorangiogenese) Gewebshypoxie sein kann.

Eine große Zahl von Wachstumsfaktoren ist in der Lage, Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu stimulieren. Dazu zählen u.a. die FGF

(Fibroblast Growth Factor)-Familie und deren Tyrosinkinaserzeptoren, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), HIF (Hypoxia inducible Factor) 1- α und HIF 2- α und andere. Es gibt darunter direkte Stimulatoren und solche, die z.B. Makrophagen dazu anregen, proangiogene Stoffe zu sezernieren.

Daneben wurden aber auch eine Reihe anti-angiogener (angiostatischer) Faktoren identifiziert. Dazu zählen unter anderem Thrombospondin-1, platelet factor 4, 16 kDa prolactin fragment, Arresten, Tumstatin, cleaved antithrombin, Angiostatin, Endostatin, die Interferone α , β und γ , Interleukin-12, TNF- α (tumor necrosis factor α) und auch VEGFR-1 und -2. Die Wirkweise der einzelnen angiostatischen Faktoren ist unterschiedlich. Zum einen wirken sie negativ auf die Proliferation und Migration, zum anderen induzieren sie Apoptose.

VEGF (,vascular endothelial growth factor')

Judah Folkman gelang 1970 die Isolierung eines Faktors aus Tumorgewebe, welchen er als verantwortlich für die Gefäßneubildung hielt, und noch im selben Jahr postulierte er, dass eine Inhibierung dieser Vaskularisation eine Option für die Therapie solider Tumoren darstellen könnte [J. Folkman, 1971]. Im Jahre 1983 wurde VEGF zum ersten Mal von Senger et al. als ,vascular permeability factor' beschrieben [Senger et al., 1983]. Seitdem wurden viele Mitglieder der VEGF-Familie identifiziert, außerdem die drei bisher bekannten Rezeptoren, welche die angiogenetische Wirkung vermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass der von Folkman isolierte Faktor der VEGFR-2-Rezeptor war.

Mittlerweile sind viele Proteine aus der VEGF-Gruppe bekannt, so z.B. das VEGF-A, -B, -C, -D oder der Plazenta-Wachstumsfaktor PlGF, wobei das VEGF-A als derjenige Wachstumsfaktor mit der größten Relevanz für die (Tumor-)Angiogenese angesehen wird. VEGF selbst wirkt, verglichen mit anderen Angiogenesefaktoren, relativ spezifisch auf Endothelzellen. Es regt deren Proliferation an und führt zu einer Steigerung der Permeabilität. Daneben ist auch ein gewisser chemotaktischer Einfluss z.B. auf verschiedene monozytäre Zellen bekannt, und auch an hämatopoietischen Zellen konnten Rezeptoren für VEGF

identifiziert werden. Neben der proliferationsfördernden Wirkung des VEGF auf Tumorgewebe durch Stimulation der Angiogenese konnte auch eine Einflussnahme über autokrine Mechanismen z.B. durch Herabregulation der Apoptose oder direkte Wachstumsstimulation der Zellen beobachtet werden [Schoeffner et al., 2005].

Wie bereits erwähnt, spielt VEGF vor allem im Rahmen der Angiogenese in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. Im adulten Organismus tritt es nur in Ausnahmefällen in Erscheinung. Dazu zählen z.B. Prozesse der Wundheilung oder auch die regelmäßig wiederkehrende Gefäßbildung im Rahmen der weiblichen Zyklusblutung. Hier wird VEGF in den menschlichen Ovarien gebildet und sezerniert. Bei pathologischen Vorgängen hingegen wird VEGF häufig wieder re-exprimiert, so z.B. bei Entzündungen, bei ischämischem Geschehen (z.B. beim Myokardinfarkt) oder auch beim Tumorwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass u.a. in hypoxischem Milieu die Expression der mRNA von VEGF merklich gesteigert ist [Shweiki et al., 1992] und der Abbau verlangsamt vonstatten geht.

VEGF ist ein Homodimer, welches aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 23 kD besteht [Ferrara und Henzel, 1989; Plouet et al., 1989], verbunden durch Disulfidbrücken. Es gehört in die Gruppe der Glykoproteine. Vom humanen VEGF sind bislang sechs splicing-Varianten bekannt, welche sich in der Länge der Aminosäureketten voneinander unterscheiden. Ein funktioneller Unterschied besteht in der Höhe des angiogenen Potentials. Manche Varianten sind hochdiffusibel und haben dementsprechend eine ausgeprägte angiogene Wirkung, wohingegen diese bei weniger diffusiblen Varianten geringer ausgebildet ist. Darüber hinaus bindet z.B. VEGF₁₆₅ an bestimmte Wachstumsfaktorrezeptoren, an welche VEGF₁₂₁ nicht binden kann.

Die Wirkung des VEGF wird im Wesentlichen durch zwei der drei bekannten VEGF-Rezeptoren vermittelt, VEGFR-1 und VEGFR-2. Dies rührt daher, dass nur diese beiden Rezeptoren in der Lage sind, alle splicing-Varianten des VEGF zu binden, darunter auch die des VEGF-A VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅. VEGFR-3 (Flt-4) dagegen bindet lediglich die Isoformen VEGF-C und -D [Robinson und Stringer, 2001]. VEGFR-1

wird auch als Flt-1 (‚fms-like tyrosine kinase‘) , VEGFR-2 als KDR (‚kinase insert domain containing receptor‘) und sein murines Analogon als Flk-1 (‚fetal liver kinase‘) bezeichnet. Beide Rezeptoren vermitteln den VEGF-Effekt über Tyrosinkinasen, also Enzyme. Sie sind aus sieben immunoglobulinartigen extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Tyrosinkinasesequenz, welche durch Kinase-Insert-Domänen unterbrochen wird, aufgebaut (s. Abb. 1). Die Bindung von VEGF an einen Rezeptor führt zur Dimerbildung zweier Rezeptoren, welche sich dabei im intrazellulären Bereich gegenseitig an Tyrosinresten „autophosphoryllieren“. An die phosphoryllierten Bereiche binden intrazelluläre, SH2-Domänen-tragende Signalproteine, welche so die Signalkaskade einleiten. Diese führt letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Zellantwort auf die Ligandenbindung in Form von z.B. Genaktivierung oder Proliferation umsetzen.

Neben den genannten Tyrosinkinaserzeptoren besitzen auch Neuropiline (Neuropilin-1 = NRP-1; Neuropilin-2 = NRP-2) aus der Gruppe der Semaphorine/Collapsin-Rezeptoren eine VEGF-bindende Funktion [Soker et al., 1998] und steigern als Corezeptoren die Wirkung von an „klassischen“ VEGF-Rezeptoren gebundenem VEGF.

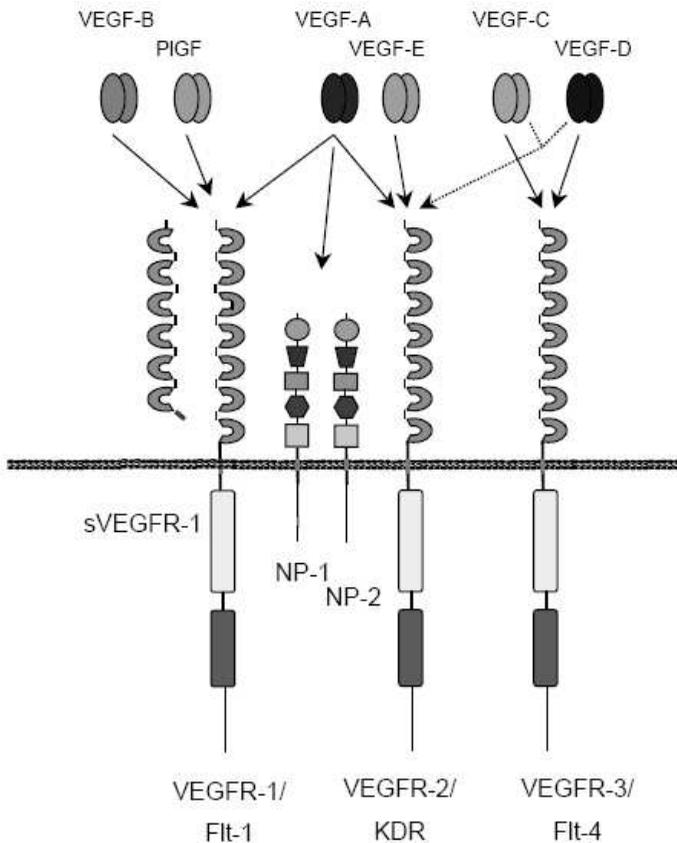


Abb. 1:
 Ultrastrukturelle Darstellung der drei Tyrosinkinase-Rezeptoren des VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 und von Neuropillin-1 und -2 mit ihren Liganden.
 Die drei Rezeptoren bestehen jeweils aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Einheit sowie der Kinase-Region. Die lösliche, nicht membrangebundene Form des ersten VEGF-Rezeptors, das sVEGFR-1, ist links im Bild dargestellt.
 (Abbildung modifiziert nach: „Parakrine Regulation der VEGF-Rezeptoren-1 und -2 in humanen Endothelzellen: Einfluß primärer Granulosazellen“, Wenzel, D., 2001)

Tumormetabolismus

Ohne die Bildung von neuen Gefäßen wird ein Tumor in der Regel nicht größer als ca. $1-2 \text{ mm}^3$ mit einigen Millionen Zellen, so z.B. das *carcinoma in situ*. Zellproliferation und -untergang halten sich in diesem Zustand die Waage. Der Tumor kann in diesem Stadium Wochen, Monaten oder sogar Jahre verbleiben und unterhält seinen Metabolis-

mus über Diffusion. Man bezeichnet diesen Zustand als „dormant state“. Fortschreitendes Wachstum der Neoplasie und Entfernung zum nächstgelegenen Gefäß stehen hierbei reziprok zueinander in Beziehung [Tannock, 1968, 1970].

Tumorangiogenese

Fortschreitendes Wachstum und damit auch Metastasierung eines soliden Tumors ist Angiogenese-abhängig. Die Verlagerung zum angiogenen Phänotyp erfordert nicht nur eine Hochregulierung der Angiogenese-Stimulatoren, sondern auch eine Herabregulierung der Angiogenese-Inhibitoren. Es ist bekannt, dass Tumorgewebe sowohl pro- als auch antiangiogene Faktoren exprimieren und sezernieren kann. Der Begriff des „angiogenic switch“ als deskriptive Umschreibung des bereits erwähnten Vorgangs der Überproduktion Angiogenese-induzierender Faktoren stellt das Durchbrechen des „dormant state“ eines Tumors durch Neubildung tumoraler Blutgefäße dar. Ab einem bestimmten Volumen kann dieser Schritt als essentiell für den Tumor angesehen werden, will dieser weiterhin wachsen [Hanrahan et al., 2003]. Er wird unter anderem durch ein hypoxisches Milieu und Absinken des pH-Wertes induziert. Die kritische Größe beträgt ungefähr $1 - 2 \text{ mm}^3$ [Naumov et al., 2006].

Die genauen Wirkmechanismen der genannten pro-angiogenen Faktoren sind noch nicht bekannt. Sie werden aus dem Tumorparenchym direkt und indirekt aus aktivierten Stromazellen freigesetzt und wirken letztlich direkt oder indirekt auf Endothelzellen, um so die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren (Angiogenese). Aber auch andere Wachstumsfaktoren wie extrazelluläre Matrixproteine und Zelladhäsionsmoleküle spielen hierbei eine Rolle. Die solchermaßen stimulierten endothelialen Zellen unterhalten ihrerseits diesen aktivierten Zustand durch die Freisetzung verschiedener Enzyme und Wachstumsfaktoren (positiver feedback-Mechanismus).

Die Angiogenese des Tumors sichert nicht nur dessen Versorgung mit Nährstoffen und die Aufnahme von Sauerstoff, sondern stellt auch die wichtige parakrine Stimulation mittels Proteasen und Zytokinen sicher, was essentielle Abschnitte des Tumorstadiums wie Invasion und

Metastasen-Bildung überhaupt erst ermöglicht. Die gebildeten Gefäßsysteme bilden allerdings keine vollständige Gefäßwand aus, sondern verbleiben auf einer relativ primitiven Ebene und sind sehr permeabel [Folkman und Cotran, 1976].

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression des VEGF mit der Progression, Invasion und Metastasierung kolorektaler Karzinome assoziiert ist [Hanrahan et al., 2003]. Ferner besteht aller Wahrscheinlichkeit nach ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Transkription von VEGF-DNA in mRNA in kolorektalen Karzinomen und einer Verschlechterung der Prognose der Patienten [Ishigami et al., 1998]. Die Zerstörung der tumoralen Gefäße mit hohen Dosen von TNF und Interferon- γ wirkt sich im Sinne einer Hemmung auf das Tumorwachstum aus. Diesen Umstand macht man sich auch bei der Embolisation von soliden Tumoren und Metastasen z.B. mit Gewebeklebern, Alkohol, Lipiden oder Gelatine zunutze. Inzwischen konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass sich im Falle der medikamentösen Hemmung der VEGF-vermittelten Angiogenese im metastasierten kolorektalen Karzinom z.B. mit dem chimären monoklonalen anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab ein lebensverlängernder Effekt ergibt [Venook, 2005; Susman, 2005; Fernando und Hurwitz, 2003; Hurwitz et al., 2004], seit 2005 ist dieses Medikament für die first-line-Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms in Verbindung mit anderen „klassischen“ Chemotherapeutika zugelassen.

Die fehlende Möglichkeit der Gefäßbildung schneidet dem Tumorgebe die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ab. Darüber hinaus gibt es aber auch noch andere antitumorale Wirkweisen:

- Der Tumor hat eine geringere Möglichkeit der (hämatogenen) Metastasierung.
- Eine zusätzliche onkologische Chemotherapie scheint besser zu wirken, der Tumor wird empfindlicher gegenüber Bestrahlung [Geng et al., 2001].
- Die Möglichkeiten, den zellulären Abwehrmechanismen des Immunsystems zu begegnen, werden gemindert.

Eine Möglichkeit, die durch VEGF vermittelte Gefäßneubildung und

-einsprossung u.a. in Tumoren unterbinden zu können, ist die Verwendung löslicher („soluble“) Formen der eigentlich membrangebundenen Rezeptoren des VEGF. Dadurch lässt sich die Wirkung des VEGF durch Bindung in der Gefäßbahn (sog. Sequestrierung) und Bildung von Heterodimeren aus „sRezeptor“ und VEGF, aber auch durch Ab-sättigung der externen Bindungsstellen der membranständigen VEGF-Rezeptoren, antagonisieren, indem so die Signalkaskade unterbrochen wird. Dieser Ansatz in Kombination mit den Vorteilen der Gentherapie ist Grundlage dieser Arbeit. Es wurden dabei gemäß oben dargestelltem Verfahren adenovirale Vektoren, welche die für die genannten löslichen VEGF-Rezeptoren kodierenden Gensequenzen transferieren, zur Behandlung subkutaner und intrahepatischer Metastasen des CRC experimentell eingesetzt.

1.4 Murines CRC-Tumormodell

Die therapeutischen Optionen insbesondere des metastasierten kolorektalen Karzinoms sind bislang begrenzt und von vornehmlich palliativem Charakter. Experimentelle Therapieansätze müssen zunächst in tierexperimentellen Studien auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen überprüft werden. Subkutane Modelle finden hierbei aufgrund des relativ unkomplizierten Verfahrens häufig Verwendung. Dabei werden humane oder (wie im vorliegenden Fall) murine Tumorzellen in das Unterhautgewebe implantiert. Die Immunantwort ist in diesen subkutanen Modellen intensiver als in einem intrahepatischen Modell, da durch den Kontakt u.a. der hier in größerer Zahl vorliegenden APC-Zellen und Langerhans-Zellen mit den fremden Antigenen das Immunsystem vielfältig stimuliert wird.

Intrahepatische Modelle haben demgegenüber Hindernisse, die eine Induktion und Beobachtung des Tumorwachstums erschweren. Dennoch sind gerade diese intrahepatischen Modelle wünschenswert, da sie der physiologischen Situation eines Tumors näher kommen. Verlaufsbeobachtungen müssen in diesem Fall regelmäßig mittels invasiver Verfahren wie Laparotomie oder Hepatektomie erfolgen, da Bildgebung mittels CT oder MRT nicht immer in entsprechendem Umfang

zur Verfügung steht und bei speziellen Fragestellungen auch nicht ausreichend Klärung schaffen kann.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, da hierfür die Methoden und Materialien sowohl im subkutanen als auch intrahepatischen Ansatz bislang gut erforscht und Effekte belegt sind.

Ziel vorliegender Dissertationsschrift war im Einzelnen:

1. rekombinante Adenoviren AdsFlk-1, AdsFlt-1 und AdLacZ zu amplifizieren und aufzureinigen. Nach Ausschluss einer Wildtypkontamination sollte die Transgenexpression überprüft werden.
2. die Aktivität und Toxizität von sFlk-1 und sFlt-1 in funktionellen Untersuchungen zu beurteilen.
3. Etablierung subkutaner Kolorektalkarzinomzellverbände durch Injektion von CT26-Zellen.
4. Etablierung intrahepatischer Kolorektalkarzinomzellverbände durch Injektion von CT26-Zellen.
5. die Wirkung und Toxizität einer systemischen Therapie mit AdsFlk-1 und AdsFlt-1 auf Tumorwachstum und Überlebensrate der Tiere zu untersuchen.
6. anhand von Blut- und Gewebsuntersuchungen die Expression und Wirksamkeit von sFlk-1 und sFlt-1 *in vivo* zu untersuchen.

2 Material

2.1 Geräte

Autoklav Modell 3870 ELV	Tuttnauer (Jerusalem, Israel)
Begasungsbrutschrank	Hereaus Sepatech (Osterode)
Elektrophorese-Kammer (DNA)	Biorad (München)
ELISA-Reader	Dynatech Laboratories (Frankfurt)
Festwinkelrotor SW50 TI	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Gefriermikrotom	Leica (Wetzlar)
Gefrierschränke	Bosch (Stuttgart)
Gefrierschränke	Liebherr (Linz, Österreich)
Gel-Video-Printer	Mitsubishi (Japan)
Kühlzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Lichtmikroskop, DMIL	Leica (Wetzlar)
Minishaker	IKA, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Netzgerät (Elektrophorese)	Biorad (München)
PCR-Cycler	Eppendorf GmbH (Hamburg)
pH-Elektrode	Hannah Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer	Gene Quant, Pharmacia (Freiburg)
Pipettierhilfe	Greiner (Solingen)
Schüttler	ProMax 2000, Heidolph (Kelheim)
Sicherheitswerkbank	Hereaus Sepatech (Osterode)
Swing Out Rotor SW41 TI	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Thermomixer	Eppendorf GmbH (Hamburg)
Tischzentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Ultrazentrifuge	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
UV-Tisch	Berthold (Pforzheim)
Waage SBA52	Scaltec (USA)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänningen)
Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge	DuPont (Bad Homburg)
Sorvall GSA (Rotor)	DuPont (Bad Homburg)
Sorvall SS34 (Rotor)	DuPont (Bad Homburg)

2.2 Chemikalien

Cäsiumchlorid (CsCl)	Biomol GmbH (Hamburg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Endothelial cell growth supplement	Cascade Biologics (USA)
Eosin-Farbe	Bayer AG (Leverkusen)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Formaldehyd	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Glutaraldehyd	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Glycerol	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Hämatoxylin-Farbe	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaninchen-anti-IgG-Antikörper	Sigma (USA)
Ketavet	Pharmacia (Erlangen)
Kochsalzlösung (0,9%)	B-Braun Melsungen AG (Melsungen)
Low Serum Growth Supplement	Cascade Biologics (USA)
L-Glutamin	Sigma Aldrich (Deutschland)
Matrigel™	BD Biosciences (Bedford, Großbritannien)
Magnesiumchlorid	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PBS Tabletten	Gibco BRL (Eggenstein)
SDS	Serva GmbH (Heidelberg)
Tris/ Cl	Fluka AG (Buchs, Schweiz)
Trypan Blau (0,4%)	Sigma Aldrich (Deutschland)
X-Gal	Hoffmann-LaRoche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)

2.3 sonstiges Material

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Cryo-Röhrchen (2 ml)	Greiner GmbH (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner GmbH (Frickenhausen)
6-, 24-, 96-Well-Platten	Greiner GmbH (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten	Greiner GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (100 mm)	Greiner GmbH (Frickenhausen)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Optiseal Ultrazentrifugen- Röhrchen	Beckman (Palo Alto, CA, USA)
Dialyse-Kammer	(10.000 MWCO) Perbio (Bonn)
Einmal-Kanüle (20 G x 1½)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Spritzen (Amefa 2 ml, 5 ml, 10 ml)	B.Braun (Melsungen)
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	Terumo Deutschland GmbH (Eschborn)
Nahtmaterial, resorbierbar, Maxon HR13 (1m, USP 5/0)	Aesculap (Tuttlingen)
Quarzküvette	Hellma (Mühlheim)
chirurgische Instrumente	Martin (Tuttlingen)
Skalpell (Cutfix No. 22)	Aesculap (Tuttlingen)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde)
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser (Braunschweig)
Paraplast	Sherwood Medical (Norfolk, NE, USA)
Pipetten	Gilson S.A. (Frankreich)
Einweg-Pipettenspitzen	Biozym (Oldendorf)
Tissue-Tek	Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande)

2.4 Medien und Lösungen

2.4.1 Reagenzien

DMEM/Ham's F-12	Sigma (Taufkirchen)
FCS ('fötales Kälberserum')	PAA (Cölbe)
Medium 200	Cascade Biologics Inc. (Portland, OR, USA)
Penicillin/ Streptomycin	Sigma (Taufkirchen)
LSGS	Cascade Biologics Inc. (Portland, OR, USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma (Taufkirchen)
Matrigel	Gibco/ BRL (Karlsruhe)
rekombinantes humanes VEGF	Sigma (Taufkirchen)
Agarose	Serva (Heidelberg)
100 bp-Leiter	Promega (Mannheim)
1 kb-Leiter	Invitrogen (Mannheim)

2.4.2 Medien für Zellkultur

DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium), Sigma (Taufkirchen)
Dieses Medium wurde für die Kultivierung von humanen embryonalen Retina-Zellen (HER 911), von Ad5-E1-transformierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), von humanen Lungenkarzinom-Zellen (A549) und von murinen Kolorektalkarzinomzellen (CT26) eingesetzt. Es wurde mit 1% Pen/Strep (v/v) und mit 10% FCS (v/v) angesetzt. Für die Virusherstellung wurde FCS auf 2% reduziert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.4.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)
10000 E Penicillin/ml und 10000 µg Streptomycin/ml wurden steril aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Lösung

0,5 g/l Trypsin (1:250) und 0,2 g/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden steril aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Einfrierlösung

Die Einfrierlösung (10% DMSO, 90% FCS) wurde für das Einfrieren der Zelllinien frisch angesetzt und vor der Verwendung steril filtriert.

Wasch-Puffer

Der Wasch-Puffer enthält TBS und 0,05% Tween 20. Er wurde für die Proteinbestimmung mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) angesetzt.

Karbonatpuffer

Der Karbonat-Puffer (pH 9,6) enthält 0,015 M Na_2CO_3 , 0,035 M NaHCO_3 . Er wurde für die Proteinbestimmung mittels ELISA angesetzt.

Fixierungslösungen

0,5% Glutaraldehyd

Es wurden 50 μl Glutaraldehyd auf 10 ml PBS steril angesetzt.

Färbelösung

Die Färbelösung enthält 400 mM Kaliumhexacyanoferrat (III), 400 mM Kaliumhexacyanoferrat (II), 200 mM Magnesiumchlorid, 2% X-Gal und PBS und wurde bei -20°C gelagert. X-Gal wurde frisch vorbereitet. Vor dem Färbevorgang wurden die Lösungen auf Raumtemperatur aufgetaut.

4%iges Paraformaldehyd

Es wurden 4 μl Paraformaldehyd auf 10 ml PBS steril angesetzt.

2.4.3.1 Lösungen für die Virusproduktion und –aufreinigung

Tris/Cl-Lösung

0,1 molare Tris-Base, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Cäsiumchlorid-Lösung

Soviel CsCl in 100 ml Aqua bidest. geben, bis Lösung gesättigt ist. Anschließend sterile Filtration.

OD-Puffer

Der OD-Puffer (pH 8,0) enthält 0,1% SDS, 10 mM Tris/Cl pH 7,4 und 1 mM EDTA. Er wurde für die OD-Messung der aufgereinigten Viruslösung frisch angesetzt.

PBS („phosphate buffered saline“)

2 Tabletten PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei) wurden in 1 l H_2O gelöst. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavierung. Die Lösung wurde bei RT gelagert.

2.5 Zelllinien

HER 911-Zelllinie

Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane embryonale Retinoblasten-Zelllinie, welche stabil für die adenovirale E1-Region transformiert ist. In ihnen lassen sich E1-deletierte Adenoviren vermehren. Diese Zellen wurden zur Amplifikation der rekombinanten adenoviralen Vektoren benutzt.

CT26-Zelllinie

Hierbei handelt es sich um eine murine Kolorektalkarzinom-Zelllinie, welche adhärent wächst. Diese Zellen wurden zur Tumorinduktion bei den Versuchstieren benutzt. Dazu erfolgte ihre Injektion intrahepatisch oder subkutan.

HEK 293-Zelllinie (ATCC, CRL-1573)

Bei diesem Typ handelt es sich um eine ebenfalls stabil für Ad5-E1 transformierte humane embryonale Nierenzelllinie, die von Dr. Fl. Graham 1977 etabliert wurde. Wir bezogen diese Zellen von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), kultiviert wurden sie in DMEM mit Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS). Die Zellen wachsen adhärent in einer Zellschicht und wei-

sen eine epitheliale Morphologie auf. Sie wurden für die Konzentrationsbestimmung der adenoviralen Vektoren im Plaque-Assay verwendet (Virustitration).

A 549-Zelllinie (ATCC, CCL-185)

Die A 549-Zelllinie ist eine humane Lungenkarzinomzelllinie, bezogen wurde sie von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), kultiviert in DMEM mit Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem Fötalem Kälberserum (FCS). Sie wächst adhärent in einer Zellschicht und weist eine epitheliale Morphologie auf. Sie wurde für den Transgennachweis, die Überprüfung der Vektorexpression und den Ausschluss der Wildtypkontamination benutzt, da aufgrund der Deletion für die E1-Region die verwendeten Adenoviren in dieser Zelllinie nicht, Wildtypviren aber wohl replizieren können.

HUVE-Zelllinie

Diese humane Nabelschnurendothel-Zelllinie („human umbilical endothelial vein cells“) wurde von Cascade Biologics (Portland, OR, USA) bezogen und nach dem Protokoll des Herstellers kultiviert. Diese Zellen wurden für die funktionelle Untersuchung der Angiogenesehemmung *in vitro* benutzt („tube formation assay“).

2.6 Mausstämme

Die Tiere wurden bezogen von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Für die Experimente wurden Tiere im Alter von sechs bis acht Wochen verwendet.

C3H/N (C3H/HeNCrl)

Dieser Mausstamm wurde 1920 von Strong aus einer Kreuzung eines „Bagg Albino“-Weibchens und eines DBA/J-Männchens entwickelt. 1974 wurde der Stamm an Charles River Lab. gegeben.

Die Mäuse wurden im zentralen Tierhaus der Universität Bonn unter Standardbedingungen gehalten und gezüchtet und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Mit diesen Tieren erfolgte die funktio-

nelle Untersuchung der Angiogenesehemmung *in vivo* („Matrigel Angiogenese Assay“).

Balb/c (BALB/cAnNCrI)

1913 entwickelte H. J. Bagg den „Bagg Albino“ aus dem Bestand eines Ohio-Züchters. Der Stamm gelangte ebenfalls 1974 zu Charles River Lab..

Die Tiere wurden ebenfalls im zentralen Tierhaus der Universität Bonn unter Standardbedingungen gehalten und gezüchtet, auch sie hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Diese Tiere wurden für die Untersuchung der antitumoralen Effekte benutzt, da die verwendeten CT26-Zellen für diesen Mausstamm syngen sind.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

HER 911-Zelllinie

Die Kultivierung von HER 911-Zellen erfolgte mit DMEM Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep (v/v)) im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). Diese Zelllinie wächst adhärent und muss für die Zellpassage abgelöst werden. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal in 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung ca. 2 min inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Zur Zellsuspension wurden 10 ml Medium zugegeben, in ein Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert (250 G, 5 min und bei 24°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (T-175 cm³) mit 40 ml Medium im Brutschrank (37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

CT26-Zelllinie

Die Kultivierung von CT26-Zellen erfolgte mit DMEM Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep (v/v)) im Brutschrank (37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). Diese Zelllinie wächst adhärent. Die Zellen müssen für die Passage abgelöst werden. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal in 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung ca. 2 min inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Zur Zellsuspension wurden 10 ml Medium zugegeben, in ein Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert (250 G, 5 min und bei 24°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (T-175 cm³) mit 40 ml Medium im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

HEK 293-Zellen und A549-Zellen

Die Kultivierung von 293-Zellen und A549-Zellen erfolgte mit DMEM Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep (v/v)) im Brutschrank (37°C, 10%

CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). Beide Zelllinien wachsen adhärent. Die Zellen müssen für die Zellpassage abgelöst werden. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal in 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung ca. 2 min inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Zur Zellsuspension wurden 10 ml Medium zugegeben, in ein Reagenzgefäß überführt und zentrifugiert (250 G, 5 min und bei 24 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (T-175 cm³) mit 40 ml Medium im Brutschrank (37 °C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

HUVE-Zellen

Die Kultivierung von HUVE-Zellen erfolgte mit Medium 200 (2 mM L-Glutamin, 30 µg/ml ‚endothelial cell growth supplement‘ (ECGS), 100 µg/ml Heparin, im Brutschrank (37 °C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) nach Protokollangaben (Cascade Biologics, Portland, OR, USA).

Einfrieren von Zellen

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte eingefroren in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert. Während der letzten Zentrifugation wurde die Einfrierlösung steril vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Einfrierlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde in Kryotubes aliquotiert (je 1 ml). Das Einfrieren wurde stufenweise vorgenommen. Zuerst wurden die Kryoröhrchen 2 h bei -20 °C, danach 24 h bei -80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung und weiteren Verwendung mussten die eingefrorenen Zellen möglichst schonend revitalisiert werden. Die entsprechenden Kryoröhrchen wurden unter ständiger Bewegung im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Ohne weiteres Erwärmen wurden sie im entsprechenden vorbereiteten Medium resuspendiert und zentrifugiert (250 G, 5 min, 24 °C). Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und in 20 ml Medium in eine Kulturflasche (T-75 cm³) überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

Auszählen von Zellen

Die Zellzahlbestimmung wurde in der Neubauer Zählkammer vorgenommen. Diese Zählkammer besteht aus einem Glasobjektträger mit einer Vertiefung und einem geschliffenen Deckglas. Zwischen Deckglas und Objektträger entsteht bei richtiger Stellung eine Kammerhöhe von 0,1 mm. In der Vertiefung des Objektträgers ist ein Gitternetz aus 4 (B-)Quadraten eingraviert. Jedes B-Quadrat besteht aus 4 x 4 (C-) Quadraten. Jedes der 4 B-Quadrate hat eine Größe von 1 x 1 mm, entsprechend 0,1 µl Volumen. Um die Zellvitalität zu überprüfen, wurde eine Vitalfärbung mit dem Farbstoff Trypanblau (0,4%) durchgeführt. Ca. 10 µl Trypanblau-Zellsuspension wurden anschließend vorsichtig an den Rand des Deckglases pipettiert. Danach wurden alle 4 B-Quadrate ausgezählt, wobei nur die vitalen Zellen berücksichtigt werden, welche den Farbstoff nicht aufgenommen haben. Die Zellzahl kann hinterher nach folgender Formel berechnet werden:

$$[(B1 + B2 + B3 + B4) : 4] \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

B = B-Quadrat

V = Verdünnungsfaktor (hier: 2)

3.1.2 Nachweis der VEGF-Proteinexpression durch CT26-Zellen

Um die Expression und Sekretion von VEGF durch CT26-Zellen nachzuweisen, wurde der Zellüberstand quantitativ mittels ELISA gemäß Protokoll des Herstellers auf den VEGF-Gehalt untersucht (Quantikine Mouse VEGF Assay, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland).

3.1.3 Vorbereitung der CT26-Zellen für eine Tumorinduktion

Die mit PBS gewaschenen und mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubierten und derart gelösten Zellen wurden in DMEM gewaschen. Dafür wurde die Zellsuspension in ein Reagenzglas überführt und zentrifugiert (250 G, 24°C, 5 min). Nach der zweiten Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml DMEM resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden in DMEM in der gewünschten Konzentration

resuspendiert. Bis zur Zellinjektion wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

3.2 Produktion der rekombinanten adenoviralen Vektoren

3.2.1 Grundlagen

Adenovirus

Adenoviren enthalten eine doppelsträngige lineare DNA (Desoxyribonukleinsäure) als Genom mit einer Länge von ca. 32-36 kBp. Das Genom besteht aus fünf kodierenden Bereichen, von denen vier (E1 bis E4, *early*) früh während der Infektion aktiviert werden. Die Gruppe der spät exprimierten Gene (L, *late*) ist für die Synthese der viralen Strukturproteine verantwortlich. Im Verlauf eines viralen Infektionszyklus werden die Gene der E-Gruppe (E1a, E1b, E2, E3 und E4) zuerst transkribiert. Dabei leitet das Genprodukt der E1a-Gene eine Expressionskaskade der anderen frühen Gene ein.

Die DNA-Replikation folgt der frühen Transkription in der späten Phase des Infektionszyklus. So werden die späten Gene exprimiert, die hauptsächlich Strukturproteine kodieren. Der reproduktive Zyklus führt dann zur Lyse der infizierten Wirtszellen.

Das für diese Arbeit verwendete Adenovirus gehört zum Typ 5, Subgruppe C. Es ist gut charakterisiert. Adenovirus Typ 5 (Ad5) wird häufig für gentechnische Arbeiten zum Gentransfer verwendet. Aus Sicherheitsgründen wurde die E1-Region von dem Adenovirus deletiert, so dass die oben dargestellte Expressionskaskade nicht ablaufen kann und so eine replikationsdefiziente Ad5-Mutante resultiert. Aus Kapazitätsgründen wurde außerdem die E3-Region deletiert, um die Kapazität für fremde DNA von ca. 2 kBp auf ca. 8 kBp zu erhöhen.

HER 911-Zelllinie

Die stabil Ad5-E1-transformierte HER 911-Zelllinie wurde als Verpackungszelllinie für die Replikation der Adenoviren verwendet. Sie enthalten die E1-Region, die für die Replikation der Adenoviren essentiell ist. Die Adenoviren binden an die 911-Zellen und lösen damit den Infektionsprozess aus. Die gesamte zellschädigende Auswirkung der

Adenoviren auf die Zelle wird als Zytopathogenität bezeichnet. Die wichtigste Form des erkennbaren Zellschadens manifestiert sich als Abkuglung der Zellen, der meist die Lyse folgt. Diese veränderte Zellmorphologie stellt die typische Form des zytopathischen Effekts dar. Er spiegelt den Einfluss viruskodierter Vorgänge auf zelluläre Prozesse wider, die den Bedürfnissen des Erregers angepasst werden. So wird je nach Virustyp der Zellstoffwechsel bei der Virusinfektion selektiv abgeschaltet. Die Adenoviren regulieren den Export der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma durch das Zusammenwirken viraler Proteine. Dabei werden zellspezifische Proteine im Kern zurückgehalten. Translatiert und exportiert werden ausschließlich die viralen Produkte. Das leitet auch den Zusammenbruch des Zellstoffwechsels ein.

Während der Virusreplikation ändert sich also die Zusammensetzung der Zellkomponenten. Verschiedene Zellkomponenten werden vermehrt oder vermindert produziert und verleihen der infizierten Zelle ein neues Erscheinungsbild. Die Zerstörung der Mikrofilamente, der Mikrotubuli und des Zytokeratingerüsts führen zu ihrer Abkuglung. Dabei verändert sich auch die Struktur der Kontaktstellen, durch die sich die Zellen aneinander binden und am Boden festhaften, so dass die Kontakte verloren gehen und die Abkuglung erfolgt. Neben diesem als zytopathischem Effekt bezeichneten Erscheinungsbild lassen sich früh Einschlusskörperchen nachweisen. Diese dienen als Zeichen, dass die Zelle mit Virus infiziert wurde. Es handelt sich um in der Zelle abgelagerte Virusproteine oder Viruspartikel, die sich durch Anfärben sichtbar machen lassen.

3.2.2 Amplifikation der rekombinanten adenoviralen Vektoren

Alle Virusexperimente wurden entsprechend der Anmeldung (§ 9 (1) GenTG) beim Landesumweltamt Düsseldorf durchgeführt (AZ 64-K-1.93/02).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene adenovirale Vektorkonstrukte verwendet. AdsFlt-1 und AdsFlk-1 tragen ein Fusionsprodukt aus dem für die extrazelluläre Domäne des VEGF-Rezeptors 1 bzw. 2 ko-

dierenden Gen mit einem für ein murines Immunglobulin-Fragment kodierenden Gen. AdLacZ trägt das LacZ-Gen von *E. coli*. Diese Gene wurden unter die Kontrolle des „early immediate“-Promotors des Cytomegalievirus gestellt und in die deletierte E1-Region des adenoviralen Genoms eingesetzt.

Die nähere Darstellung der Rezeptorsysteme des VEGF ist bereits erfolgt. Die Adenoviren AdsFlk-1 und AdsFlt-1 wurden großzügigerweise von R. Mulligan (Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt, die Herstellung dieses Vektorkonstrukts wird in der Literatur beschrieben [Kuo et al., 2001]. Die Viren tragen die Gene für sFlk-1 und sFlt-1. Diese kodieren für die löslichen VEGF-Rezeptorproteine sFlk-1 bzw. sFlt-1, welche in der Therapie verwendet wurden. Das Adenovirus AdLacZ enthält das LacZ-Gen von *E. coli*. Dieses LacZ-Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, das als Kontrollvektor verwendet wurde [Qian et al., 1995].

Unter Virusamplifikation versteht man die Vermehrung des Adenovirus, um die für die *in vitro*- und *in vivo*-Experimente benötigten Mengen zu erlangen. Geeignete Verpackungszellen werden in großer Anzahl infiziert, in Inkubationsschränken kultiviert, aufgebrochen und die freigesetzten Viruspartikel gewonnen. Der Prozess der Amplifikation findet in verschiedenen aufeinander folgenden Schritten statt. Diese umfassen die Zellinfektion, die Virusreplikation, die Virusaufreinigung und die Virusdialyse.

Die **Zellinfektion** erfolgt in den HER 911-Zellen mit dem Adenovirus. Wie vorher beschrieben, bieten die 911-Zellen die E1-Region *in trans* an, so dass eine Virusvermehrung stattfinden kann. Dabei entstehen replikationsdefiziente infektiöse Viren.

Dafür wurden HER 911-Zellen in zwei Kulturflaschen (T-175 cm³) kultiviert. Bei 70-80%iger Zellkonfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml des Virusstocks (15 ml, 2% FCS, DMEM pro Flasche) 30 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde erneut Kulturmedium (15 ml, 2% FCS, DMEM) dazugegeben und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert (37°C, 10% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Mindestens 80% der Zellen sollten infiziert sein und Zeichen des zytopathischen Effekts zeigen. Bei der Zellernte wurden die Zellen mechanisch durch Beklopfen der Kulturgefäße vorsichtig abgelöst. Danach wurden sie in Reagenzgefäße überführt und bei 1000 G und 24°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in frischen Reagenzgefäßen gesammelt. Das Pellet wurde in steriler Pufferlösung resuspendiert (je 0,5 ml 0,1 M Tris/Cl (pH 8) pro T-175 cm³ Flasche) und bei -80°C gelagert. Der infektiöse Zellüberstand wurde zur Infektion frischer 70-80% konfluenter 911-Zellen (30 Kulturflaschen à 175 cm³) verwendet (3 ml Überstand in 12 ml DMEM, 2% FCS pro Flasche). Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 15 ml DMEM (2% FCS) pro Flasche dazugegeben und für weitere 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und zentrifugiert (1000 G, 5 min, 24°C). Das Zellpellet wurde resuspendiert (0,5 ml/Flasche 0,1 M Tris/Cl, pH 8, steril) und bei -80°C gelagert.

Danach wurde die **Aufreinigung** des Adenovirus durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten Zellpellets wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Zellreste wurden bei 1500 G abzentrifugiert. In dem verbleibenden Überstand befanden sich die viralen Partikel. Der Überstand wurde geborgen, die Zelltrümmer verworfen.

Der so gesammelte Überstand wurde auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt, in welchen 3 ml gesättigte CsCl-Lösung vorgelegt wurde. Das freie Restvolumen wurde mit steriler Pufferlösung (0,1 M Tris/Cl, pH 8) aufgefüllt und entlüftet verschlossen. Jedes Röhrchen wurde mit einem Gummistopfen sowie mit einem kleinen Metallkämpchen verschlossen. Die jeweiligen Gegengewichte wurden auf 0,001 g austariert und in einen Festwinkelrotor gestellt, so dass die gleichgewichtigen Röhrchen einander gegenüber zu liegen kamen. Die Ultrazentrifugation erfolgte (100.000 G, 4°C, 22 h) bei maximaler Beschleunigung ohne Bremse. Während der Zentrifugation bildete sich ein CsCl-Gradient, so dass sich die intakten Viruspartikel entsprechend ihrer

Masse und dem Gradienten in einer milchigen Bande konzentrierten (s. Abb. 2).

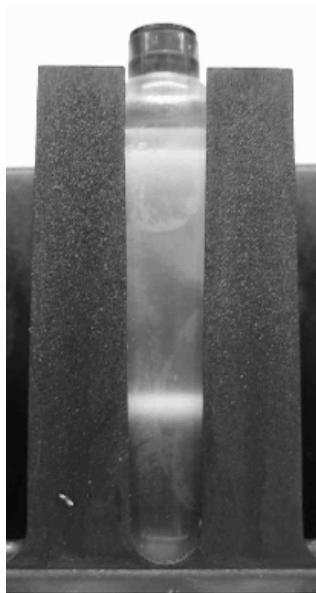


Abb. 2:
Konzentrierte Viruspartikel als Bande sichtbar im Zentrifugenröhrchen nach der CsCl-Gleichgewichts-Ultrazentrifugation

Um die Virusbande zu gewinnen, wurde eine 26-G-Kanüle ca. 1 cm unterhalb der Virusbande durch das Röhrchen in die Lösung vorgeschoben. Die abgeschrägte Kante der Kanüle wurde nach oben gerichtet und die Virusbande vorsichtig aspiriert. Die gewonnene Suspension wurde in ein frisches Ultrazentrifugenröhrchen überführt und das Restvolumen aufgefüllt (0,1 M Tris/Cl steril (ph 8) und gesättigte CsCl-Lösung im Verhältnis 2:1) und erneut zentrifugiert (100.000 G, 4°C, 22 h). Die Virusbande wurde erneut aspiriert und in eine Dialysekammer überführt. Die **Dialyse** erfolgt zunächst für 30 min in einem Becherglas gegen 700 ml PBS als Dialysat. Danach wurde das verwendete PBS durch frisches ausgetauscht und 30 min bei 4°C gerührt. Das PBS wurde weitere zwei Male durch 4°C kaltes PBS ersetzt. Das so aufgereinigte und konzentrierte Virus wurde in 150 µl Aliquots mit je 10% Glycerol bei -80°C gelagert.

3.2.3 Viruskonzentration

Die Viruskonzentration wurde mit einem Spektrophotometer (OD-Messung, opu/ml) und funktionell als zytopathischer Effekt (Plaque-Assay, pfu/ml) bestimmt.

3.2.3.1 OD-Messung

Durch Messung der optischen Dichte läßt sich die Menge der Viruspartikel bestimmen (,optical particle units', opu/ml). Diese Bestimmung liefert einen ungefähren Wert, welcher in die genauere Messung im Plaque-Assay einfließt.

20 µl Ad-Vektor-Stock wurden in 480 µl OD-Puffer überführt und bei 56°C 10 min unter Schütteln inkubiert. Als Nullwert-Lösung diente reiner OD-Puffer. Bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) wurde die Absorption in einer Quarzküvette gemessen. Der OD_{260} -Wert [opu/ml] wird in folgender Weise berechnet:

$$\text{opu/ml} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{12}$$

3.2.3.2 Zytopathischer Effekt ('Plaque Assay')

Bei dem zytopathischen Effekt (CPE) handelt es sich um die Abkuglung und Ablösung der mit Virus infizierten Zellen. Damit wurde ebenfalls die Konzentration der tatsächlich infektiösen Viruspartikel bestimmt. Bei dieser Methode wurden in einer Dilutionsreihe die höchsten Verdünnungen mit nachweisbarem CPE ermittelt. Dafür wurden 1×10^4 293-Zellen in 200 µl Medium je Loch einer 96-well-Zellkulturplatte für ca. 24 h zur Zellinfektion kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 50 µl unterschiedlicher Verdünnung des Adenovirus einschließlich Nullkontrolle (DMEM, 2% FCS, kein Virus) infiziert. Die höchste Dilution richtet sich nach dem Titer, der mittels OD-Bestimmung berechnet wurde. Die Bestimmung erfolgte im achtfachen Ansatz.

Tab. 1:
Verdünnungsreihe für den ‚Plaque Assay‘ (Bestimmung der pfu/ml)

Verdünnungsstufe	Medium [μ l]	Virus [μ l]	Faktor
1	495	5	1×10^2
2	990	10	1×10^4
3	990	10	1×10^6
4	500	500	2×10^6
5	500	500	4×10^6
6	500	500	8×10^6
7	500	500	$1,6 \times 10^7$
8	500	500	$3,2 \times 10^7$
9	500	500	$6,4 \times 10^7$
10	500	500	$1,28 \times 10^8$
11	500	500	$2,56 \times 10^8$
12	500	500	$5,12 \times 10^8$
13	500	500	$1,02 \times 10^9$
14	500	500	$2,05 \times 10^9$
15	500	500	$4,1 \times 10^9$
16	500	500	$8,19 \times 10^9$
17	500	500	$1,63 \times 10^9$
18	500	500	$3,26 \times 10^9$
19	500	500	$6,52 \times 10^9$
20	500	500	$1,3 \times 10^{10}$

Nach 6 h Inkubation wurden 150 μ l DMEM (2% FCS) pro Loch hinzugegeben und im Brutschrank 8 Tage inkubiert (37°C, 10% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). In der Regel konnten ab dem 5. Tag zytopathische Effekte beobachtet werden. Nach 8 Tagen wurde unter dem Durchlichtmikroskop die Anzahl der ‚plaque forming units‘ (pfu/ml) bestimmt. Es wurde die höchste Verdünnungsstufe ermittelt, bei welcher noch ein Plaque zu erkennen ist. Das Ergebnis der achtfachen Bestimmung wurde gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.2.4 Ausschluss Wildtypkontamination

Es wurde überprüft, ob die produzierten rekombinanten Adenoviren in der Karzinomzelllinie A549 replizieren können. Dies ist nur für Wildtyp-Viren (wAd) möglich bzw. für den Fall einer theoretisch möglichen Rekombination von ursprünglich E1-deletierten Adenoviren (rAd) mit wAd. Aufgrund der E1-Gen-Deletion der verwendeten rekombinanten Adenoviren findet für diese keine Virusreplikation statt, da die A549-Zellen die E1-Region nicht anbieten. So wurde eine Wildtypkontamination ausgeschlossen. Der Nachweis wurde analog zu der Methode geführt, die sich des zytopathischen Effektes bedient. Nur wurden anstelle von 293-Zellen A549-Zellen benutzt.

3.2.5 Transgenexpression des Kontrollvektors AdLacZ *in vitro*

Das Produkt des LacZ-Gens ist die β -Galaktosidase, deren Aktivität nachgewiesen werden kann. Die β -Galactosidase ist ein Enzym, das in der Lage ist, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) in β -D-Galaktose und 5-bromo-4-chloro-Indigo zu spalten, das eine Blaufärbung hervorruft, die im Lichtmikroskop sichtbar ist.

Dafür wurden zuerst $2,5 \times 10^5$ A549-Zellen in einer 6-Loch Zellkulturplatte mit 2 ml DMEM je Loch kultiviert. Nach 12 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen, außer der Negativkontrolle, mit MOI 250 infiziert. Unter MOI (*multiplicity of infection*) versteht man die durchschnittliche Anzahl an Viruspartikeln, die benötigt wird, unter Standardbedingungen eine Zelle zu infizieren. Nach 30 min Inkubationszeit wurden 1500 μ l 2%iger DMEM je Loch hinzugefügt. Die 6-Loch-Zellkulturplatte wurde für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1000 μ l PBS pro Loch gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1000 μ l 0,5%iger Glutaraldehydlösung fixiert. Während der 10 min Fixierungszeit wurde die Färbungslösung frisch angesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit 1000 μ l PBS pro Loch gewaschen und dann 1000 μ l Färbungslösung pro Loch überführt. Nach einer Inkubation von ca. 2 h wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung betrachtet. Die Anzahl der blauen Zellen repräsentierte die Anzahl der transfizierten Zellen. Die Anzahl von blauen Zellen pro Gesichtsfeld wurde durch die Gesamt-

zahl von Zellen dividiert und mit 100 multipliziert. So wurde die Prozentzahl der transfizierten Zellen ausgerechnet (Transduktionseffizienz).

3.2.6 Nachweis des Transgens in infizierten Zellen

Um die korrekte Funktion des adenoviralen Vektors zu überprüfen, wurde RNA aus mit Virus infizierten Zellen isoliert, diese revers transkribiert (also in cDNA umgeschrieben) und anschließend mittels PCR-Reaktion amplifiziert (RT-PCR).

A549-Zellen wurden dazu mit AdLacZ bzw. AdsFlk-1 infiziert (MOI 250). Nach 48 h Inkubation wurden Zellen und Zellkulturmedium gewonnen. Die RNA wurde mit dem ‚GenElute Total Mammalian RNA Kit‘ (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gemäß Herstellerangaben extrahiert und anschließend mit RQ1-DNase (Promega, Mannheim, Deutschland) verdaut. Die Nukleinsäurekonzentration wurde bestimmt und 1 µg RNA anschließend in der RT-Reaktion mit Random-Primern (Promega, Mannheim, Deutschland) und MMLV-Reverse-Transkriptase (Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die folgende Polymerasekettenreaktion (PCR, 30 Zyklen) für sFlk-1 wurde mit 5`-TCTGTGGTTCTGCGTGGA-3` als forward- und 5`-GTATCATTTCCAACCACCCT-3` als reverse primer durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Primer für humanes β-Actin benutzt. Die Größe der amplifizierten Produkte wurde mittels Elektrophorese im 1,2%igen Agarosegel ermittelt.

3.2.7 Nachweis der Transgenexpression *in vitro* und *in vivo*

Zum Nachweis des sFlk-1- bzw. sFlt-1-Proteins *in vitro* wurden 100 µl kultivierten Zellüberstandes von infizierten A549-Zellen in eine 96-Loch-Platte gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die ELISA-Platte für 2 Stunden mit anti-Maus-VEGFR-2(Flk-1)-Antikörper bzw. anti-Maus-VEGFR-1(Flt-1)-Antikörper (1:200, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:50.000, monoklonales anti-Schaf/Ziege-Peroxidase-Konjugat, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Nach wie-

derholtem Waschen wurde die Platte für 15 Minuten mit TMB-Substrat (Biozol, Eching, Deutschland) inkubiert. Die Farbtintensität wurde in einem ELISA-Lesegerät quantifiziert.

Der Nachweis des sFlk-1-Proteins *in vivo* erfolgte mittels western blot-Analyse. 5 µl Serum von mit AdLacZ bzw. AdsFlk-1 behandelten Tieren wurde auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Protein wurde auf eine PVDF-Membran übertragen, der Nachweis des sFlk-1-Proteins wurde mittels eines primären anti-Maus-VEGFR-2(Flk-1)-Antikörpers von der Ziege (1:500, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) und eines murinen anti-Ziege/Schaf-Sekundär-Antikörpers (1:160.000, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) geführt. 200 ng eines rekombinanten murinen VEGFR-2-Proteins (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Entwickelt wurde mittels Chemolumineszenz-Kit (SuperSignal West Pico) auf CL Xposure-Film (beides Perbio, Bonn, Deutschland).

3.3 Funktionelle Untersuchungen

3.3.1 *In vitro*

3.3.1.1 Tube-Formation Test

Die Potenz der verwendeten angiostatischen Proteine, das Wachstum von Gefäßen zu inhibieren, läßt sich *in vitro* mit Hilfe des Tube-Formation-Tests verifizieren. Dieser Test wurde mittels HUVE-Zellen in einer 24-Loch-Platte durchgeführt, welche zuvor mit Matrigel beschichtet wurde. „MatrigelTM Basement Membrane Matrix“ ist eine extrazelluläre Matrixsubstanz, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom stammt. Bei 4°C ist sie flüssig, zwischen 22°C und 35°C gallertartig. Hier einsprossende Gefäßstrukturen sind lichtmikroskopisch sicht- und quantifizierbar.

A549-Zellen wurden mit AdLacZ (als Kontrollvektor) und AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1, jeweils MOI 250, über 70 h inkubiert. 320 µl Matrigel wurden pro Loch eingesetzt. HUVE-Zellen wurden in 1%igem Medium 200 re-

suspendiert, so dass jedes well 75 μ l Suspension mit 25.000 Zellen enthielt. Eine Vorinkubation erfolgte mit 75 μ l Überstand der infizierten A549-Zellen, 30 min, 37°C, 10% CO₂. Danach wurden 150 μ l Medium 200 mit 10% LSGS („low serum growth supplement“) pro Loch hinzugefügt und 4-6 h inkubiert (37°C, 10% CO₂). Die Quantifizierung wurde durch Auszählung der vollständig ausgebildeten *tubes* (= gefäßartige Strukturen) im ganzen well unter dem Durchlichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung vorgenommen.

3.3.2 *In vivo*

3.3.2.1 Matrigel-Angiogenese Test

In vivo wurde die Angiogenese ebenfalls mittels Matrigel untersucht. Es sollte gezeigt werden, welche Auswirkung die Behandlung mit adenoviralen Vektorkonstrukten auf die Ausbildung gefäßartiger Strukturen innerhalb der Matrigelsubstanz *in vivo* hat.

Dafür wurden 5×10^9 pfu AdlacZ bzw. AdsFlk-1 in die wärmedilatierte Schwanzvene von C3H-Mäusen gespritzt. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse wie unten beschrieben betäubt, das ventrale Abdomen wurde rasiert und desinfiziert. Es wurden subkutane Depots von jeweils 500 μ l Matrigel-VEGF₁₆₅ (10 ng/ml VEGF) in die rechtsseitige midabdominale Region der Tiere gesetzt. Nach neun Tagen wurden die Tiere getötet, die Matrigel-Depots entnommen und in 4%igem Formalin fixiert. Sodann wurden Dünnschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Unter dem Durchlichtmikroskop wurde die Anzahl gefäßähnlicher Strukturen unter Verwendung eines Objektivgitternetzes ermittelt.

3.4 Tiermodell für das metastasierte kolorektale Karzinom (CRC)

3.4.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Tierexperimente wurden nach Genehmigung (AZ 50.203.2-BN 22, 12/01) der Bezirksregierung Köln durchgeführt.

Es wurden Balb/c-Mäuse benutzt, weil die für die Induktion subkutaner bzw. intrahepatischer Tumorzellverbände verwendete murine Kolorektalkarzinomzelllinie CT26 für diesen Mausstamm syngen ist. Die Betäubung der Tiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von Rompun 2% 0,01 mg/g KG, Ketanest 0,1 mg/g KG in 0,9%iger NaCl-Lösung (injiziertes Volumen 100 µl) mit einer 29-G-Insulinspritze. Nach der Anästhesie wurden die Mäuse bis zum Erwachen intensiv beobachtet. Während des Beobachtungszeitraums wurden nicht nur objektive Daten in Bezug auf Tumorgrößenentwicklung oder Überlebensvorteile erhoben, auch wurde das subjektive Befinden der Tiere anhand von Parametern wie Fressgewohnheiten, Fellpflege und Sozialverhalten beobachtet.

3.4.2 Induktion subkutaner Tumoren

CT26-Zellen wurden wie beschrieben vorbereitet. In Vorversuchen wurden die ideale Zellzahl und -konzentration zur Induktion subkutaner Tumoren ermittelt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen in 100 µl FCS-freiem DMEM resuspendiert. Bis zur Injektion wurden sie bei 4°C gelagert. Die Mäuse wurden wie beschrieben betäubt und im Bereich der rechten Flanke rasiert. Rechts dorsokaudal der Spina zwischen Hinterlauf und Schwanzansatz wurde eine Hautfalte produziert und die Zellen mit Hilfe einer 29-G-Insulinspritze langsam subkutan injiziert (100 µl). Bis zum Erwachen wurden die Tiere eng überwacht.

3.4.3 Tumorverlauf des subkutanen CRC-Modells

Die Mäuse wurden jeden zweiten Tag körperlich untersucht und die Injektionsstelle kontrolliert. Die Messung der Tumorgröße wurde mit Hilfe eines Messschiebers in zwei Durchmessern, Länge und Breite, vorgenommen und das Volumen mit folgender Formel approximiert:

$$\text{Volumen} = a \times b^2 \times 0,52$$

a = Längsdurchmesser [mm]

b = Querdurchmesser [mm]

Es wurden zwei verschiedene Studienansätze verfolgt. In beiden Fäl-

len erfolgte die Induktion der Tumoren gemäß der obigen Darstellung, an Tag 6 *post injectionem* die Aufteilung in drei gleichgroße Therapiegruppen durch i.v. Injektion der adenoviralen Vektoren AdLacZ, AdsFlk-1 und AdsFlt-1 gemäß unten dargestelltem Vorgehen.

Im ersten Ansatz erfolgte die Kontrolle des Tumorwachstums durch regelmäßiges Messen der Größenentwicklung. Wenn der Tumor im Mittel einen Durchmesser von 15 mm erreichte, wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und dieser Zeitpunkt als Sterbedatum notiert. Somit konnte sowohl das Wachstumsverhalten als auch ein möglicher Überlebensvorteil durch die Therapie untersucht werden.

Im zweiten Ansatz wurde zu definierten Zeitpunkten willkürlich eine festgelegte Anzahl von Tieren aus den jeweiligen Versuchsgruppen entnommen, getötet und die Tumorgößen bestimmt sowie Gewebs- und Serumproben zur späteren laborchemischen Analyse gewonnen. In diesem Versuchsansatz sollten u.a. die Lebertoxizität und die Entwicklung des VEGF-Serumspiegels bei unterschiedlichen systemischen Behandlungen untersucht werden.

3.4.4 Induktion intrahepatischer Tumoren

Der intrahepatische Ansatz wurde als hepatisches Einzeltumormodell des metastasierten CRC realisiert. CT26-Zellen wurden wie beschrieben vorbereitet. Sie wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen in 50 μ l reinem DMEM resuspendiert. Bis zur Zellinjektion wurden sie bei 4°C gelagert. Nach Betäubung wie beschrieben wurde das ventrale Abdomen sorgfältig rasiert. Die Mäuse wurden in Supinationslage fixiert. Nach Desinfektion des rasierten Hautbereichs erfolgte ein sagittaler Oberbauch-Hautschnitt median bis zum Sternum (ca. 1 cm). Vorsichtig wurde die Haut vom Peritoneum präpariert. Dieses wurde ebenfalls mittels eines sagittalen Oberbauchschnitts median in der Linea alba bis zum Sternum eröffnet. Dabei wurde mit einer anatomischen Pinzette die Abdominalwand leicht angehoben. Der linke Leberlappen wurde identifiziert und behutsam herausluxiert und auf steriler Gaze für die Zellinjektion fixiert. Die CT26-Zellen wurden mittels einer 29-G-Insulinspritze subkapsulär binnen 1 min langsam in den linken Leber-

lappen injiziert. Nach der Injektion wurde für ca. 5 min mit einem sterilen Haemostyptikum tamponiert, um eine Blutung sowie einen Zellaustritt zu vermeiden. Die Leber wurde in die intraperitoneale Lage reponiert und die ventroabdominale Wand in zwei Schichten mit 5/0 resorbierbarem Faden verschlossen. Dabei wurde zuerst die muskuläre Wand und danach die Haut verschlossen. Die Wunde wurde desinfiziert und die Tiere bis zum Erwachen beobachtet.

3.4.5 Tumorverlauf des intrahepatischen CRC-Modells

An Tag 3 *post injectionem* erfolgte die Aufteilung in drei gleichgroße Therapiegruppen durch i.v. Injektion der adenoviralen Vektoren gemäß unten dargestelltem Vorgehen. Die Verlaufsbeobachtung wurde mittels zweier Methoden durchgeführt, explorativer Laparotomie und Organentnahme. Hierbei wurden die Tumormassen in zwei Durchmessern, Länge und Breite, mit Hilfe eines Messschiebers gemessen. Die Mäuse wurden innerhalb von 14 Tagen nach der Tumorinduktion einmal in Narkose relaparotomiert und zuletzt mittels zervikaler Dislokation getötet und obduziert. Dabei wurden Serumproben für die spätere laborchemische Analyse gewonnen.

3.4.5.1 Explorative Laparotomie

Das Verfahren wurde wie bei der Tumorinduktion durchgeführt, so dass die Leber herausluxiert wurde und die Tumormassen in zwei Durchmessern, Länge und Breite, gemessen wurden. Es wurde auch auf intraperitoneale Metastasierung hin untersucht. Die Leber wurde in intraperitoneale Lage reponiert und wie oben beschrieben weiter behandelt. Die Mäuse wurden bis zum Erwachen intensiv beobachtet.

3.4.5.2 Organentnahme

Nach dem Töten der Tiere wurden Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber und Niere gewonnen. Die hepatischen Tumormassen wurden mittels eines Messschiebers in zwei Durchmessern, Länge und Breite, gemessen.

Tumorproben wurden sowohl von den subkutanen als auch von den hepatischen Tumoren gewonnen.

3.4.6 Intravenöse Vektorinjektion

An Tag 4 bzw. Tag 6 post Tumorinduktion erfolgte der Beginn der systemischen Therapie durch intravenöse Injektion der adenoviralen Vektoren. Die Tiere wurden fixiert und mittels einer Infrarotlampe eine Hyperämie der Schwanzgefäße herbeigeführt. Als optimale Konzentration der adenoviralen Vektoren wurde, basierend auf den Ergebnissen voriger Studien, 5×10^9 pfu, resuspendiert in 150 μ l NaCl 0,9%, festgelegt. Die Vektoren wurden bis zur Injektion bei 4°C gelagert. Die Schwanzvene wurde identifiziert und o.g. Konzentration langsam mit Hilfe einer 29-G-Insulinspritze intravenös injiziert.

3.5 Laborchemische Analyse

3.5.1 Gewinnung von Untersuchungsmaterial

Im Serum der Tiere wurde die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT) als indirekter Parameter für das Ausmaß der Leberschädigung gemessen. Ebenso wurden Serumspiegel des VEGF und der exprimierten Proteine mittels ELISA bzw. western blot gemessen und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dazu wurden, wenn die Tiere getötet wurden, Vollblutproben gewonnen, diese zentrifugiert und das Serum abgenommen. Dieses wurde zur späteren laborchemischen Analyse bei -20°C eingefroren. Desweiteren wurde nicht-tumortragenden, mit den adenoviralen Vektorkonstrukten behandelten Tieren Blut entnommen und zur späteren Analyse eingefroren.

Außerdem wurde Tumorgewebe und Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber und Niere gewonnen und direkt im Anschluss an die Entnahme in flüssigen Stickstoff gebettet, anschließend bei -80°C eingefroren und so zur späteren laborchemischen Analyse konserviert. In homogenisierten Proben dieses Gewebes wurde einerseits die Genexpression VEGF durch Nachweis der mRNA, andererseits die organspezifische VEGF-Aktivität gemessen.

3.5.2 Lebertoxizität

Die Hepatotoxizität der injizierten adenoviralen Vektoren wurde an-

hand der Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum behandelter Tiere quantifiziert. ALT ist ein leberspezifisches Enzym. Die Höhe des Enzymanstieges kann als Marker einer Leberzellschädigung gesehen werden.

Die Lebertoxizität der adenoviralen Vektoren wurde im laufenden Versuch bei subkutan tumortragenden Tieren durch ALT-Bestimmung überprüft. Die Messung wurde als Standardmessung im biochemischen Routinelabor maschinell durchgeführt.

3.5.3 VEGF-Aktivität im Serum

Die Bestimmung des VEGF im Serum der behandelten Tiere erfolgte quantitativ in Proben von 20 µl Serum unter Verwendung des Quantikine Mouse VEGF Assay (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers.

3.5.4 Transgenexpression im Serum

Der Nachweis der exprimierten Transgene erfolgte exemplarisch als qualitativer Nachweis von sFlk-1-Protein im Serum behandelter Tiere mittels western blot-Untersuchung. Dafür erfolgte die Aufspaltung der Proteine zunächst auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel, gefolgt vom Transfer auf eine PVDF-Membran. sFlk-1 wurde mit einem anti-Maus-VEGFR-2-Antikörper von der Ziege (1:500, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) als primärem, anschließend mit einem sekundären anti-Ziege/-Schaf-Antikörper (1:160.000, Sigma Aldrich, Saint Louis) gekoppelt. Rekombinantes murines VEGFR-2-Protein (200 ng, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die immunreaktiven Banden wurden mit einem Chemolumineszenz-Kit (SuperSignal West Pico) auf CL Xposure-Film (beides Perbio, Bonn, Deutschland) sichtbar gemacht.

3.5.5 Nachweis der VEGF-Expression *in vivo*

Um die Herkunft des VEGF im Serum der tumortragenden Tiere zu klären, wurden die entnommenen Gewebeproben homogenisiert und die RNA unter Verwendung des NucleoSpin RNA II Kit (Macherey &

Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA-Konzentration bestimmt und 1 µg RNA in der RT-Reaktion eingesetzt, um cDNA zu gewinnen. Die PCR für VEGF wurde mit 5'-CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTA-3' als forward- und 5'-CTCACCGCCTTGGCTTGTCA-3' als reverse-primer durchgeführt. Als Kontrolle wurden Primer für β-Aktin eingesetzt (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die Produkte der PCR wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht.

3.5.6 VEGF-Aktivität in Gewebeproben

Der quantitative Nachweis der VEGF-Aktivität in den entnommenen Gewebeproben wurde mittels ELISA geführt.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden entnommene Gewebeproben über 24 h in 4%iger PBS-gepufferter PFA-Lösung fixiert. Die Entwässerung der Gewebestücke und die anschließende Überführung in Paraplast über eine aufsteigende Alkoholreihe erfolgte mit Hilfe des Tissue-Tek-Systems (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande). Danach wurden die Gewebestücke an einem Gießstand in Paraplast-Blöckchen gegossen. Am Microtom wurden Paraffinschnitte hergestellt und diese 24 h bei 37 °C getrocknet.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung von Paraffinschnitten

Die entparaffinierten Schnitte wurden 5 min in Hämatoxylin-Färbelösung inkubiert und anschließend 10 min unter fließendem Wasser gewässert. Danach wurden die Schnitte 5 min in Eosinlösung (1 g Eosin in H₂O, direkt vor Gebrauch werden einige Tropfen Eissigsig zugefügt) inkubiert. Da Eosin wasserlöslich ist, wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe nur kurz in H₂O, 60%igem und 80%igem Alkohol inkubiert.

3.7 Statistische Analysen

Die Tumorgrößen werden als mittlere Tumorumfänge unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Kontinuierliche Parameter verschiedener Gruppen wurden mittels U-Test nach Mann-Whitney miteinander verglichen. Überlebensanalysen wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode (SPSS für Windows, SPSS GmbH, München, Deutschland) dargestellt und statistisch mittels log-rank Analyse ausgewertet. Die Korrelationen wurden mittels Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur

4.1.1 Nachweis der VEGF-Sekretion durch CT26-Zellen

Da der Versuchsansatz eine Hemmung der Angiogenese durch die funktionelle Antagonisierung von zirkulierendem VEGF zum Ziel hat, wurde zunächst untersucht, ob die benutzte Tumorzelllinie CT26 VEGF exprimiert und sezerniert. Dazu wurde der Zellüberstand kultivierter CT26-Zellen (10^5 /well) quantitativ mittels ELISA auf den VEGF-Gehalt hin untersucht. Es fanden sich Konzentrationen von über 360 pg/ml (s. Abb. 3).

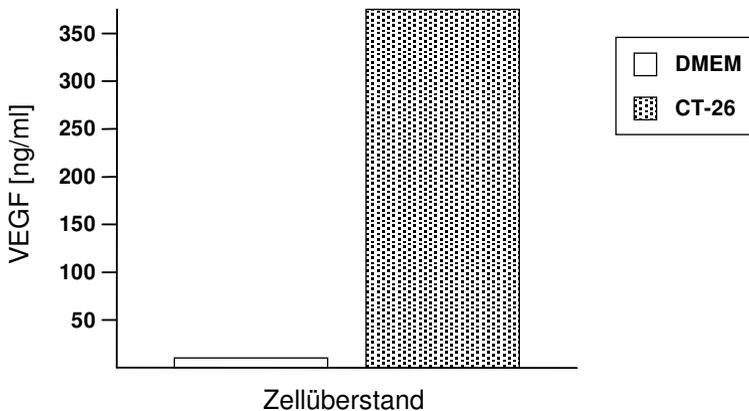


Abb. 3:

Darstellung des VEGF-Gehaltes von Zellüberstand kultivierter CT-26-Zellen.

Der Zellüberstand konditionierter CT26-Zellen wurde mittels ELISA-Technik auf den quantitativen Gehalt an VEGF hin untersucht (CT-26), als Kontrolle wurde Zellkulturmedium verwendet (DMEM). Der Zellüberstand enthält Konzentrationen von über 360 ng VEGF / ml Überstand, im reinen Zellkulturmedium ist kein VEGF nachweisbar.

4.2 Rekombinante adenovirale Vektoren

4.2.1 Virusamplifikation

Zur Amplifikation der für den Transfer des genetischen Materials verwendeten Adenoviren sind mehrere Schritte notwendig. Die Infektion erfolgte in stabil für die E1-Region von Ad5 transformierten HER 911-Zellen, so dass eine Replikation von E1-deletierten Viren *in vitro* stattfinden kann. Der Infektion und Ernte folgten mehrere Konzentrations- und Aufreinigungsschritte.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der amplifizierten Vektoren erfolgte mittels zweier Verfahren. Zum einen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte die Menge der Viruspartikel ermittelt (OD-Messung, opu/ml). Zum anderen erfolgte ein funktioneller Nachweis des Gehalts an infektiösen Partikeln anhand einer Titrationsreihe mit quantitativer Beurteilung des zytopathischen Effekts („Plaque Assay“, pfu/ml). Dabei ergaben unsere Untersuchungen folgende Werte:

Tab. 2:
Übersicht über die erreichten Viruskonzentrationen nach Ultrazentrifugation und Dialyse [opu/ml, pfu/ml]

	AdsFlk-1	AdsFlt-1	AdLacZ
OD (opu/ml)	$8,7 * 10^{12}$	$7,04 * 10^{12}$	$2,0 * 10^{12}$
PA (pfu/ml)	$9,9 * 10^{11}$	$1,027 * 10^{12}$	$8,0 * 10^{11}$

4.2.3 Ausschluss Wildtypkontamination

Eine Kontamination der amplifizierten Viren mit solchen des Wildtyps wurde durch Infektion von A549-Zellen ausgeschlossen. Aufgrund der bei dieser Zelllinie fehlenden E1-Region kommt es bei Infektion mit den verwendeten E1-deletierten Adenoviren nicht zur Replikation und somit auch nicht zum Auftreten eines zytopathischen Effekts. Liegt demgegenüber eine Wildtypkontamination vor, können diese Viren

auch in den nicht für die E1-Region transformierten Zellen replizieren und rufen dadurch lichtmikroskopisch beobachtbare Plaques aus infizierten, abgekugelten Zellen hervor. Eine solche Kontamination konnte für alle verwendeten adenoviralen Vektoren ausgeschlossen werden.

4.2.4 Transgenexpression des Kontrollvektors AdLacZ *in vitro*

Die Transgenexpression des als Kontrollvektor verwendeten AdLacZ wurde mittels Nachweis des Enzyms β -Galaktosidase überpüft. Dieses Protein entstammt dem LacZ-Gen von *E. coli*. Die Expression wurde 48 h nach Infektion von A549-Zellen mit AdLacZ (MOI 250) nachgewiesen. Nicht transfizierte Zellen exprimieren β -Galaktosidase nicht und können das Substrat X-Gal nicht umsetzen, es kommt nicht zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Farbreaktion. Das Verhältnis gefärbter und somit transfizierter Zellen zu nicht gefärbten kann prozentual angegeben werden. Es ergaben sich Transduktionsraten von nahezu 90%.

4.2.5 Nachweis der Transduktion in infizierten Zellen

Um die erfolgreiche Transfektion durch die adenoviralen Vektoren *in vitro* zu überprüfen, wurde das Transgen selbst in infizierten Zellen nachgewiesen. Dazu wurde aus mit AdLacZ und AdsFlk-1 infizierten A549-Zellen die RNA extrahiert und diese in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden diese Fragmente mittels PCR amplifiziert und die Produkte in der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Beide Proben zeigten entsprechende Banden bei 800 bp für das Kontrollgen β -Actin (2a, 2b), die Proben der mit AdsFlk-1 infizierten Zellen zeigten eine erwartete Bande bei ca. 270 bp (1a), diese Bande fehlt bei mit AdLacZ infizierten Zellen (1b) (s. Abb. 4).

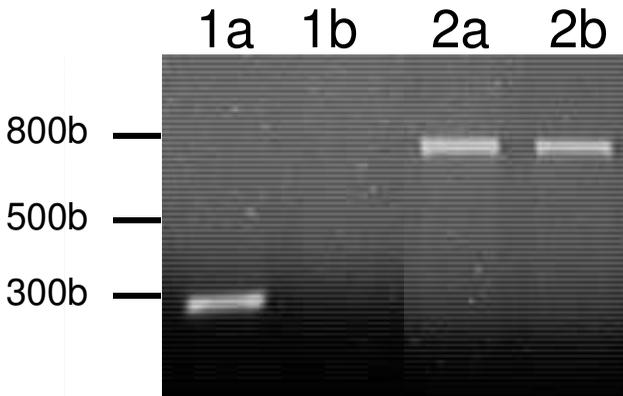


Abb. 4:
Untersuchung der erfolgreichen Transduktion durch Nachweis des Transgens in infizierten A549-Zellen mittels RT-PCR und nachfolgender Gelelektrophorese.
A549-Zellen wurden mit AdLacZ bzw. AdsFlk-1 infiziert (MOI 250). Nach 48 h Inkubation wurde die RNA extrahiert und verdaut. Nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die RNA in der RT-Reaktion eingesetzt und nachfolgend eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Primer für humanes Beta-Actin benutzt. Die Größe der amplifizierten Produkte wurde schließlich mittels Elektrophorese im 1,2%igen Agarosegel ermittelt.
Sowohl die Proben für AdsFlk-1 als auch die für AdLacZ zeigen wie erwartet die Bande bei 800 bp für das als Kontrolle verwendete Gen β -Actin (Spalten 2a bzw. 2b). Die für sFlk-1 erwartete Bande bei ca. 270 bp dagegen ist nur bei den Proben für AdsFlk-1 nachweisbar (Spalte 1a), bei denen für AdLacZ fehlt diese Bande (Spalte 1b).

4.2.6 Transgenexpression *in vitro* und *in vivo*

Um die korrekte Funktion des Transgens, d.h. dessen Expression in transfizierten Zellen zu überprüfen, wurden die entsprechenden Proteine im Zellüberstand nachgewiesen. Diese Untersuchung erfolgte quantitativ mittels ELISA im Überstand infizierter A549-Zellen. Die Konzentrationsbestimmung wurde durch Messen der Farbreaktion im ELISA-Lesegerät bei 450 nm vorgenommen. Dabei ergaben sich hohe Konzentrationen für sFlk-1 (350 ng/ml) bzw. sFlt-1 (106 ng/ml), wohingegen sich nach Infektion mit AdLacZ keine Proteinexpression nachweisen ließ.

Das sFlk-1-Protein ließ sich qualitativ mittels western blot ebenfalls im Serum von mit AdsFlk-1 behandelten Tieren nachweisen, nicht aber in dem von mit AdLacZ behandelten (s. Abb. 5).

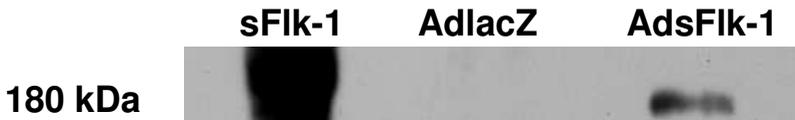


Abb. 5:

Untersuchung der erfolgreichen Transgen-Expressin *in vivo* durch qualitativen Nachweis von sFlk-1 im Serum von intravenös mit AdsFlk-1 behandelten Tieren mittels western blot-Analyse.

Serum von intravenös mit AdLacZ bzw. AdsFlk-1 behandelten Tieren wurde auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Protein wurde auf eine PVDF-Membran übertragen, der Nachweis des sFlk-1-Proteins wurde mittels eines primären anti-Maus-VEGFR-2(Flk-1)-Antikörpers von der Ziege und eines murinen anti-Ziege/Schaf-Sekundär-Antikörpers durchgeführt. 200 ng eines rekombinanten murinen VEGFR-2-Proteins wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Entwicklung mittels Chemolumineszenz-Kit und Belichtung auf CL Xposure-Film.

Nur die Serumproben entsprechend behandelte Tiere zeigen im western blot die erwartete Bande bei 180 kDa Molekulargewicht (sFlk-1), wohingegen diese bei Tieren, welche mit AdLacZ behandelt wurden, fehlt (AdlacZ).

Dies indiziert die korrekte Funktion der adenoviralen Vektoren und die erfolgreiche Proteinexpression.

4.3 Funktionelle Untersuchungen

4.3.1 *in vitro*

4.3.1.1 Tube-formation-Test

Der Überprüfung der korrekten Transduktion durch die adenoviralen Vektoren und der Expression des Transgens folgte im nächsten Schritt der Nachweis der funktionellen Wirksamkeit der exprimierten Proteine. Diese Wirksamkeit der löslichen VEGF-Rezeptoren sFlk-1 und sFlt-1 wurde anhand der Hemmung der Bildung von gefäßähnlichen Strukturen von HUVE-Zellen auf Matrigel evaluiert (‘Tube Formation Assay’). Hierbei werden vollständig in Matrigel ausgebildete ‘tubes’, also gefäßähnliche Strukturen, bei 40facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Als Kontrollvektor wurde AdLacZ eingesetzt. Es ergab sich gegenüber der AdLacZ-Kontrolle eine Hemmwirkung von 53% durch AdsFlk-1 bzw. 42% durch den Einsatz von AdsFlt-1.

4.3.2 *in vivo*

4.3.2.1 Matrigel-Angiogenese-Test

Die anti-angiogene Wirkung wurde anhand des beschriebenen *in vivo*-Angiogenese-Tests auch in den Versuchstieren selbst untersucht. Die subkutan injizierten Matrigel-Depots wurden 9 Tage belassen, anschließend entfernt und in 4%iger PFA-Lösung fixiert. Nach H.E.-Färbung erfolgte die Auszählung der gefäßähnlichen Zellen (gefäßähnliche Strukturen/hpf („high power field“, Gesichtsfeld bei größter Auflösung)) unter dem Durchlichtmikroskop unter Verwendung eines Objektivgitternetzes. Bei mit AdLacZ behandelten Tieren zeigte sich eine intensive Infiltration der Matrigel-Depots mit gefäßähnlichen Zellen. Tiere, die systemisch mit AdsFlk-1 behandelt worden waren, zeigten eine um 80% geringere Infiltration (s. Abb. 6, Abb. 7).

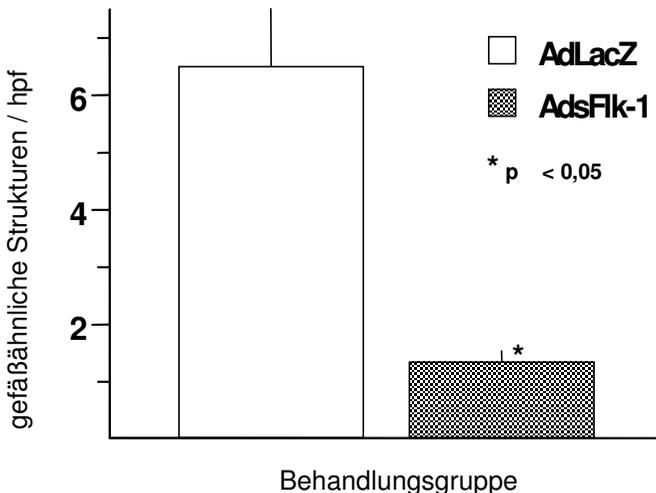


Abb. 6:
Graphische Darstellung der Hemmung des Einwachsens gefäßähnlicher Strukturen in Matrigel durch sFlk-1 *in vivo* (Matrigel-Angiogenese-Test). Es wurden 5×10^9 pfu AdLacZ bzw. AdsFlk-1 in die wärmedilatierte Schwanzvene von C3H-Mäusen gespritzt. Diese wurden 24 Stunden später betäubt, deren ventrales Abdomen rasiert und desinfiziert. Es wurden subkutane Depots von jeweils 500 μ l Matrigel-VEGF₁₆₅ (10 ng/ml VEGF) in die rechtsseitige midabdominale Region der Tiere gesetzt. Nach neun Tagen wurden die Tiere getötet, die entnommenen Matrigel-Depots in 4%igem Formalin fixiert und die angefertigten Dünnschnitte H.-E.-gefärbt. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl gefäßähnlicher Strukturen ermittelt (gefäßähnliche Strukturen/„high power field“ (= Gesichtsfeld bei größter Auflösung)). Die i.v.-Gabe von AdsFlk-1 verursachte eine 80%ige Inhibition der Bildung gefäßähnlicher Strukturen in Matrigel (AdsFlk-1) im Vergleich zur Gabe von AdLacZ (AdLacZ). Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

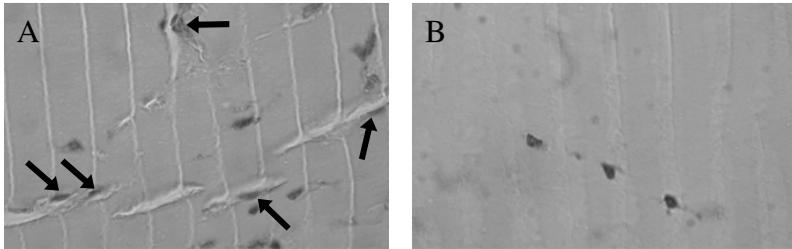


Abb. 7:
Matrigel-Angiogenese-Test. H.E.-gefärbte Dünnschnitte von 4% Formalin-fixierten Matrigeldepots, welche neun Tage nach intravenöser Applikation von 5×10^9 pfu AdLacZ bzw. AdFlk-1 explantiert wurden.
A) H.E.-gefärbter Dünnschnitt eines formalinfixierten Matrigel-Depots eines intravenös mit AdLacZ behandelten Tieres (400fache Vergrößerung). Die Pfeile zeigen Lumina, welche von einzelnen endotheloiden Zellen ausgekleidet sind.
B) H.E.-gefärbter Dünnschnitt eines Matrigel-Depots eines intravenös mit AdFlk-1 behandelten Tieres (400fache Vergrößerung) im Vergleich. Es finden sich in diesem Schnitt keine der in (A) sichtbaren Strukturen.

4.4 Subkutanen murines CRC-Tumormodell

4.4.1 Etablierung eines subkutanen CRC-Tumormodells in der Balb/c-Maus

Die Entwicklung eines subkutanen Tumors durch Injektion von CT26-Zellen wurde in syngeneten Balb/c-Mäusen überprüft. Hierzu wurden 1×10^6 CT26/100 μ l DMEM gemäß dem geschilderten Vorgehen injiziert. Im zweitägigen Abstand wurden die Tiere auf Entwicklung eines Tumors hin untersucht. Ab dem vierten Tag wurden einzelne Tumorknötchen tast- und meßbar, am sechsten Tag *post injectionem* (dem Tag des Beginns der systemischen Behandlung mit adenoviralen Vektoren) zeigten sich bei allen 95 Tieren Tumoren mit einem mittleren Volumen von etwa 75 mm^3 (s. Abb. 8).



Abb. 8:
Balb/c-Maus mit subkutan sitzendem Tumorknoten 6 Tage nach Injektion von 1×10^6 CT26/100 μ l DMEM.
Am Schwanz der Maus ist eine Farbmarkierung zu erkennen, welche zur Unterscheidung der einzelnen Therapiegruppen angebracht wurde.

4.4.2 Systemische Therapie mit adenoviralen Vektoren

Die antitumorale Wirkung der systemischen Applikation von adenoviralen Vektoren AdsFlk-1 und AdsFlt-1 wurde *in vivo* an Balb/c-Mäusen mit subkutan wachsenden CT26-Tumoren untersucht. Am sechsten Tag nach Injektion der Tumorzellen wurde die Behandlung durch i.v.-Gabe von jeweils 5×10^9 pfu/150 μ l NaCl AdLacZ, AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1 initiiert.

4.4.2.1 Tumorgößenentwicklung

Am sechsten Tag nach Induktion des Tumorwachstums wurden die Tiere durch Injektion der adenoviralen Vektoren in drei Behandlungsgruppen aufgeteilt (AdLacZ n=11, AdsFlk-1 n=10, AdsFlt-1 n=10). Die Mäuse wurden alle zwei Tage untersucht und die Tumoren mithilfe einer Schieblehre vermessen. Die Tumorumfänge wurden gemäß einer Formel zur Volumenberechnung sphäroider Körper näherungsweise bestimmt:

$$\text{Volumen} = a \times b^2 \times 0,52$$

a = Längsdurchmesser [mm]

b = Querdurchmesser [mm]

Erreichte der Durchmesser ein arithmetisches Mittel von 15 mm, wurden die Tiere getötet und dieser Zeitpunkt als Sterbedatum festgehalten. Die mittleren Tumorumfänge jeder Behandlungsgruppe wurden nur für einen Zeitraum von einschließlich 13 Tagen nach Behandlungsbeginn dargestellt, da zum darauffolgenden Untersuchungszeitpunkt die ersten Tiere aus der Kontrollgruppe AdLacZ verstarben (s. Abb. 9). Das Wachstum der Tumoren in der Kontrollgruppe war stark progressiv, so dass zum Ende des dargestellten Zeitraums (Tag 13 nach Behandlungsbeginn) die mittleren Tumorumfänge in der AdsFlt-1-Gruppe (647,71 mm³) weniger als die Hälfte, in der AdsFlk-1-Gruppe (368,63 mm³) gar nur knapp ein Viertel derer der AdLacZ-Gruppe (1390,39 mm³) betragen. Hierbei wurde eine relative Wachstumshemmung der Verum-Gruppen von 73% in der AdsFlk-1- und 53% in der AdsFlt-1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Die Größenunterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen waren zu diesem Zeitpunkt (Tag 13 nach Behandlungsbeginn) im Fall der Behandlung mit AdsFlk-1 statistisch signifikant (p=0,0257, AdsFlt-1 p=0,0986). Diese Signifikanz war bereits zu einem früheren Beobachtungszeitpunkt sichtbar.

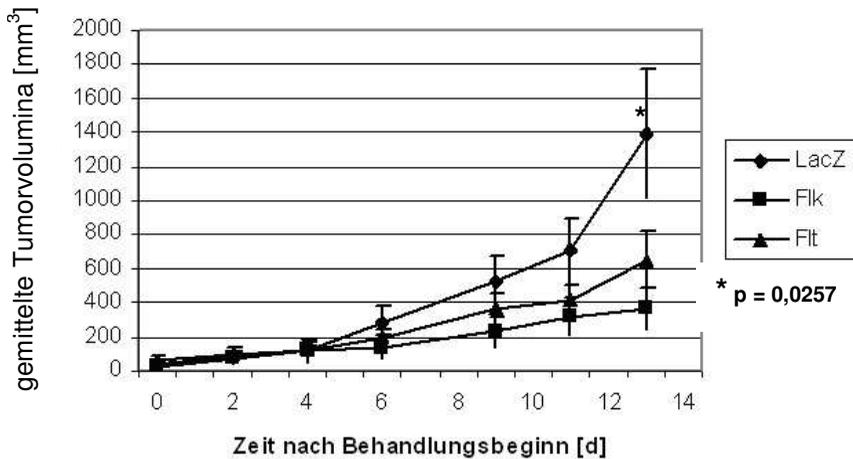


Abb. 9:
 Graphische Darstellung der Größenentwicklung subkutaner Tumoren in Balb/c-Mäusen unter systemischer Therapie mit AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1.
 Am sechsten Tag nach Induktion des Tumorwachstums wurden die Tiere durch i.v.-Injektion von jeweils 5×10^9 pfu/150 μ l NaCl AdLacZ, AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1 der adenoviralen Vektoren in drei Behandlungsgruppen aufgeteilt (AdLacZ n=11, AdsFlk-1 n=10, AdsFlt-1 n=10). Alle zwei Tage wurden die Tumoren vermessen und die Volumina näherungsweise bestimmt. Beim Erreichen eines mittleren Durchmessers von 15 mm wurden die Tiere getötet. Die gemittelten Tumorumfänge aller Tiere einer Gruppe eines jeden Untersuchungstages lassen sich als Graph darstellen.
 An Tag 13 nach Therapiebeginn erreichten die Tumoren in der AdsFlk-1-Gruppe im Mittel ein Volumen von knapp 370 mm^3 , in der Kontrollgruppe (LacZ) wuchsen die Tumoren dagegen bis zu einer mittleren Größe von ca. 1390 mm^3 . Das entspricht einer statistisch signifikanten Wachstumshemmung von 73% bei Behandlung mit AdsFlk-1 (Flk) gegenüber der Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM, p (Tag 13) = 0,0257).

Am 11. Tag nach Beginn der systemischen Behandlung trugen drei der 11 Mäuse der Kontrollgruppe Tumoren mit einem Volumen von über 1000 mm^3 , was bei keinem der Tiere in den AdsFlk-1- bzw. AdsFlt-1-Gruppen der Fall war (s. Abb. 10). Bei insgesamt acht Tieren (73%) lag das Tumorumfang über 500 mm^3 . In der AdsFlk-1-Gruppe lagen die Volumina zwischen 0 und $943,8 \text{ mm}^3$, nur bei 30% der Tiere über 500 mm^3 . In der AdsFlt-1-Gruppe lagen die Volumina zwischen 0,52 und $817,96 \text{ mm}^3$, vier von zehn Tieren trugen Tumoren von über 500 mm^3 .

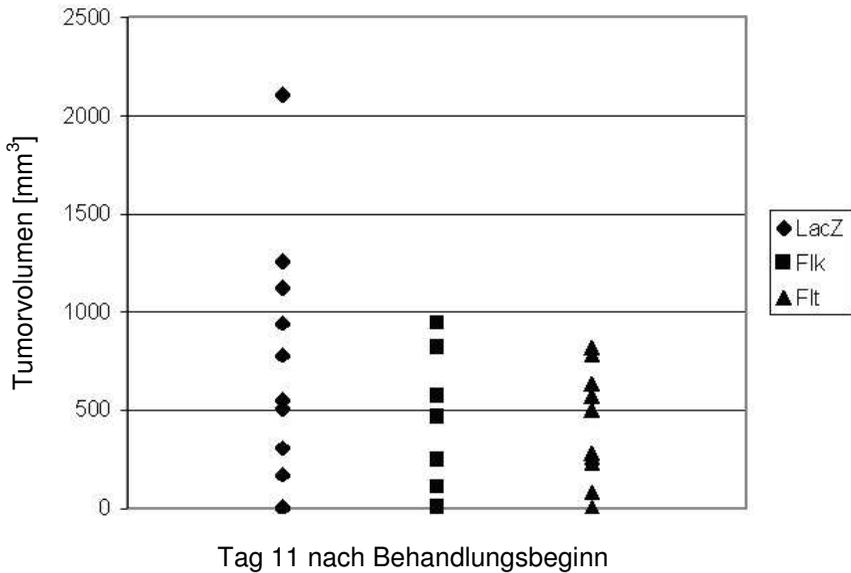


Abb. 10:
 Graphische Darstellung der Größenverteilung subkutaner Tumoren in einzelnen Balb/c-Mäusen an Tag 11 nach systemischem Behandlungsbeginn mit 5×10^9 pfu/150 μ l NaCl AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1; die Kontrollgruppe verwendete AdLacZ (AdLacZ n=11, AdsFlk-1 n=10, AdsFlt-1 n=10). Es wurden die Tumoren aller Tiere der jeweiligen Behandlungsgruppe vermessen, die individuellen Volumina näherungsweise bestimmt und vergleichend graphisch dargestellt.
 Nur in der Kontrolle (LacZ) sind bei drei Tieren Tumorgößen von über 1000 mm^3 zu verzeichnen, insgesamt acht der 11 Tiere tragen Tumoren von über 500 mm^3 .

Bis zum 15. Tag nach Behandlungsbeginn erreichte kein Tumor in der AdsFlk-1-Gruppe eine maximale Größe von 2000 mm^3 , in der AdsFlt-1-Gruppe zeigte lediglich ein Tier (10%) einen Tumor von mehr als 2000 mm^3 . Ein Trend zu großen Tumoren bei Tieren der Kontrollgruppe ließ sich bis zum Ende des Versuchs verfolgen.

4.4.2.2 Analyse der Überlebensrate

Definiert man den Zeitpunkt, zu dem die Tumoren ein als Maximalgröße gefordertes Volumen erreicht haben, als Sterbedatum, lässt sich aus den so gewonnenen Daten die Überlebenswahrscheinlichkeit unter verschiedenen Behandlungsformen ableiten.

Die systemische Behandlung mit AdsFlk-1 und AdsFlt-1 ergab einen tendenziellen Überlebensvorteil gegenüber der Behandlung mit dem

Kontrollvektor (s. Abb. 11). In dieser Gruppe verstarben die ersten Tiere bereits am 9. Tag nach Beginn der Behandlung, dies war in der AdsFlt-1-Gruppe erst am 13. Tag, in der AdsFlk-1-Gruppe gar erst am 21. Tag nach Behandlungsbeginn der Fall. Die mittlere Überlebenszeit der Tiere in der Kontrollgruppe konnte mit 18 Tagen ermittelt werden, in der AdsFlt-1-Gruppe überlebten die Tiere im Schnitt 23 Tage, in der Gruppe, welche mit AdsFlk-1 behandelt wurde, 26 Tage.

Zum Ende des Versuchs am 33. Tag nach Behandlungsbeginn lebten in der Kontrollgruppe nur mehr zwei Tiere, wohingegen in der AdsFlt-1-Gruppe drei, in der AdsFlk-1-Gruppe fünf Tiere überlebten. Der in den Verumgruppen erreichte Überlebensvorteil ist allerdings gemäß Chi-Quadrat-Test nicht signifikant ($p=0,1, 2$ Freiheitsgrade, kritischer Wert=4,61, Testergebnis=4,48).

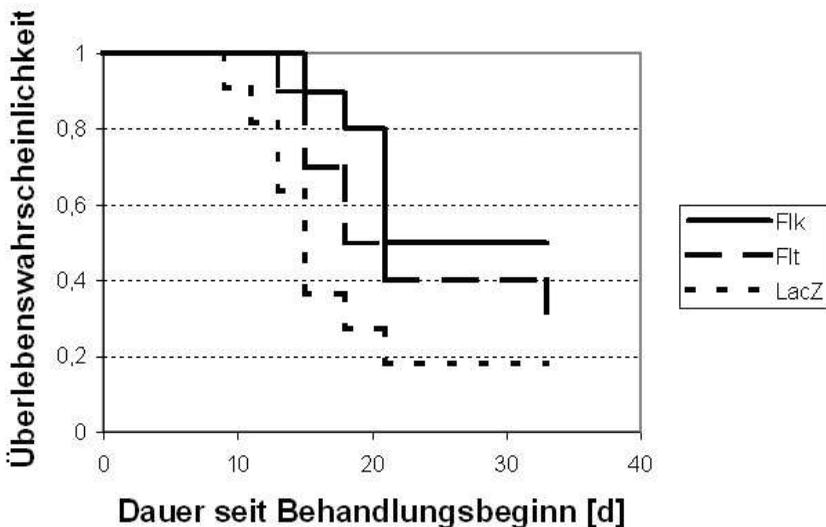


Abb. 11:
 Graphische Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit von subkutanumortragenden Balb/c-Mäusen unter system. Therapie mit AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1 als Kaplan-Mayer-Kurve; die Kontrolle verwendete AdLacZ. Nach Induktion subkutaner Tumoren mit CT26-Zellen wurde die systemische Behandlung durch intravenöse Injektion von jeweils 5×10^9 pfu AdLacZ (n=11), AdsFlt-1 (n=10) bzw. AdsFlk-1 (n=10) eingeleitet. Erreichten die Tumoren einen mittleren Durchmesser von 15 mm, wurden die Tiere getötet, der Zeitpunkt als Sterbedatum vermerkt.
 Es zeigte sich ein tendenzieller, allerdings statistisch nicht signifikanter Überlebensvorteil unter Therapie. Die mittlere Überlebensrate der Tiere in der AdsFlk-1-Gruppe konnte mit 26 Tagen, in der AdsFlt-1-Gruppe mit 23 Tagen ermittelt werden. Demgegenüber überlebten die Tiere der Kontrolle im Mittel 18 Tage.

4.5 Intrahepatisches murines CRC-Tumormodell

4.5.1 Etablierung eines intrahepatischen CRC-Tumormodells in der Balb/c-Maus

Um die Ergebnisse der Studien des subkutanen Tumormodells in wirklichkeitsgetreueren Ansätzen reproduzieren zu können und damit der physiologischen Situation eines kolorektalen, metastasierten Tumors näher zu kommen, entwickelten wir ein intrahepatisches CRC-Tumormodell in der Balb/c-Maus.

Die Induktion eines intrahepatischen Tumors durch Injektion von CT26-Zellen wurde in Balb/c-Mäusen überprüft. Es wurden hierzu 1×10^5 Zellen CT26 in 50 μ l DMEM gemäß dem oben geschilderten Vorgehen subkapsulär in den linken Leberlappen injiziert. Sieben Tage nach Induktion der Tumoren wurden die Tiere explorativ relaparotomiert, um die Tumoren zu vermessen, am 15. Tag wurden die Tiere getötet, die Tumorgrößen bestimmt und Serum- sowie Gewebeproben entnommen.

4.5.2 Systemische Therapie mit adenoviralen Vektoren

Die antitumorale Wirkung der systemischen Applikation des adenoviralen Vektors AdsFlk-1 wurde *in vivo* an Balb/c-Mäusen mit intrahepatisch sich entwickelnden CT26-Tumoren untersucht. Am dritten Tag nach Injektion der Tumorzellen wurde die Behandlung durch i.v.-Gabe von jeweils 5×10^9 pfu/150 μ l AdLacZ als Kontrolle bzw. AdsFlk-1 initiiert.

4.5.2.1 Tumorgrößenentwicklung

Am dritten Tag nach Induktion des Tumorwachstums wurden die Tiere durch Injektion der adenoviralen Vektoren in zwei Behandlungsfraktionen aufgeteilt (AdLacZ n=7, AdsFlk-1 n=7). Die Mäuse wurden am vierten Tag nach Behandlungsbeginn mittels explorativer Laparotomie untersucht und die Tumoren mithilfe einer Schieblehre vermessen. Die Tumorumfänge wurden gemäß einer Formel zur Volumenberechnung sphäroider Körper näherungsweise bestimmt:

$$\text{Volumen} = a \times b^2 \times 0,52$$

a = Längsdurchmesser [mm]

b = Querdurchmesser [mm]

Eine weitere Tumormößenbestimmung erfolgte an Tag 11 nach Beginn der Behandlung. Die Tiere wurden getötet, die Lebern entnommen und die Tumoren vermessen (s. Abb. 12) und Serum- sowie Gewebsproben gewonnen.

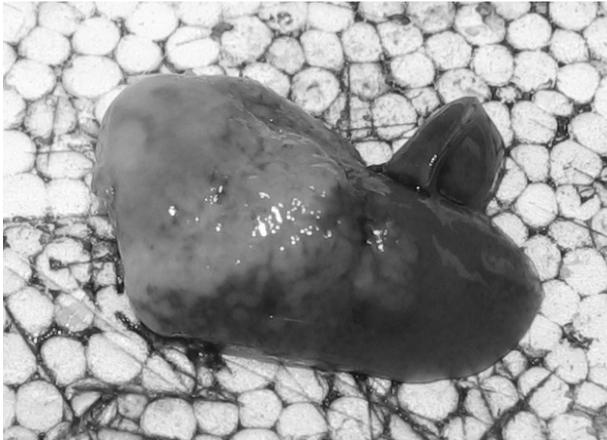


Abb. 12:
Explantierte Leber einer Balb/c-Maus mit großem subkapsulärem Tumorknoten.

Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung zeigten alle Tiere der AdLacZ- bzw. AdsFlk-1-Gruppe meßbare Tumoren in der Leber. Die zweite Größenbestimmung 14 Tage nach Induktion der Tumoren ergab ein progredientes Tumorstwachstum bei allen Mäusen der Kontrollgruppe. Als progredient wurde das Wachstum bezeichnet, wenn sich das Volumen mindestens verdoppelt hatte. In der AdsFlk-Gruppe zeigte sich demgegenüber bei 43% der Tiere ein stabiler Verlauf oder sogar ein Rückgang der Tumormöße (s. Abb. 13).

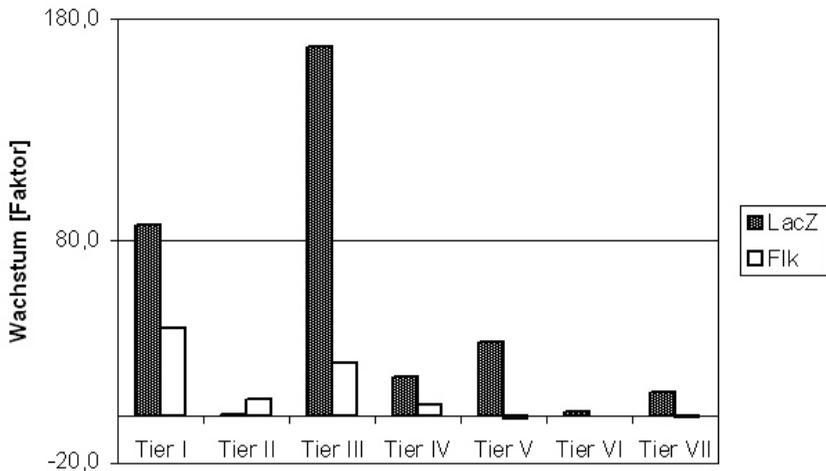


Abb. 13:

Graphische Darstellung der Größenentwicklung subkapsulärer Lebertumoren in Balb/c-Mäusen unter systemischer Therapie mit AdsFlk-1 (Flk) im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit AdLacZ.

Drei Tage nach Induktion intrahepatischer Tumoren durch subkapsuläre Injektion von CT26-Zellen erfolgte die Aufteilung in zwei Behandlungsgruppen durch intravenöse Injektion von 5×10^9 pfu AdLacZ (n=7) bzw. AdsFlk-1 (n=7) in 150 μ l NaCl. Vier Tage später (eine Woche nach Tumorinduktion) wurden die Tiere explorativ relaparotomiert, um die Tumorgößen zu bestimmen, weitere sieben Tage später wurden die Tiere getötet und ebenfalls die Tumorgößen bestimmt.

Dargestellt ist die Größenzunahme zwischen erster (Tag 4 nach Behandlungsbeginn bzw. Tag 7 nach Tumorinduktion) und zweiter Kontrolluntersuchung (Tag 11 nach Behandlungsbeginn bzw. Tag 14 nach Tumorinduktion). Das Tumorstadium innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde als progredient angesehen bei mindestens einer Verdopplung des Volumens zwischen beiden Kontrolluntersuchungen. 43% der Tiere aus der Behandlungsgruppe zeigten entweder ein stabiles Wachstumsverhalten (Tier VI) oder einen Rückgang der Tumorgöße (Tier V, VII), wobei Tier V bei der zweiten Untersuchung keinen Tumor mehr trug. Demgegenüber zeigten alle Tiere der AdLacZ-Gruppe ein als progredient zu bezeichnendes Tumorstadium.

Bei Behandlung mit AdLacZ legten die Tumoren zwischen Tag vier und elf nach Beginn der Therapie im Schnitt um mehr als das 40fache an Volumen zu, bei der Gruppe mit AdsFlk-1 lag die Größenzunahme bei weniger als einem Viertel dessen. Der Vergleich der Volumina an sich ergab, dass die Tiere der Kontrollgruppe im Mittel sehr viel größere Tumoren entwickelten als die der AdsFlk-1-Gruppe (s. Abb. 14). So lag das mittlere Tumorstadium in der AdLacZ-Gruppe an Tag 11 nach Behandlungsbeginn bei 1081 mm^3 , in der Therapiegruppe lediglich bei 452 mm^3 .

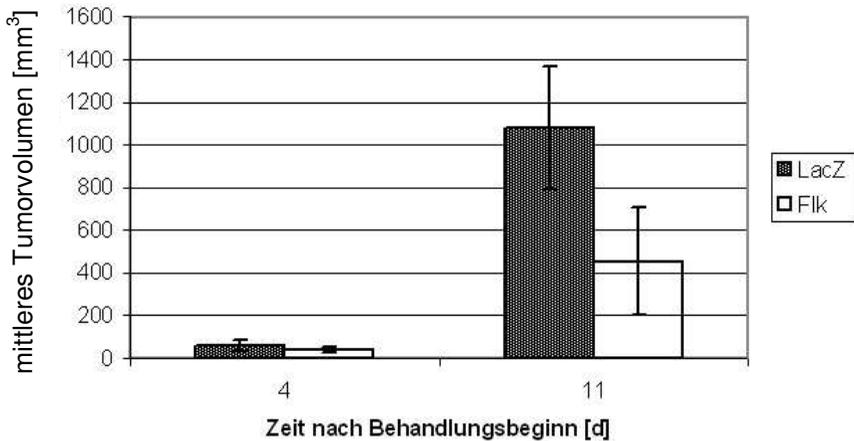


Abb. 14:

Graphische Darstellung der Größenentwicklung subkapsulärer Tumoren in Balb/c-Mäusen unter systemischer Therapie mit AdsFlk-1 (Flk) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit AdLacZ (LacZ) während zweier Untersuchungszeitpunkte vier bzw. 11 Tage nach Therapiebeginn.

Drei Tage nach Induktion intrahepatischer Tumoren durch subkapsuläre Injektion von CT26-Zellen erfolgte die Aufteilung in zwei Behandlungsgruppen durch intravenöse Injektion von 5×10^9 pfu AdLacZ ($n=7$) bzw. AdsFlk-1 ($n=7$) in 150 μ l NaCl. Vier Tage später (eine Woche nach Tumorinduktion) wurden die Tiere explorativ relaparotomiert, um die Tumorgößen zu bestimmen, weitere sieben Tage später wurden die Tiere getötet und ebenfalls die Tumorgößen bestimmt.

Dargestellt sind die mittleren Tumorumvolumina in AdsFlk-1- (Flk) und AdLacZ-Gruppe (LacZ) in mm^3 bei erster (Tag 4 nach Behandlungsbeginn bzw. Tag 7 nach Tumorinduktion) bzw. zweiter Kontrolluntersuchung zum Versuchsende (Tag 11 nach Behandlungsbeginn bzw. Tag 14 nach Tumorinduktion). Zum Versuchsende erreichten die Tumoren der Kontrollgruppe im Mittel ein mehr als doppelt so großes Volumen (1081 mm^3) im Vergleich zur Therapiegruppe (452 mm^3).

Dies spiegelt sich auch in der Verteilung der individuellen Tumorumvolumina der einzelnen Tiere wider (s. Abb. 15). In der Kontrollgruppe trugen lediglich zwei Tiere zum Ende des Versuchs Tumoren unter 500 mm^3 , wohingegen eine Behandlung mit AdsFlk-1 bei sechs der sieben Tiere eine maximale Tumorgöße von 500 mm^3 oder weniger bewirkte. Vier Tiere der Kontrolle zeigten Tumoren von über 1000 mm^3 , was in der AdsFlk-1-Gruppe bei lediglich einem Tier der Fall war. Die erreichten Unterschiede in der Größenzunahme sind allerdings statistisch nicht signifikant.

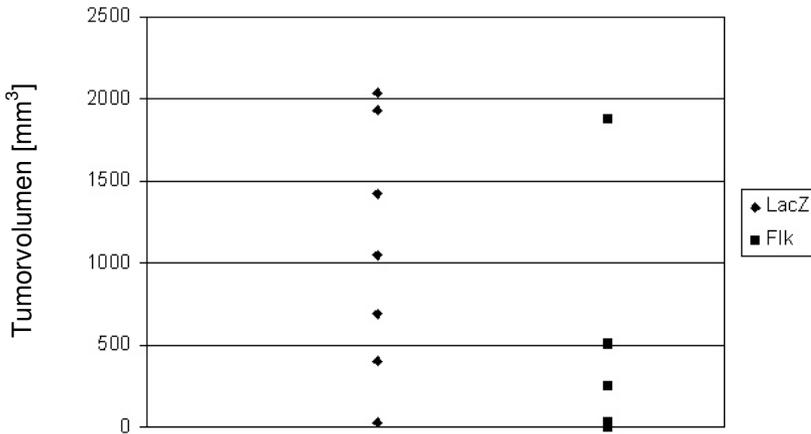


Abb. 15:

Graphische Darstellung der Volumina subkapsulärer Tumoren in Balb/c-Mäusen unter systemischer Therapie mit AdsFlk-1 (Flk) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit AdLacZ (LacZ) 11 Tage nach systemischer Gabe von 5×10^9 pfu AdLacZ (n=7) bzw. AdsFlk-1 (n=7) in 150 μ l NaCl.

Drei Tage nach Induktion intrahepatischer Tumoren durch subkapsuläre Injektion von CT26-Zellen erfolgte die Aufteilung in zwei Behandlungsgruppen. 11 Tage später wurden die Tiere getötet und die Tumorgrößen bestimmt.

Dargestellt sind die individuellen Tumorumfänge in AdsFlk-1- (Flk) und AdLacZ-Gruppe (LacZ) in mm^3 bei der zweiten Kontrolluntersuchung (Tag 11 nach Behandlungsbeginn bzw. Tag 14 nach Tumorinduktion) zum Ende des Versuchs. Nur bei zwei Tieren der Kontrolle verblieb das maximale Tumorumfang unterhalb von 500 mm^3 , vier Tiere erreichten Volumina von mehr als 1000 mm^3 . Demgegenüber verblieb in der Therapiegruppe das Tumorumfang bei 86% der Versuchstiere bei maximal 500 mm^3 .

4.6 Laborchemische Analyse

4.6.1 Lebertoxizität

Die ALT als leberspezifisches Enzym dient in ihrer Aktivität als Marker einer hepatozytären Schädigung. Im subkutanen Versuchsansatz wurden die Tiere 42 Tage lang beobachtet, zu definierten Zeitpunkten (d 3, 6, 9, 14, 19, 25, 32, 42) wurden Tiere den Gruppen entnommen und das Serum im biochemischen Routinelabor auf den ALT-Gehalt hin untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg sowohl unter intravenöser Gabe von AdsFlk-1 (n=25) als auch AdsFlt-1 (n=23) im Vergleich zum Kontrollvektor AdLacZ (n=13) (s. Abb. 16). Dabei lag das Maximum der Transaminasenaktivität zwischen Tag sechs und neun nach Beginn der

systemischen Behandlung. So wurde in der AdsFlk-1-Gruppe der höchste gemessene Wert am neunten Tag mit 490 U/l, in der AdsFlt-1-Gruppe am sechsten Tag mit 523 U/l dokumentiert. In der Kontrollgruppe lag das Maximum ebenfalls am sechsten Tag bei 390 U/l. Der Serumspegel der ALT nahm im weiteren Verlauf des Versuchs ab, so dass er sich in den Therapiegruppen zwischen Tag 32 und 42 auf dem Niveau der AdLacZ-Gruppe einstellte.

Bei Beobachtung von Fress- und Sozialverhalten, Fellpflege etc. zeigten sich die Tiere unauffällig, ebenso trat kein beobachtbarer Ikterus auf.

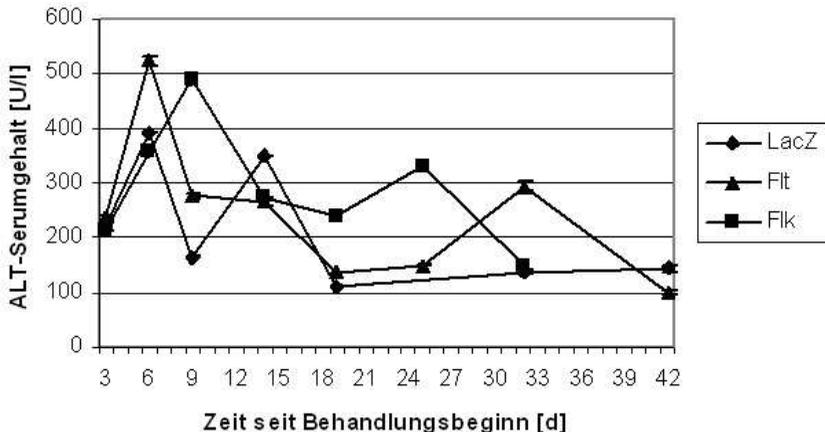


Abb. 16:
 Graphische Darstellung der Entwicklung des Serumsiegels der Alanin-Aminotransferase (ALT) als Indiz für eine mögliche Leberschädigung bei systemischer Behandlung subkutanumortragender Balb/c-Mäuse mit 5×10^9 pfu/150 μ l NaCl AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1; als Kontrollvektor wurde AdLacZ benutzt. Die Tiere wurden 42 Tage lang beobachtet, zu definierten Zeitpunkten (d 3, 6, 9, 14, 19, 25, 32, 42) wurden Tiere den Gruppen entnommen und das Serum auf den ALT-Gehalt untersucht. Sowohl unter intravenöser Gabe von AdsFlk-1 (Flk; n=25) als auch AdsFlt-1 (Flt; n=23) im Vergleich zum Kontrollvektor AdLacZ (LacZ; n=13) zeigte sich ein Anstieg der ALT-Aktivität. Dabei lag das Maximum der Transaminasenaktivität zwischen Tag sechs und neun nach Beginn der systemischen Behandlung; im weiteren Verlauf des Versuchs begann sich die ALT-Aktivität wieder zu normalisieren.

4.6.2 Aktivität des VEGF im Serum

Da der antiangiogene Versuchsansatz, welcher im *in vivo*-Versuch das Wachstum solider Tumoren zu unterdrücken vermag, auf der funktionellen Hemmung des VEGF basiert, wurde parallel zu den Bestimmun-

gen von Tumorgößen und Überlebensdaten das Verhalten des VEGF unter Gabe rekombinanter, angiostatisch wirksamer Adenoviren untersucht. Zunächst wurde nicht-tumortragenden Tiere jeweils 5×10^9 pfu AdLacZ (n=4) bzw. AdsFlk-1 (n=4) intravenös injiziert. Nach Ablauf von drei Tagen wurden die Tiere getötet und Serum zur laborchemischen Analyse entnommen. Die Quantifizierung erfolgte in 20 μ l Serum mittels ELISA (Untersuchung gemäß Protokoll Quantikine Mouse VEGF, R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) (n=3). Es zeigte sich, dass allein die Behandlung mit AdsFlk-1 bei allen Tieren zu einem Anstieg der VEGF-Aktivität im Serum im Vergleich zur Kontrolle führte. Die Applikation von AdLacZ hatte keinen Anstieg des VEGF zur Folge. Der mittlere Spiegel des VEGF lag in der Kontrollgruppe bei 16,99 pg/ml Serum (bzw. 9,99 fg/ μ g Serumeiweiß), in der mit Ads-Flk-1 behandelten Gruppe bei 426,92 pg/ml (251,13 fg/ μ g) (s. Abb. 17).



Abb. 17:

Graphische Darstellung des VEGF-Serumgehaltes nicht-tumortragender Balb/c-Mäuse unter Behandlung mit AdsFlk-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (AdLacZ).

Gesunden Tieren wurden jeweils 5×10^9 pfu AdLacZ (n=4) bzw. AdsFlk-1 (n=4) intravenös injiziert. Nach drei Tagen wurden die Tiere getötet und Serum gewonnen. Es wurden Serumproben von 20 µl mittels ELISA auf den quantitativen VEGF-Gehalt untersucht (n=3).

Die intravenöse Injektion von 5×10^9 pfu AdsFlk-1 bewirkte bis Tag 3 *post injectionem* einen Anstieg des VEGF-Spiegels im Serum um das mehr als 25fache (AdsFlk-1; 251,13 fg/µg Serumprotein) verglichen mit der Kontrolle (AdlacZ; 9,99 fg/µg Serumprotein). Mittelwerte \pm SEM.

Um die Aktivität des VEGF im Serum unter Therapie von Tumoren im zeitlichen Verlauf messen und mögliche Rückkopplungsmechanismen entsprechend darstellen zu können, wurden subkutan bei Balb/c-Mäusen gemäß dem geschilderten Vorgehen CT26-Zellen injiziert und Tumoren induziert. Am sechsten Tag nach Injektion der Tumorzellen wurden die Tiere durch intravenöse Gabe von jeweils 5×10^9 pfu AdLacZ (n=16) bzw. AdsFlk-1 (n=21) in zwei Behandlungsfraktionen aufgeteilt. Im Folgenden wurde zu definierten Zeitpunkten (d=3, d=6, d=9, d=14, d=19 nach Behandlungsbeginn) willkürlich eine bestimmte Anzahl Tiere (anfangs je drei Mäuse aus der AdsFlk-1-Gruppe und zwei aus der AdLacZ-Gruppe, später hier nur noch ein Tier pro Untersuchungstermin) dem Versuch entnommen, getötet und Serumproben gewonnen. Es zeigte sich, dass vom ersten Untersuchungszeitpunkt

an die Serumaktivität des VEGF in der mit AdsFlk-1 behandelten Gruppe im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontrollvektor gesteigert war (s. Abb. 18). So lag an Tag 3 nach Vektorapplikation der mittlere VEGF-Serumgehalt in der AdsFlk-1-Gruppe bei 391 pg/ml Serum (bzw. 230 fg/ μ g Serumeiweiß), in der Kontrollgruppe betrug dieser Wert dagegen 70 pg/ml (41 fg/ μ g), die Behandlung mit AdsFlk-1 führte also zu einem mehr als 5fachen Anstieg des VEGF im Serum der Tiere. Tiere der Therapiegruppe erreichten den höchsten gemittelten Wert an Tag neun, die der AdLacZ-Gruppe an Tag 19 (nicht dargestellt). Es wird sichtbar, dass sich die Werte sowohl in der Kontroll- als auch in der AdsFlk-1-Gruppe im Verlauf des dargestellten Zeitraums nicht wesentlich verändern. Zwei Wochen nach Injektion der adenoviralen Vektoren war der Serumgehalt an VEGF in der Therapiegruppe (343 pg/ml Serum bzw. 202 fg/ μ g Serumeiweiß) immer noch um das mehr als 4fache erhöht gegenüber dem in der Kontrolle (84 pg/ml bzw. 50 fg/ μ g).

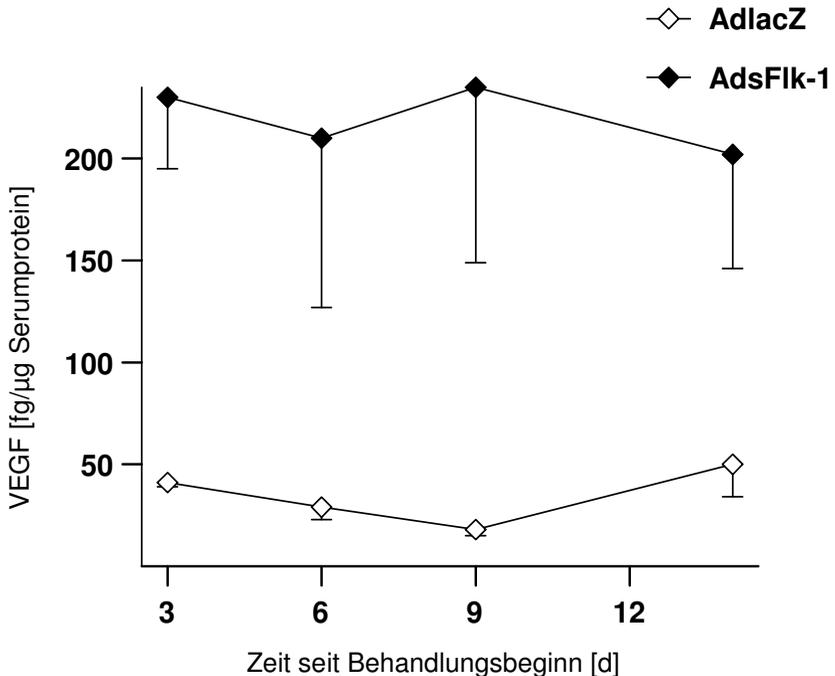


Abb. 18:

Graphische Darstellung des VEGF-Serumgehaltes tumortragender Balb/c-Mäuse unter Behandlung mit AdsFlk-1 (AdsFlk-1) im Vergleich zur Kontrollgruppe (AdlacZ) im zeitlichen Verlauf.

Subkutan wurden bei Balb/c-Mäusen CT26-Zellen injiziert und Tumoren induziert. Am sechsten Tag wurden die Tiere durch intravenöse Gabe von jeweils 5×10^9 pfu AdLacZ (n=16) bzw. AdsFlk-1 (n=21) in zwei Behandlungsfractionen aufgeteilt. Im Folgenden wurden zu definierten Zeitpunkten (d 3, 6, 9, 14, 19 nach Behandlungsbeginn) Tiere dem Versuch entnommen, getötet und gewonnene Serumproben mittels ELISA auf den quantitativen VEGF-Gehalt untersucht.

Die Serumaktivität des VEGF in der mit AdsFlk-1 behandelten Gruppe war im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. An Tag 3 nach Vektorapplikation findet sich ein mittlerer VEGF-Serumgehalt in der AdsFlk-1-Gruppe von 230 fg/µg Serumweiß, in der Kontrollgruppe betrug dieser Wert dagegen 41 fg/µg. Im Verlauf des dargestellten Zeitraums ändern sich die Werte sowohl in der Kontroll- als auch in der AdsFlk-1-Gruppe nicht wesentlich, zwei Wochen nach Injektion der adenoviralen Vektoren war der Serumgehalt an VEGF in der Therapiegruppe (202 fg/µg Serumweiß) immer noch gegenüber dem in der Kontrolle erhöht (50 fg/µg).

4.6.3 Transgenexpression im Serum

Der Nachweis der Transgenexpression und somit der erfolgreichen Transfektion im laufenden Versuch erfolgte exemplarisch als qualitativer Nachweis von sFlk-1-Protein im Serum von mit AdsFlk-1 intravenös behandelten Tieren mittels western blot-Untersuchung. sFlk-1 ließ sich im Serum behandelter Tiere über die Dauer von 56 Tagen nach-

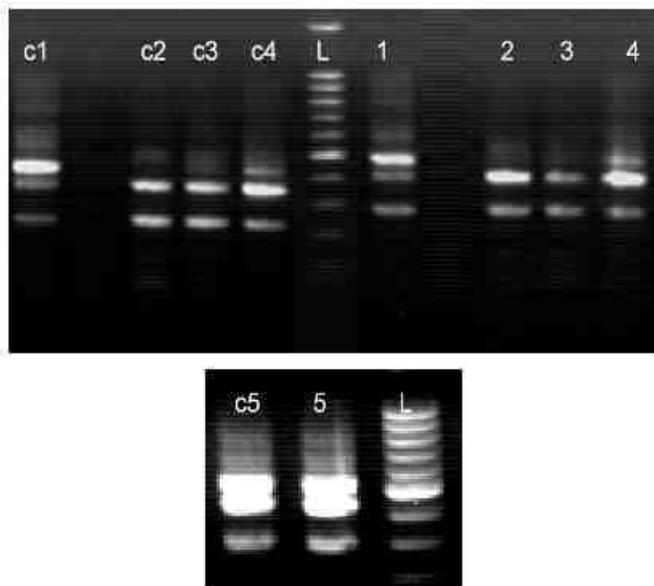


Abb. 20:
 Untersuchung der organspezifischen VEGF-Expression mittels western blot in tumorfreien, mit AdFlk-1 (1-5) bzw. AdLacZ (c1-c5) behandelten Tieren. Tumorfreie Tiere wurden mit jeweils 5×10^9 pfu/150 μ l NaCl AdFlk-1 (n=4) bzw. AdLacZ (n=4) intravenös behandelt. Nach drei Tagen wurden Proben von Lunge, Darm, Milz, Niere und Leber entnommen. Diese wurden homogenisiert, extrahierte mRNA mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben und die Fragmente in der PCR amplifiziert und schließlich mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. mRNA für VEGF konnte sowohl in Leber-, Nieren-, Lungen-, Milz- und Darmgewebe gefunden werden, und zwar sowohl bei Tieren der Therapiegruppe als auch bei solchen der Kontrolle. 1 = Lunge, 2 = Darm, 3 = Milz, 4 = Niere, 5 = Leber. 1 – 5 = AdFlk-1-Gruppe, c1 – c5 = AdLacZ-Kontrolle. L = Basenpaarleiter.

4.6.5 VEGF-Aktivität in entnommenen Gewebeproben

Wie bereits ausgeführt, besitzen die als Vektoren verwendeten Adenoviren einen natürlichen Hepatotropismus, was sie möglicherweise für den gentherapeutischen Ansatz eines intrahepatisch wachsenden Tumors (bzw. einer Metastase) interessant macht. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Ort der VEGF-Expression im gesunden Organismus die Leber ist. Zur weiteren Differenzierung, wie die leberspezifische VEGF-Expression durch die Applikation der adenoviralen Vektoren beeinflusst wird und um somit eine bessere Aussage über den dem Modell theoretisch zugrundelie-

genden Wirkmechanismus machen zu können, untersuchten wir Lebergewebe von Tieren, welche im subkutanen Tumormodell zu bestimmten, zuvor definierten Zeitpunkten den AdsFlk-1- bzw. AdLacZ-Gruppen entnommen und getötet worden waren, quantitativ auf dessen VEGF-Gehalt. Die Untersuchung erfolgte an homogenisierten Gewebeproben mittels ELISA.

Am sechsten Tag nach Initiierung der Therapie durch Injektion der adenoviralen Vektoren (5×10^9 pfu/150 μ l NaCl) zeigte Lebergewebe von Tieren der AdsFlk-1-Gruppe einen 16,5fach höheren VEGF-Gehalt (5218 fg/ μ g Gewebseiweiß) im Vergleich zu dem von Kontrolltieren (315 fg/ μ g) (s. Abb. 21). Am 19. Tag nach der Injektion lag die intrahepatische VEGF-Konzentration bei 3311 fg/ μ g Gewebseiweiß. In Zusammenschau mit den Untersuchungen des Serum-VEGF-Spiegels scheint die Leber ein möglicher Ursprungsort für die Erhöhung des Serum-VEGF unter Therapie zu sein.

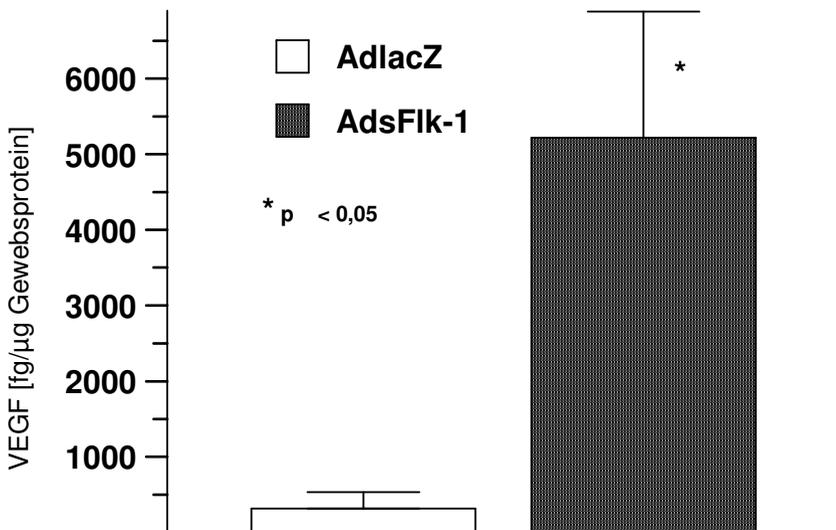


Abb. 21:

Darstellung des leberspezifischen VEGF-Gehaltes an Tag 6 nach Applikation von AdsFlk-1 bzw. AdLacZ im subkutanen Tumormodell der Balb/c-Maus.

Subkutanumortragenden Mäusen wurde AdsFlk-1 bzw. AdLacZ (5×10^9 pfu/150 μ l NaCl) intravenös injiziert. Sechs Tage später wurden die Tiere (n=3) getötet und Lebergewebsproben gewonnen, diese homogenisiert und quantitativ mittels ELISA auf den VEGF-Gehalt untersucht.

Lebergewebe der AdsFlk-1-Gruppe (AdsFlk-1) zeigte einen 16,5fach höheren VEGF-Gehalt (5218 fg/ μ g Gewebseiweiß) im Vergleich zu dem der Kontrolle (AdlacZ; 315 fg/ μ g). Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

5 Diskussion

Das kolorektale Karzinom zählt in der westlichen Welt zu den häufigsten Tumorentitäten. Eine große Anzahl der Patienten entwickelt im Laufe der Erkrankung metastatische Absiedelungen in der Leber. Ein derartiger Krankheitsverlauf ist mit einer ausgeprägten Verschlechterung der Prognose assoziiert [He et al., 2006]. Für die Therapie solcher Metastasen stehen in diesem definitionsgemäß fortgeschrittenen Stadium meist nur palliative Möglichkeiten zur Verfügung, lediglich ein geringer Anteil von 10 bis 15% der Patienten mit singulären Leberherden ist einer kurativen chirurgischen Therapie zugänglich [Ruers und Bleichrodt, 2002]. Systemische Chemotherapien sind oftmals mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden, die Wirksamkeit lokaler invasiver Methoden wie Kryo- oder Radiofrequenzverfahren ist zumindest umstritten [Tol und Punt, 2006] und ihre Anwendbarkeit bei multipler Metastasierung per se eingeschränkt. Aus diesen Gründen gewinnt die Erforschung alternativer onkologischer Therapiestrategien wie z.B. gentherapeutischer Ansätze zunehmend an Bedeutung.

Bereits kurz nach der Entdeckung angiogenetisch wirksamer Substanzen in Tumorgewebe durch Judah Folkman im Jahre 1970 wurde die Vermutung geäußert, eine Hemmung der Tumorneovaskularisation könnte eine Regredienz des Wachstums der Geschwulst zur Folge haben. Seitdem konnten zahlreiche Studien belegen, dass die Induktion einer eigenen Gefäßversorgung für Wachstum und Metastasierung solider Tumoren von großer Bedeutung ist. Der Gewebedurchmesser eines Tumors kann in der Regel eine Größe von 2 mm bzw. ein Volumen von 1-2 mm³ nicht überschreiten, wenn die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie deren gewebshormonelle Stimulation über neugebildete Gefäße unterbleibt [Hanahan und Folkman, 1996; Carmeliet und Jain, 2000; Folkman, 2002; Kerbel und Folkman, 2002]. Die Angiogenese unterliegt im gesunden adulten Organismus einer strengen Modulation und wird normalerweise durch ein Gleichgewicht zwischen angiogenen und angiostatischen Faktoren reguliert. Überschreitet allerdings ein Tumor die o.g. Grenzen, kommt es durch den sog. ‚angiogenic switch‘ zu einer Verlagerung dieses Gleichgewichts und damit zu einer Einsprossung neugebildeter Gefäße in das

Tumorgewebe. Diese kann nach neuerem Kenntnisstand auch durch Vaskulogenese durch endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unterstützt werden [Li et al., 2006].

Gentherapeutische Behandlungen unter Zuhilfenahme adenoviraler Vektoren stellen eine Möglichkeit dar, die Gefäßneubildung im Tumor bzw. seinen Metastasen zu unterbinden. Es können bestimmte Gene in die Zelle eingebracht werden, dort erfolgt die Expression von in diesem Fall angiostatisch wirksamen Proteinen, was zu einer hohen lokalen Wirkstoffkonzentration, vergleichbar der intratumoralen Applikation, führt. Systemische Nebenwirkungen können somit in ihrer Ausprägung zumindest vermindert werden.

Die Tatsache, dass Adenoviren nicht in das Genom integrieren und die Fähigkeit, auch nicht-proliferierende Zellen zu infizieren, gewährleisten die geforderte lokale Regulierbarkeit bei ausreichender Sicherheit [Kay et al., 2001; Roy-Chowdhury und Horwitz, 2002]. Adenoviren besitzen einen natürlichen Hepatotropismus.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirksamkeit einer systemischen Behandlung zweier mittels adenoviralen Gentransfers vermittelter angiostatischer Konstrukte im murinen subkutanen und intrahepatischen Modell. Rekombinante therapeutische Adenoviren wurden von uns amplifiziert und aufgereinigt. In Voruntersuchungen konnten wir sowohl die einwandfreie Funktion der Vektoren in Bezug auf Infektion und Transduktion sowie die Expression der Transgene belegen, auch konnten wir die angiostatische Wirksamkeit der Genprodukte *in vitro* und *in vivo* zeigen. Wir etablierten subkutane und intrahepatische Tumorzellverbände im murinen Tiermodell und konnten hemmende Auswirkungen einer angiostatischen Gentherapie mit den verwendeten adenoviralen Vektoren in Bezug auf Größenentwicklung der Tumoren und einen positiven Einfluss auf die Sterblichkeit aufzeigen. Anhand von Blut- und Gewebsuntersuchungen ließen sich die Verträglichkeit und humorale Reaktionen untersuchen.

5.1 Rekombinante Adenoviren

Die für diese Arbeit verwendeten Vektorkonstrukte sind sog. Erstgene-

rationsadenoviren mit Deletion der Regionen E1 und E3 (Ad5(E1-)(E3-)). Die Deletion der E1-Region führt einerseits dazu, dass die Viren nur noch in bestimmten Verpackungszelllinien replizieren können, da die Transkription bestimmter, für die Replikation notwendiger Gene unterbleibt. Andererseits wird Platz geschaffen für die Aufnahme des LacZ-Gens von *Escherichia coli* bzw. für die cDNA der extrazellulären Domäne der VEGF-Rezeptoren Flk-1 und Flt-1. Alle eingesetzten Transgene unterliegen der Kontrolle des „early immediate“-Promotors des Cytomegalievirus.

Für den viralen Gentransfer kommen solche rekombinanten Adenoviren bereits vielfach zur Anwendung [Imperiale und Kochanek, 2004]. Sie lassen sich in ausreichend hohen Titerstufen für den Einsatz in Tier- und Zellkulturversuchen herstellen. Dazu amplifizierten wir die Viren, die in normalen Zelllinien nicht replizieren können, in stabil für die E1-Region transformierten HER 911-Zellen. Diese Verpackungszellen bieten die E1-Region *in trans* an und wurden bereits für die Verwendung als Helferzelllinie charakterisiert [Fallaux et al., 1996]. Nach dem Propagieren der Adenoviren folgte eine weitere Aufreinigung.

Die Bestimmung des Virustiters muss erfolgen, um in späteren Versuchen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei kann zum einen die Anzahl der erzeugten Viruspartikel an sich durch Bestimmung der optischen Dichte in Medium gemessen werden (OD-Messung, ‚optical particle units‘, opu). Zum anderen liefert die Bestimmung der ‚plaque forming units‘ (pfu) im sog. ‚Plaque-Assay‘ die Anzahl der biologisch aktiven, also tatsächlich infektiösen Partikel. Passend zu bereits publizierten Daten wurden von uns Partikel-titer von mind. 10^{12} opu/ml bzw. Infektionstiter von mehr als 10^{11} pfu/ml erreicht [Kuo et al., 2001; Mittereder et al., 1996].

Zelluläre Systeme ohne die E1-Region bieten den replikationsdefizienten Adenoviren keine Möglichkeit zur Amplifikation. Daher bieten diese rekombinanten Viren ein recht hohes Maß an Sicherheit für die Umwelt. Eine etwaige Replikation in der Karzinomzelllinie A549 würde eine Wildtypkontamination der Adenoviren bedeuten, da diese Zellen die E1-Region nicht anbieten. Eine solche Kontamination wurde von

uns im Plaque-Assay mit A549-Zellen ausgeschlossen.

Die Transduktionseffizienz, d.h. die Anzahl Zellen, die tatsächlich mit viralem Vektor infiziert wurden und das Transgen exprimieren, lässt sich anhand der Darstellung der enzymatischen Umsetzung von X-Gal durch die β -Galaktosidase, das Genprodukt des in den Versuchen als Kontrollvektor verwendeten AdLacZ quantifizieren. 48 h nach Infektion von A549-Zellen mit MOI 250 betrug die Transduktionsrate nahezu 90%. Ähnliche Daten beschreibt auch die Literatur [Qian et al., 1995]. Der Nachweis der entsprechenden Proteine im Zellüberstand von mit AdsFlk-1 infizierten A549-Zellen mittels ELISA und im Serum systemisch behandelte Tiere mittels western blot belegte die erfolgreiche Transgenexpression.

5.2 Angiostatische Konstrukte

Eine angiostatische Behandlung von (metastasierten) soliden Tumoren könnte (u.U. in Verbindung mit weiteren adjuvanten Therapieansätzen) eine effektive Methode darstellen, die ungünstige Prognose solcher Patienten zu verbessern. Unter zahlreichen antiangiogenen Ansätzen finden sich auch solche, die die Angiogenese stimulierende VEGF, einen der bedeutendsten proangiogenen Faktoren in der Tumorangio-genese [Ferrara et al., 1992], funktionell inaktivieren. Studien konnten eine Erhöhung der VEGF-Spiegel beim metastasierten kolorektalen Karzinom aufzeigen [Hanrahan et al., 2003]. Zur Inaktivierung können Verwendung finden: 1. neutralisierende monoklonale Antikörper gegen das VEGF (z.B. Bevacizumab) und seine Rezeptoren, 2. Inhibitoren der Tyrosinkinase-Rezeptoren des VEGF, 3. lösliche Formen der VEGF-Rezeptoren, und schließlich 4. Ribozyme, die spezifisch die VEGF-mRNA inaktivieren.

Im vorliegenden Fall wurden lösliche Rezeptoren des VEGF verwendet, welche über Gentransfer in Zellen des Zielorganismus gebildet und freigesetzt wurden. Dies sind die löslichen Formen von VEGFR-1, das sFlt-1, und von VEGFR-2, das sFlk-1. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Sequestrierung von zirkulierendem VEGF und die Bildung von Heterodimeren, ohne die Signalkaskade über die Tyrosin-kinasen zu aktivieren. Die angiostatische Potenz eines solchen Kon-

struktes wurde mittlerweile ausführlich untersucht und belegt. So konnten Kou et al. [2004] zeigen, dass die Transfektion von Tumorzellen (S180 und B16) mit sFlk-1-tragenden Adenoviren das Wachstum der Tumoren zu hemmen vermag. Andere Studien zeigen die inhibitorische Wirkung von löslichem Flt-1 auf die Neovaskularisation in der Retina [Bainbridge et al., 2002] bzw. in follikulären Schilddrüsenkarzinomen [Ye et al., 2004] und im Pankreaskarzinom [Hoshida et al., 2002].

In *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnten wir diese angiostatische Potenz bestätigen. Im sog. „Tube Formation Assay“ vergleicht man die Bildung gefäßartiger Strukturen von kultivierten HUVE-Zellen (HUVEC) im Matrigel in unterschiedlichen Medien, welche die angiostatisch wirksamen Konstrukte enthalten bzw. frei von diesen sind. In unseren Versuchen ergab sich eine Hemmungskapazität von 53% durch AdsFlk-1 bzw. 42% durch den Einsatz von AdsFlt-1 gegenüber der AdLacZ-Kontrolle. Vergleichbare Ergebnisse beschreiben auch andere Autoren. So konnten Ahmad und Ahmed [2004] zeigen, dass Überstand von kultivierten präeklaptischen Plazentazellen, welcher sVEGFR-1 enthält, die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im „tube-formation-assay“ signifikant zu hemmen vermag. Maynard et al. kamen bereits 2003 zu ähnlichen Ergebnissen, als sie HUVE-Zellen mit Serum präeklaptischer Patientinnen inkubierten. In Vorversuchen zur angiostatischen Therapie des Ovarialkarzinoms belegten Mahasreshti et al. [2001] eine wachstumshemmende Potenz auf HUVE-Zellen durch adenoviral vermitteltes sFlt-1 von 60% gegenüber einem Kontrollvektor und von über 70% im Vergleich zu Kulturüberstand nicht infizierter Zellen.

In *in vivo* wurde die angiostatische Potenz mit Matrigeldepots untersucht, welche subkutan bei C3H-Mäusen implantiert wurden. Nach systemischer Behandlung mit AdsFlk-1 bzw. AdLacZ wurden die explantierten Depots auf Einsprossung gefäßartiger Strukturen hin untersucht. Bei Tieren, die intravenös mit AdsFlk-1 behandelt worden waren, konnte eine um 80% geringere Infiltration verzeichnet werden. Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen finden also in diesen Versuchen ihre Bestätigung.

Die solchermaßen vermittelte Unterbrechung der Signalkaskade, die zur Stimulation der Angiogenese führt und somit das weitere Wachsen eines Tumors unterstützt, führt nachweislich zu einer signifikanten Abnahme der tumoralen Gefäßdichte [Vajkoczy et al., 2005]. Vergleichende Studien belegen, dass eine solche direkte Hemmung des VEGF über lösliche Rezeptoren wirkungsvoller ist als z.B. die Verwendung von Angiostatin oder Endostatin. Dies konnte sowohl für murine (Lungen-) als auch humane (Pankreas-) Karzinomzellen im Mausmodell belegt werden [Kuo et al., 2001]. Erfolgreiche lokale Behandlungen von CRC-Tumorzellverbänden werden berichtet [Kong et al., 1998].

5.3 Murines CRC-Versuchsmodell

Ein experimenteller Behandlungsansatz, wie er der vorliegenden Arbeit zugrundeliegt, erfordert für eine aussagekräftige Evaluation ein möglichst realitätsnahes Versuchsmodell [Hayashi et al., 1999; Top et al., 1998]. Zur Induktion sowohl der subkutanen als auch der intrahepatischen Tumoren verwendeten wir CT26-Zellen. Diese murine Kolonkarzinom-Zelllinie wurde bereits von früheren Autoren als gut geeignet beschrieben, nachvollziehbar hepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms im Mausmodell zu produzieren [Kollmar et al., 2004]. Die Fähigkeit der Zellen, VEGF zu exprimieren und zu sezernieren und somit einer entsprechenden angiostatischen Therapie zugänglich zu sein, wurde von uns in Vorversuchen belegt. Bereits veröffentlichte Untersuchungen schließen einen direkten antiproliferativen Einfluss von z.B. sFlt-1 auf CT26-Zellen weitgehend aus [Schmitz et al., 2005].

Oft werden Tumormodelle im subkutanen Ansatz untersucht. Sie sind aufgrund der technisch einfach durchzuführenden Tumoretablierung und der anschließenden Beobachtung relativ leicht zu realisieren, und die erhobenen Daten sind z.B. im Hinblick auf die Tumorausdehnung gut reproduzierbar. Dabei lassen sich sowohl murine als auch humane Zelllinien einsetzen, und auf diese Weise können Tumoren in syngenen oder immundefizienten Tieren gut etabliert werden. Allerdings findet sich bei solchen Modellen eine stärkere Immunantwort als in einem intrahepatischen Versuchsansatz, da der Gehalt an APC-Zellen

und Langerhans-Zellen im Unterhautgewebe ungleich größer ist als z.B. im Zielorgan Leber und auf diese Weise das Immunsystem vielfältig stimuliert wird. Außerdem ist ein Metastasenmodell des kolorektalen Karzinoms im Subkutangewebe artifiziell. Einen solchen Ansatz benutzten wir aufgrund der vergleichsweise einfach zu handhabenden Vermessung der Tumorgrößenentwicklung für eine engmaschige Darstellung des Wachstumsverhaltens der Tumoren, und die Induktion subkutaner Tumoren in Balb/c-Mäusen durch Injektion von CT26-Zellen wurde auch bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Evaluation verschiedenster antitumorale Effekte genutzt [Toda et al., 2001]. Es lässt sich hieran grundsätzlich der dem Versuchsansatz zugrunde liegende Mechanismus funktionell belegen (sog. „proof of principle“).

Um der physiologischen Situation eines hepatischen Tumors bzw. einer Metastase näher zu kommen, haben wir parallel zum subkutanen Versuchsansatz ein weiteres, intrahepatisches Modell in der Leber genutzt und versucht, die Ergebnisse der Studien am Subkutanmodell hieran nachzuvollziehen. Dafür wurde durch Injektion einer definierten Menge von Tumorzellen in das Lebergewebe ein hepatisches Einzel-tumormodell etabliert. Solche Modelle haben naturgemäß assoziierte Schwierigkeiten, welche eine leichte Induktion, Entwicklung und Beobachtung des Tumorwachstums verhindern. Die Induktion der Tumoren und auch die anschließende Verlaufsbeobachtung insbesondere des Wachstumsverhaltens muss regelmäßig mittels invasiver Methoden wie Laparotomie oder Hepatektomie geschehen und bedeutet somit immer eine zusätzliche Belastung für das Versuchstier. Auch dieses Modell ist in der Literatur als bereits von anderen Autoren verwendet vorbeschrieben [Topf et al., 1998] und etabliert. Genau wie wir evaluieren viele Studien die Wirksamkeit einer antitumoralen Gentherapie sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Metastasenmodell (u.a. Tseng et al, 2002).

5.4 Tumorwachstum unter systemischer Gabe von sFlk-1 bzw. sFlt-1

Wie erwähnt, ist eine Möglichkeit, die Neovaskularisation solider Neoplasien bzw. ihrer Metastasen zu hemmen, die Verwendung lösli-

cher Rezeptoren des Angiogenesefaktors VEGF. Die spezifischen antitumoralen Effekte einer systemischen Therapie mit solchen Konstrukten wurden bereits von anderen Autoren nachgewiesen. So konnten Ye et al. zeigen, dass sich durch die Anwendung von sFlt-1 das Wachstum von follikulären Schilddrüsenkarzinomen um bis zu 70% unterdrücken lässt [Ye et al., 2003]. Ein Fusionsprotein aus einer VEGFR-1-Domäne mit einem Immunglobulin („VEGF-Trap“) zeigte in Versuchen hohe antitumorale Potenz [Holash et al., 2002] und befindet sich bereits in der klinischen Erprobung. Durch Inhibierung der VEGF-Wirkung konnte ein Rückgang der Tumormasse und von Aszites im Ovarialkarzinommodell gesehen werden [Byrne et al., 2003]. Ebenso wirkte sich die Gabe der „VEGF-Trap“ auf Tumor- und Metastasenwachstum beim Pankreaskarzinom im Sinne einer Hemmung aus [Fukasawa und Korc, 2004]. Plasmide, welche die Gensequenz der extrazellulären Domäne des VEGFR-2 (sFlk-1) tragen und per Elektroporation in subkutan liegende Mammakarzinomzellen in der Maus transferriert wurden, konnten eine Wachstumshemmung der Tumorzellverbände bewirken [Wang et al., 2002].

Der Evaluation der Kombination der belegten antitumoralen Eigenschaften eines solchen anti-VEGF-Konstruktes mit den Vorteilen der Gentherapie wie der guten Regulierbarkeit und relativ gering ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen diene der dieser Arbeit zugrundeliegende Versuchsansatz. Mehrere Autoren konnten bereits die Wirksamkeit einer angiostatischen Gentherapie in Bezug auf die Tumorausbreitung belegen. Mahasreshti et al. [2001] zeigten, dass die gentherapeutisch vermittelte Anwendung von löslichem Flt-1 einen hemmenden Einfluss auf die Größenentwicklung subkutaner Tumoren im murinen Ovarialkarzinommodell hat und auch das Überleben günstig beeinflussen kann. Weitere Arbeiten belegen den hemmenden Einfluss einer adenoviral vermittelten Therapie mit sFlt-1 auf das Tumorstadium beim Pankreaskarzinom [Hoshida et al., 2002]. Ebenso gelang ein solcher Nachweis für das Prostatakarzinom, wobei sich auch hier günstige Auswirkungen auf die Überlebensrate zeigten [Becker et al., 2002]. Kou et al. [2005] konnten die wachstumshemmende Wirkung eines retroviral vermittelten sFlk-1-Konstruktes im murinen

Tumormodell aufzeigen. Ähnliches gelang für den adenoviral vermittelten Gentransfer im murinen Ovarialkarzinommodell [Wu et al., 2006] und beim Pankreaskarzinom [Tseng et al., 2002].

In Übereinstimmung mit den in der Literatur dargestellten Ergebnissen zeigten unsere Versuche, dass die einmalige systemische Gabe sowohl von AdsFlk-1 als auch von AdsFlt-1 (5×10^9 pfu) in einer signifikanten Hemmung des Wachstums subkutaner Tumoren von 73% bzw. 53% 13 Tage nach Behandlungsbeginn resultierte. Tiere der Kontrollgruppe entwickelten größere Tumoren im Vergleich zu denen der Therapiegruppen. Es fiel auf, dass die antitumoralen Effekte bei Applikation von AdsFlk-1 stärker ausfallen als bei AdsFlt-1.

Die Anwendung von AdsFlk-1 in einem intrahepatischen Metastasenmodell zeigte, dass auch hier die systemische Therapie eine Wachstumshemmung gegenüber einer negativen Kontrolle erbringt. Dies gilt sowohl für die Hemmung der Proliferation als auch für die beobachteten Endgrößen der Tumoren, in einem Fall konnte eine komplette Remission erreicht werden. Dabei ist die hier erreichte Wachstumshemmung allerdings statistisch nicht signifikant.

sFlk-1 konnte nach einmaliger Gabe über einen Zeitraum von 56 Tagen im Serum behandelter Tiere nachgewiesen werden. In Übereinstimmung belegen frühere Arbeiten die Langzeitexpression von angiostatisch wirksamen Proteinen mittels adenoviralem Gentransfer [Chen et al., 2000]. Adenoviren integrieren nicht in das Genom, die Expression bei einmaliger Gabe ist also grundsätzlich nur transient. Die beobachtete Zunahme der Tumorgößen im Verlauf des subkutanen Versuches ist Ausdruck dieser transienten Expression und damit der zeitlich begrenzten Wirksamkeit der Therapie. Offen bleibt, ob eine wiederholte Applikation der adenoviralen Vektoren eine stärkere antitumorale Wirksamkeit hat und ob hier Dosiseffekte zu beobachten sind. Wie bereits erwähnt, wird jedoch im Zielorganismus eine starke Immunantwort provoziert, was die wiederholte Gabe schwierig macht.

5.5 Auswirkungen der systemischen Gabe von sFlk-1 bzw. sFlt-1 auf das Überleben

Verschiedene Studien konnten bislang positive Effekte sowohl von

sFlt-1 als auch von sFlk-1 auf die Überlebensdauer bei verschiedenen Tumormodellen und -entitäten aufzeigen.

Die intraperitoneale Injektion von *in vitro* transduzierten Zellen, welche sFlt-1 exprimieren, konnte die Überlebensrate von Balb/c-Mäusen, die Ovarialkarzinome trugen, signifikant verbessern [Hasumi et al., 2002]. Ähnliches gilt für die intraperitoneale Anwendung sFlt-1-vermittelnder rekombinanter Adenoviren [Mahasreshti et al., 2001].

Raskopf et al. konnten 2005 im Modell des hepatozellulären Karzinoms in der C3H-Maus eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate unter systemischer Therapie mit AdsFlk-1 im subkutanen und eine mittlere Überlebenszeit von 17 Tagen im Vergleich zu 10 Tagen bei Behandlung mit einem Kontrollvektor im orthotopen Versuchsansatz erreichen. Gleiches gelang Tseng et al. [2002] für das hepatisch metastasierte Pankreaskarzinom.

Diesen in der Literatur beschriebenen positiven Einfluss konnten wir in unseren Versuchen teilweise nachvollziehen. Durch eine systemische Therapie mit AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1 (5×10^9 pfu) ergab sich in unserem subkutanen Versuchsansatz allerdings nur ein tendenzieller, nicht signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der Negativkontrolle. Hier verstarben die ersten Tiere früher, die mittlere Überlebenszeit war insgesamt kürzer. Auch hier zeigt sich zurückschauend, dass in der Gruppe mit AdsFlk-1 der Überlebensvorteil am größten ausfällt.

5.6 Toxizität bei systemischer Gabe

Die intravenöse Applikation hepatotroper Adenoviren führt zu einer hepatitischen Reaktion. Als Hinweis auf diesen Hepatotropismus kommt es laborchemisch zu einem Anstieg der Transaminasen im Serum der Tiere. Um den Grad der Leberschädigung evaluieren zu können, bestimmten wir im Serum den Gehalt der Lebertransaminase ALT. Desweiteren diente uns die Beobachtung der Tiere unter besonderer Beachtung subjektiver Krankheitssymptome wie Sozialverhalten, Fellpflege oder Fressverhalten oder auch die mögliche Ausbildung eines Ikterus als Anhalt für eine (leber-)schädigende Nebenwirkung der Therapie. Andere Autoren untersuchten in früheren Studien ähnliche Fragestellungen und zogen hierbei z.B. Kriterien wie Gewebshä-

morrhagien oder histomorphologische Aspekte der Cytotoxizität heran [Mahareshti et al., 2003]. Diese Untersuchungen kamen u.a. zu dem Schluss, dass die intravenöse Applikation von in diesem Fall AdsFlt-1 zu inakzeptabler Leberschädigung führt. Eine solche Leberschädigung scheint dosisabhängig zu sein [Nielsen et al., 1998].

Vergleicht man den Verlauf der Transaminasen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, so zeigt sich bei den applizierten Dosen eine initiale, wohl aber tolerable ALT-Erhöhung im Serum bei den Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrolle. Auch konnten wir bei den Tieren keine subjektiven Krankheitssymptome wie z.B. Appetitlosigkeit, Vernachlässigung der Fellpflege oder auffällige Veränderungen des Sozialverhaltens beobachten und es fand sich keine Entwicklung eines Ikterus als Hinweis auf eine signifikante Leberschädigung. Die Messung des ALT-Gehalts erfolgte bewusst im subkutanen Versuchsansatz, um eine möglicherweise tumorbedingte Erhöhung weitgehend auszuschließen.

Es stellt sich die Frage, inwiefern eine hepatitische Reaktion selbst und die damit einhergehende stimulierte Ausschüttung vasoaktiver und -gener Substanzen das Wachstum der Tumoren beeinflusst. Eine solche Entzündungsreaktion hat sowohl pro- als auch antitumorale Effekte (da immunmodulatorisch wirksam). Dabei ist zu beachten, dass zwar die Inflammation durch die Transgenexpression bei Behandlung mit AdsFlt-1 bzw. AdsFlk-1 größer ist als bei AdLacZ, die VEGF-vermittelte Wirkung hier aber gleichzeitig auch wieder unterbunden wird.

Neben der hepatitischen gibt es noch andere als toxisch anzusehende Reaktionen auf die systemische Applikation adenoviraler Vektoren wie z.B. Blutbildveränderungen (Leukopenien, Thrombozytopenien), welche auch abhängig sind vom Immunstatus des Organismus [Varnavski et al., 2005]. Ausgeprägte systemische inflammatorische Reaktionen kommen vor und haben im klinischen Einsatz bereits zum Tod von Patienten geführt [Raper et al., 2003]. Aufgrund der Tatsache, dass Adenoviren ihr Genom nicht in das der Zielzelle integrieren, sind onkogene Effekte jedoch nicht zu befürchten.

Mehrere Arbeiten zeigen mittlerweile Möglichkeiten, den adenoviralen

Gentransfer sicherer zu machen, so z.B. durch die Deletion weiterer Regionen im adenoviralen Genom [Everett et al, 2003; Gao et al., 1996; Morsy et al., 1998; Jozkowicz und Dulak, 2005], wodurch virale Hüllproteine nicht mehr exprimiert werden, oder durch Verwendung von sog. „helper-dependent“ Adenoviren [Brunetti-Pierri et al., 2006]. Die Konstruktion eines Hybrid-Vektors kombiniert die Vorteile mehrerer Vektorkonstrukte für die Therapie des hepatozellulären Karzinoms [Guan et al., 2006]. Auch hat der Applikationsmodus Einfluss auf die Verträglichkeit [O'Neal et al, 2000]. Wichtig ist das Finden der richtigen Dosis, da sowohl Transgenexpression als auch Toxizität dosisabhängig zu sein scheinen. Der von anderen Autoren histomorphologisch beobachteten starken Lebertoxizität und auch der einhergehenden hepatitischen Umgebungsreaktion ließe sich möglicherweise durch intratumorale Applikation der adenoviralen Vektoren anstelle einer intravenösen Injektion begegnen.

5.7 VEGF unter Therapie

Die systemische Gabe von AdsFlk-1 resultierte im subkutanen Modell trotz des positiven Einflusses auf Tumorwachstum und Überlebensrate in einem starken, gleichbleibend hohen Anstieg der Aktivität des VEGF im Serum der Tiere. Ein solcher erfolgte auch nach Applikation von AdsFlk-1 bei gesunden, tumorfreien Tieren. Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Autoren beobachtet, und es konnte teilweise gezeigt werden, dass steigende VEGF-Spiegel eine Verstärkung und eine zunehmende VEGFR-2-Dichte im Tumor eine Abnahme der antitumoralen Effekte der Therapie bewirken [Dev et al., 2004]. Bocci et al. [2004] beschrieben eine Abhängigkeit des steigenden VEGF-Serumspiegels von der Dosierung einer antiangiogenen Substanz und dessen Bedeutung für die Dosisfindung im Rahmen eines klinischen Einsatzes. VEGF könnte Bedeutung im Sinne eines Tumormarkers zur Überwachung einer Therapie erlangen.

Da trotz steigender VEGF-Level antitumorale Effekte auftreten, scheint die Wachstumshemmung durch lösliche VEGF-Rezeptoren kein kompetitiver Mechanismus zu sein, vielmehr wird, wie bereits dargestellt, die Hemmung über die Bildung von Heterodimeren aus VEGF

und löslichem Rezeptor und durch Sequestrierung von VEGF in der Gefäßbahn vermittelt.

Für die weitere Klärung einer möglichen Interaktion zwischen VEGF-Aktivität im Serum und antitumoraler Wirksamkeit einer antiangiogenen Therapie müsste der Ort einer gesteigerten VEGF-Produktion identifiziert werden. Vergleicht man im subkutanen Modell die gemessenen Tumorgrößen mit den VEGF-Spiegeln im Serum, lässt sich keine Korrelation feststellen. Obwohl CT26-Zellen VEGF exprimieren, scheinen die induzierten Tumoren selbst *in vivo* keine wesentliche Rolle bei der verstärkten VEGF-Expression zu spielen. Es wurden von uns daher Gewebeproben verschiedener Organe von tumorfreien, aber behandelten Tieren mittels western blot auf VEGF-Expression untersucht (Leber, Niere, Lunge, Milz und Darm), welche letztlich in all diesen Organen detektiert werden konnte. Ausgehend von dem bekannten Hepatotropismus der adenoviralen Vektoren wurde speziell das Lebergewebe auf dessen Gehalt an VEGF quantitativ mittels ELISA untersucht. Unter Therapie mit AdsFik-1 konnte eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ähnlich dem Anstieg des VEGF im Serum dieser Tiere gesehen werden. Die Leber scheint also einer der Hauptbildungsorte des VEGF (unter Therapie mit angiostatischen adenoviralen Vektorkonstrukten) zu sein. Diese Annahme bestätigen Untersuchungen anderer Autoren [Maharaj et al., 2006].

Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine Unterdrückung der gesteigerten VEGF-Expression unter Therapie zu einer weiteren Verstärkung der antitumoralen Effekte führen kann. Dies könnte z.B. durch Verwendung sog. siRNA (‘small interfering-RNA’) geschehen, die eine Expression des VEGF schon auf Genom-Ebene unterdrückt (sog. ‘gene silencing’), was mehrere Arbeiten bereits belegen konnten [Sato et al., 2005; McCaffrey et al., 2002]. Andere Autoren berichten von entsprechenden Erfolgen in der Ophthalmologie [Murata et al., 2006; Kim et al., 2004; Reich et al., 2003]. Im Tiermodell konnte gegen VEGF gerichtetes ‘gene silencing’ bereits erfolgreich zur Therapie des Malignen Melanoms eingesetzt werden [Tao et al., 2005] und *in vitro* ließ sich die Proliferation von Kolorektalkarzinomzellen hemmen [Mulkeen et al., 2006].

Möglicherweise kann auch durch die Kombination mit anderen, das VEGF als Substrat benutzenden angiostatischen Ansätzen eine Verstärkung der antitumoralen Effekte erreicht werden, da z.B. erhöhte VEGF-Spiegel bei der Verwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren genau dies zur Folge haben [Dev et al., 2004].

5.8 Ausblick

Die erzielten Effekte im Hinblick auf die Größenentwicklung solider Tumoren sollten Anstoß für weiterführende Untersuchungen sein.

Mehrere Arbeiten konnten bislang die antitumoralen Effekte einer immunmodulatorischen Therapie mit dem Zytokin IL-12 belegen [Gately und Brunda, 1996]. Es lässt sich hierdurch die zytotoxische Wirkung der zellulären Abwehr stimulieren [Gately et al., 1994; Robertson et al., 1992] und andere Zytokine werden aktiviert [Nastala et al., 1994], so dass die Möglichkeiten des Immunsystems, den Tumor anzugreifen, gestärkt werden. Auch diese Therapieansätze wurden bereits im gentherapeutischen Ansatz untersucht [Alves et al., 2004]. Eine Kombination mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Ansatz könnte mögliche synergistische Effekte bei niedriger Toxizität bedeuten. Weitere Versuche sollten unternommen werden, die Verträglichkeit einer adenoviral vermittelten Therapie zu steigern. Auch die Kombination mit bisherigen Strategien der Tumorthherapie wie Chemotherapie [Wang et al., 2006] oder Bestrahlung [Geng et al., 2001] kann vielversprechend sein.

Untersucht werden sollten ferner Modifikationen des Applikationsmodus der Vektoren (wie z.B. die repetetive Injektion, ggf. unter Verwendung adenoassoziiierter Viren) sowie die Möglichkeit, die gefundene reaktive Steigerung der VEGF-Expression im Lebergewebe zu unterbinden.

Die Entwicklung der VEGF-Aktivität schließlich könnte im Sinne eines Tumormarkers zur Therapieüberwachung dienen.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) stellt in der westlichen Welt sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Tumorentität dar. Die Bildung metastatischer Absiedelungen unter anderem in der Leber verschlechtert die Prognose immens. Bei der Suche nach Alternativen zu den begrenzten therapeutischen Optionen des metastasierten CRC bietet eine angiostatische Therapie vielversprechende Möglichkeiten. Allgemein ist heutzutage die wichtige Rolle der Vaskulo- und Angiogenese für Tumorwachstum und -verbreitung anerkannt und durch Studien belegt. Dabei scheint die direkte Hemmung des Angiogeneseinduktors VEGF mittels löslicher Rezeptoren einer Hemmung z.B. mittels Angiostatin in der Wirksamkeit überlegen. Die Realisierung im gentherapeutischen Ansatz macht es möglich, die Nebenwirkungen von in hohen Dosen systemisch applizierten angiostatischen Substanzen zu reduzieren. Adenovirale Vektoren stellen hierbei aus vielerlei Gründen ein effizientes Mittel des genetischen Transfers dar.

Untersucht wurde die antitumorale Wirksamkeit einer adenoviral vermittelten, systemischen Behandlung mit löslichem Flk-1 bzw. Flt-1 (AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1) zur Bekämpfung hepatischer Metastasen des CRC im Mausmodell. Zunächst wurden rekombinante Adenoviren amplifiziert und ihre Aktivität in Bezug auf Transfektion, Proteinexpression und Wirkung in Vorversuchen belegt.

In einem subkutanen bzw. intrahepatischen Versuchsmodell an der Balb/c-Maus wurden die postulierten Wirkungen *in vivo* überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige systemische Gabe sowohl von AdsFlk-1 als auch von AdsFlt-1 in einer signifikanten Hemmung des Wachstums subkutan eingepflanzter Tumoren von 73% bzw. 53% zum Untersuchungszeitpunkt 13 Tage nach Behandlungsbeginn resultierte.

Auch im intrahepatischen Versuchsmodell führte die Anwendung von AdsFlk-1 zu einer Wachstumshemmung. Alle Tiere der Kontrolle zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung 11 Tage nach Behandlungsbeginn ein progredientes Wachstum, wohingegen sich bei 43% der mit AdsFlk-1 behandelten Tiere ein stabiles bzw. rückläufiges Wachstum

einstellte. Die mittleren Tumervolumina dieser Tiere betragen weit weniger als die Hälfte derjenigen, die mit dem Kontrollvektor behandelt wurden. Bezüglich der Überlebenszeit ergab die Applikation von AdsFlk-1 bzw. AdsFlt-1 im subkutanen Modell nur eine tendenzielle Verbesserung. So überlebten die Tiere bei Behandlung mit AdsFlt-1 im Schnitt 27 Tage, bei Behandlung mit AdsFlk-1 32 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer mittleren Überlebenszeit von lediglich 23 Tagen.

Der Verlauf des Alanin-Aminotransferase (ALT)-Serumspiegels sowie das Sozial- oder Fressverhalten der Versuchstiere zeigte eine prinzipiell gute Verträglichkeit. Zu Beginn der Therapie kam es zu einem Anstieg der ALT, welche sich im weiteren Verlauf des Versuchs wieder zu normalisieren begann. Sichtbare Anzeichen einer relevanten Hepatotoxizität wie die Entwicklung eines Ikterus konnten nicht gesehen werden.

Die Behandlung mit AdsFlk-1 resultierte in einem starken Anstieg des VEGF im Serum der Versuchstiere, und dass nicht nur bei tumortragenden, sondern auch bei gesunden Tieren. VEGF-mRNA konnten wir in verschiedenen Organen nachweisen. Die quantitative Analyse von Lebergewebe therapiertter Tiere im Vergleich zu Kontrollen zeigte einen Anstieg der VEGF-Expression, der vergleichbar dem im Serum war. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der gesteigerten Serum-Aktivität des VEGF und den gemessenen Tumervolumina, so dass die Leber eine führende Rolle bei der VEGF-Produktion unter Therapie mit angiostatischen Konstrukten zu spielen scheint. Weiterführende Versuche sollten Möglichkeiten der Unterdrückung der gesteigerten VEGF-Expression (beispielsweise mittels ‚gene silencing‘) und den Einfluss auf das Tumorwachstum untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004; 95: 884 - 891
- Alves A, Vibert E, Trajcevski S, Solly S, Fabre M, Soubrane O, Qian C, Prieto J, Klatzmann D, Panis Y. Adjuvant interleukin-12 gene therapy for the management of colorectal liver metastases. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 782 - 789
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221 - 228
- Azimuddin K, Khubchandani IT, Stasik JJ, Rosen L, Riether RD. Neoplasia after ureterosigmoidostomy. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1632 - 1638
- Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, Paleolog E, Baker A, Thrasher AJ, Ali RR. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther* 9; 2004: 320 - 326
- Ballantyne GH, Quin J. Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 4252 - 4566
- Becker CM, Farnebo FA, Iordanescu I, Behonick DJ, Shih MC, Dunning P, Christofferson R, Mulligan RC, Taylor GA, Kuo CJ, Zetter BR. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk1. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 548 - 553
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275: 1320 - 1323
- Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 418 - 425.
- Block A, Windler E, Greten H, Woo SL. Adenovirus gene therapy for liver metastases of gastrointestinal tumors. Development status and future prospectives. *Dtsch Med Wochenschr* 1997; 122: 728 -

732

- Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, Weirman A, Emmenegger U, Ma L, Thorpe P, Davidoff A, Huber J, Hicklin DJ, Kerbel RS. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004; 64: 6616 - 6625
- Boese-Landgraf J. Epidemiologie, Vorstufen und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *Der Onkologe* 1998; 4: 1
- Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M, Dorken B. Liver-associated toxicity of the HSV-*tk* / GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 9 - 16
- Brunetti-Pierri N, Ng T, Iannitti DA, Palmer DJ, Beaudet AL, Finegold MJ, Carey KD, Cioffi WG, Ng P. Improved hepatic transduction, reduced systemic vector dissemination, and long-term transgene expression by delivering helper-dependent adenoviral vectors into the surgically isolated liver of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 391 - 404
- Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5721 - 5728
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249 - 257
- Chen CT, Lin J, Li Q, Phipps SS, Jakubczak JL, Stewart DA, Skripchenko Y, Forry-Schaudies S, Wood J, Schnell C, Hallenbeck PL. Antiangiogenic gene therapy for cancer via systemic administration of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1983 - 1996
- Dev K, Dornsife RE, Hopper TM, Onori JA, Miller CG, Harrington LE, Dold KM, Mullin RJ, Johnson JH, Crosby RM, Truesdale AT, Epperly AH, Hinkle KW, Cheung M, Stafford JA, Luttrell DK, Kumar R. Antitumor efficacy of VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor correlates with expression of VEGF and its receptor VEGFR2 in

- tumour models. *Br J Cancer* 2004; 91: 1391 - 1398
- Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 33 – 49
- Ellis LM, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shasheen RM, Reinmuth N. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2001; 28: 94 – 104
- Everett RS, Hodges BL, Ding EY, Xu F, Serra D, Amalfitano A. Liver toxicities typically induced by first-generation adenoviral vectors can be reduced by use of E1, E2b-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1715 - 1726
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, van Ormondt H, Hoeben RC, van der Eb AJ. Charakterization of 911: a new helper cell line for the Titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gen Ther* 1996; 7: 215 – 222
- Fernando NH, Hurwitz HI. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 39 – 50
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 161: 851 - 858
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18 - 32
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182 - 1186
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43: 175 - 203
- Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 467 - 473
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29: 15 - 18
- Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 1976; 16: 207 – 248
- Fong Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 231 - 255

- Fukasawa M, Korc M. Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3327 - 3332
- Gardner EJ. A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. *Am J Hum Genet* 1951; 3: 167 - 176
- Gately MK, Gubler U, Brunda MJ, Nadeau RR, Anderson TD, Lipman JM, Sarmiento U. Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases. *Ther Immunol* 1994; 1: 187 - 196
- Gately MK, Brunda MJ. The potential of interleukin-12 for use in cancer therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; 23: 961 - 971
- Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 8934 - 8943
- Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Hallahan DE. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 2413 - 2419
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 265 - 273
- Guan M, Rodriguez-Madoz JR, Alzuguren P, Gomar C, Kramer MG, Kochanek S, Prieto J, Smerdou C, Qian C. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res* 2006; 66: 1620 - 1629
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353 - 364
- Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003; 200: 183 - 194
- Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A,

- Momoeda M, Yoshikawa H, Tsuruo T, Shibuya M, Taketani Y, Ozawa K. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2019 - 2023
- Hayashi S, Yokoyama I, Namii Y, Emi N, Uchida K, Takagi H. Inhibitory effect on the establishment of hepatic metastasis by transduction of the tissue plasminogen activator gene to murine colon cancer. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 380 - 384
- He YF, Li YH, Zhang DS, Xiang XJ, Xu RH, Pan ZZ, Zhou ZW, Jiang WQ, He YJ, Wan DS. Prognostic analysis of 220 colorectal cancer patients with synchronous liver metastases. *Ai Zheng* 2006; 25: 1153 - 1157
- Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11393 - 11398
- Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S, Matsuno S. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas* 2002; 25: 111 - 121
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2335 - 2342
- Imperiale MJ, Kochanek S. Adenovirus vectors: biology, design, and production. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 273: 335 - 357
- Ishigami SI, Aii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379 - 1384
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685 - 693

- Jansen M, Schippers E, Schumpelick V. Colon carcinoma after ureterosigmoidostomy -- a case report. *Zentralbl Chir* 1998; 123: 1180 - 1182
- Jozkowicz A, Dulak J. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 589 - 599
- Kay MA, Gloriosos JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; 7: 33 - 40
- Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727 - 739
- Kim B, Tang Q, Biswas PS, Xu J, Schiffelers RM, Xie FY, Ansari AM, Scaria PV, Woodle MC, Lu P, Rouse BT. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol* 2004; 165: 2177 - 2185
- Kirn D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther* 2001; 8: 89 - 98
- Knaebel HP, Kienle P, Buchler MW, Weitz J. Surgical strategies for the prevention of gastrointestinal tumours. *Z Gastroenterol* 2005; 43: 257 - 266
- Kollmar O, Schilling MK, Menger MD. Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 453 - 460
- Kong HL, Hecht D, Song W, Kovessi I, Hackett NR, Yayon A, Crystal RG. Regional suppression of tumor growth by *in vivo* transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 823 - 833
- Kou B, Li Y, Zhang L, Zhu G, Wang X, Li Y, Xia J, Shi Y. *In vivo* inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 129 - 137
- Kou B, Li Y, Shi Y, Xia J, Wang X, Wu S. Gene therapeutic exploration: retrovirus-mediated soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 (sFLK-1) inhibits the tumorigenicity of

- S180, MCF-7, and B16 cells in vivo. *Oncol Res* 2005; 15: 239 - 247
- Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4605 - 4610
- Lefesvre P, Attema J, van Bekkum D. A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer. *BMC Mol Biol* 2002; 3: 12
- Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006; 20: 1495 - 1497
- Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* 2006; 168: 639 - 648
- Mahasreshti PJ, Navarro JG, Kataram M, Wang MH, Carey D, Siegal GP, Barnes MN, Nettelbeck DM, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2057 - 2066
- Mahasreshti PJ, Kataram M, Wang MH, Stockard CR, Grizzle WE, Carey D, Siegal GP, Haisma HJ, Alvarez RD, Curiel DT. Intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 results in liver toxicity. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2701 - 2710
- Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 2000; 7: 815 - 816
- Martuza RL. Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J Clin Invest* 2000; 105: 841 - 846
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase

- 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111: 600 - 602
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418: 38 - 39
- Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 7498 - 7509
- Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ. Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 158 - 167
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7866 - 7871
- Mulkeen A L, Silva T, Yoo PS, Schmitz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. *Arch Surg* 2006; 141: 367 - 374
- Murata M, Takanami T, Shimizu S, Kubota Y, Horiuchi S, Habano W, Ma JX, Sato S. Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNAs) specific to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Curr Eye Res* 2006; 31: 171 - 180
- Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 1994; 153: 1697 - 1706
- Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 2006; 5: 1779 - 1787
- Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G,

- Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B, Olson S, Kirn D. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 2001; 8: 746 - 759
- Nielsen LL, Gurnani M, Syed J, Dell J, Hartman B, Cartwright M, Johnson RC. Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer: efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 681 - 694
- Nikol, Höfling. Aktueller Stand der Gentherapie. *DÄB* 1993; 41
- O'Neal WK, Zhou H, Morral N, Langston C, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Beaudet AL. Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector. *Mol Med* 2000; 6: 179 - 195
- Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1999; 8: 3801 - 3086
- Qian C, Bilbao R, Bruna O, Prieto J. Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Hepatology* 1995; 22: 118 - 123
- Ragot T, Opolon P, Perricaudet M. Adenoviral gene delivery. *Methods Cell Biol* 1997; 52: 229 - 260
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148 - 158
- Raskopf E, Dzienisowicz C, Hilbert T, Rabe C, Leifeld L, Wernert N, Sauerbruch T, Prieto J, Qian C, Caselmann WH, Schmitz V. Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model. *Hepatology* 2005; 41: 1233 - 1240
- Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, Bennett J, Tolentino MJ. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 2003; 9: 210 - 216

- Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 35 - 47
- Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Herrmann SH, Ritz J. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med* 1992; 175: 779 - 788
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114: 853 - 865
- Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* 1999; 17: 191 - 202
- Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther* 2002; 5: 340 - 344
- Ruers T, Bleichrodt RP. Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1023 - 1033
- Sato Y, Ajiki T, Inoue S, Fujishiro J, Yoshino H, Igarashi Y, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, Kobayashi E. Gene silencing in rat-liver and limb grafts by rapid injection of small interference RNA. *Transplantation* 2005; 79: 240 - 243
- Schmitz V, Kornek M, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Rabe C, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4332 - 4336
- Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G, Thorgeirsson UP. VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest* 2005; 85: 608 - 623
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983 - 985
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated

- angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843 - 845
- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993; 91: 2235 - 2243
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92: 735 - 745
- Susman E. Bevacizumab adds survival benefit in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6: 136
- Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; 22: 258 - 273
- Tannock IF. Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1973; 30: 2470 - 2476
- Tao J, Tu YT, Huang CZ, Feng AP, Wu Q, Lian YJ, Zhang LX, Zhang XP, Shen GX. Inhibiting the growth of malignant melanoma by blocking the expression of vascular endothelial growth factor using an RNA interference approach. *Br J Dermatol* 2005; 153: 715 - 724
- Toda M, Martuza RL, Rabkin SD. Combination suicide/cytokine gene therapy as adjuvants to a defective herpes simplex virus-based cancer vaccine. *Gene Ther* 2001; 8: 332 - 339
- Tol J, Punt CJ. Treatment of liver metastases from colorectal cancer. *Neth J Med* 2006; 64: 133 - 135
- Topf N, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther* 1998; 5: 507 - 513
- Tseng JF, Farnebo FA, Kisker O, Becker CM, Kuo CJ, Folkman J, Mulligan RC. Adenovirus-mediated delivery of a soluble form of the VEGF receptor Flk1 delays the growth of murine and human pancreatic adenocarcinoma in mice. *Surgery* 2002; 132: 857 - 865

- Vajkoczy P, Thurnher A, Hirth KP, Schilling L, Schmiedek P, Ullrich A, Menger MD. Measuring VEGF-Flk-1 activity and consequences of VEGF-Flk-1 targeting *in vivo* using intravital microscopy: clinical applications. *Oncologist* 200; 5: 16 - 19
- van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FH, van Krieken AJ, Rinkes IH, van de Velde CJ, Hoeben RC. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine gene and ganciclovir administration. *Gene Ther* 1998; 5: 451 - 458
- Varnavski AN, Calcedo R, Bove M, Gao G, Wilson JM. Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naive and pre-immunized mice. *Gene Ther* 2005; 12: 427 - 436
- Vavra P, Dostalík J, Martinek L, Zonca P, Plevová P, Kohoutová M, Stekrova J. Familial adenomatous polyposis as a precancerosis of colon cancer. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103: 418 - 422
- Venook A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2005; 10: 250 - 261
- Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 2000; 60: 249 - 271
- Wang F, Tian YH, Li L, Chen XF, Hu HH, Li CY, Huang Q. Inhibition of tumor angiogenesis, growth and metastasis by blocking VEGF paracrine pathway. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002; 34: 165 - 170
- Wang R, Zhang XW, Wang GQ, Chen XC, Tian L, Yang HS, Hu M, Peng F, Yang JL, He QM, Zhang W, Jiang Y, Deng HX, Wen YJ, Li J, Zhao X, Wei YQ. Systemic inhibition of tumor growth by soluble Flk-1 gene therapy combined with cisplatin. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 940 - 947
- Wu Y, Li ZY, Zhao X, Kan B, Wei YQ. Inhibition of ovarian tumor growth by gene therapy with recombinant soluble vascular endothelial growth factor receptor 2. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 941 - 948
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.

Nature 2000; 407: 242 - 248.

Ye C, Feng C, Wang S, Wang KZ, Huang N, Liu X, Lin Y, Li M. sFlt-1 gene therapy of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2004; 145: 817 - 822

Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol* 2006; 13: 81 - 100

Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 871 – 875

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolfgang H. Caselmann, für die interessante Fragestellung und die Bereitstellung aller benötigten Mittel, für Anregungen und konstruktive Kritik, die das Gelingen dieser Dissertationsarbeit ermöglicht haben.

In besonderer Weise gilt mein Dank weiterhin Herrn Privatdozent Dr. Volker Schmitz, der mich über die gesamte Zeit der praktischen und theoretischen Arbeit an dieser Schrift betreut hat. Seinem ausdauernden Engagement, seiner fundierten Fachkenntnis und Erfahrung und nicht zuletzt seiner Geduld sind es zu verdanken, dass diese Arbeit überhaupt in der vorliegenden Form zum Abschluss gebracht werden konnte.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Molekulare Therapieforschung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, zunächst und besonders Frau Dr. E. Raskopf, die mir mit ihrer praktischen Erfahrung eine große Hilfe gewesen ist und bei Problemen nahezu immer ansprechbar war, daneben Annemarie Musch, Ingeborg Höschler, Maria-Angeles Gonzalez-Carmona, Ute Henseler und Per Hoffmann.

Meinem direkten Kollegen in der Arbeitsgruppe, Christian Dzienisowicz, möchte ich auf diesem Weg ebenfalls danken für gemeinsam durchgeführte Analysen und Versuchsreihen.

Bei Herrn B. Bialaschik und den Mitarbeitern des Tierhauses der Universität bedanke ich mich für die Betreuung meiner Versuchstiere.

Bei den Laboren von Prof. Spengler und Prof. Schmidt-Wolf möchte ich mich für die Unterstützung und für die Mitbenutzung von Einrichtung und Geräten bedanken.

Meiner Familie, meinen Eltern und meiner Partnerin Sandra danke ich herzlich für die moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, für Anregungen und Kritik auch aus der Sicht mit dem Thema nicht so eng Befasster.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Tobias Christian Hilbert
Geburtsort	Bonn
Familienstand	verheiratet, eine Tochter

Schulische Ausbildung

1985 – 1989	Theodor-Weinz-Grundschule Bad Honnef Siebengebirgsgymnasium Bad Honnef, Allgemeine Hochschulreife, Note 1,7
1989 – 1998	

Universitäre Ausbildung

seit Oktober 1999	Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
August 2001	Physikum, Note „Gut“
August 2002	Erstes Staatsexamen, Note „Gut“
August 2004	Zweites Staatsexamen, Note „Gut“
Oktober 2005	Drittes Staatsexamen, Note „Sehr Gut“

Praktische Erfahrung

Frühjahr 2002	Famulatur im St. Marienkrankenhaus Frankfurt/Main, Abteilung für Innere Medizin
Frühjahr 2003	Famulatur im Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn
Herbst 2003	Famulatur im Johanniterkrankenhaus Bonn, Abteilung für Anaesthesiologie und Abteilung für Innere Medizin
Frühjahr 2004	Famulatur im St. Johannes-Krankenhaus Bad Honnef, Abteilung für Chirurgie
Oktober 2004 bis September 2005	Praktisches Jahr im Klinikum Siegburg, Wahlfach Radiologie
Februar 2006 bis Juni 2007	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin am Gemeinschaftskrankenhaus Bonn, Haus St. Elisabeth
seit dem 1. Juli 2007	Chefarzt: Dr. med. J. Reuther Assistenzarzt in der Abteilung für Anaesthetie und Intensivmedizin am Gemeinschaftskrankenhaus Bonn, Haus St. Elisabeth Chefärztin: Dr. med. B. Pergande

Promotion

Aus dem Thema der vorliegenden Dissertationsschrift sind bislang folgende Publikationen hervorgegangen:

- Schmitz V, Kornek M, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Rabe C, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Wachstumshemmung subkutaner kolorektaler Karzinome (CRC) mittels systemischen Gentransfers für den VEGF Rezeptor 1 (Flt1–3) im Mausmodell. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 203
- Raskopf E, Dzienisowicz C, Hilbert T, Rabe C, Leifeld L, Wernert N, Sauerbruch T, Prieto J, Qian C, Caselmann WH, Schmitz V. Effective angiostatic treatment in a murine metastatic and orthotopic hepatoma model. *Hepatology* 2005; 41: 1233 - 1240
- Schmitz V, Kornek M, Hilbert T, Dzienisowicz C, Raskopf E, Rabe C, Sauerbruch T, Qian C, Caselmann WH. Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4332 - 4336
- Schmitz V, Vilanueva H, Raskopf E, Hilbert T, Barajas M, Dzienisowicz C, Gorschluter M, Strehl J, Rabe C, Sauerbruch T, Prieto J, Caselmann WH, Qian C. Increased VEGF levels induced by anti-VEGF treatment are independent of tumor burden in colorectal carcinomas in mice. *Gene Ther* 2006; 13: 1198 - 1205