

**Gentherapie beim Pankreaskarzinom
durch adenoviralen Transfer Apoptose-induzierender
und immunmodulierender Gene**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Geo- und Naturwissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der Universität-Gesamthochschule Essen



vorgelegt von
Florian Rödicker
aus Wolfenbüttel

September 2002

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Dr. B.M. Pützer

2. Gutachter: PD Dr. J. Thomale

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Obe

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Apoptose und Zellproliferation	4
1.3 Der Tumorsuppressor p53	6
1.4 Das p53-Familienmitglied p73	8
1.5 Der Transkriptionsfaktor E2F1	11
1.6 Tumor-Immuntherapie	14
1.6.1 Interleukin-12 (IL-12) in der Tumor-Immuntherapie	16
1.6.2 Der Costimulator B7.1 (CD80) in der Tumor-Immuntherapie	18
1.6.3 Kombination von IL-12 und B7.1 in der Tumor-Immuntherapie	20
1.7 Adenoviren als Gentherapie-Vektoren	21
1.8 Problemstellung und Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Zelllinien	25
2.1.2 Bakterien	25
2.1.3 Plasmide	26
2.1.4 Antikörper	26
2.1.4.1 Primärantikörper	26
2.1.4.2 Sekundärantikörper	26
2.1.5 Versuchstiere	26
2.1.6 Zellkultur (Medien, Lösungen und Seren)	26
2.1.7 Medien und Lösungen für Bakterienarbeiten	27
2.1.8 Nukleinsäurearbeiten	29
2.1.8.1 Lösungen, Puffer und Mixe	29
2.1.8.2 Produkte für die RT-PCR	30
2.1.8.3 Oligonukleotide	30
2.1.8.4 Enzyme	31
2.1.9 Puffer und Lösungen für Proteinarbeiten	32
2.1.10 Puffer und Lösungen für Virusarbeiten	32
2.1.11 Kits	33
2.1.12 Verbrauchsmaterialien	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur	34
2.2.1.1 Kultivierung von Tumorzellen	34
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung	34
2.2.1.3 Induktion durch 4-Hydroxy-Tamoxifen	34

2.2.1.4	Gemcitabine-Behandlung	34
2.2.1.5	Ernten von Zellen	35
2.2.1.6	Kalzium-Phosphat-Transfektion	35
2.2.1.7	Elektroporation	35
2.2.2	Bakterienarbeiten	36
2.2.2.1	Transformation von kompetenten Bakterien	36
2.2.2.2	Elektrotransformation	36
2.2.2.3	Bakterien-Glycerin-Stocks	36
2.2.2.4	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)	36
2.2.2.5	Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräparation)	37
2.2.2.6	Maxipräparation mit CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	38
2.2.3	Nukleinsäurearbeiten	39
2.2.3.1	Restriktion von Nukleinsäuren	39
2.2.3.2	Klenow-Auffüllung von Nukleinsäuren	39
2.2.3.3	Ligation von Nukleinsäure-Enden	39
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	40
2.2.3.5	Isolierung von Gesamt-RNA	40
2.2.3.6	Reverse Transkription	41
2.2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	43
2.2.4.1	Native Agarosegele	43
2.2.4.2	Polyacrylamidgele	43
2.2.4.3	Autoradiographie	44
2.2.4.4	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	44
2.2.5	Analyse von Proteinen	45
2.2.5.1	Herstellung von Zellextrakten	45
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	45
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.2.5.4	Western-Blot	46
2.2.5.5	Immundetektion (ECL-System)	46
2.2.5.6	ELISA	46
2.2.5.7	B7.1-Durchflusszytometrie-Analyse	47
2.2.5.8	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	47
2.2.6	Zytotoxizitäts-Untersuchungen	48
2.2.6.1	MTT-Assay	48
2.2.7	Apoptose-Untersuchungen	49
2.2.7.1	FACS-Analysen	49
2.2.8	Virusarbeiten	50
2.2.8.1	Klonierung von Ad α -p73 und Ad β -p73 mit Hilfe des AdEasy-Systems	50
2.2.8.2	Plaque-Infektion	50
2.2.8.3	Virus-Präparation (High Titer)	51
2.2.8.4	Virus-Präparation (mit CsCl-Dichtegradientenzentrifugation)	52
2.2.8.5	Virus-Titration (Plaque-Assay)	53
2.2.8.6	Drittgenerations-Adenovirus-Vektoren	54
2.2.9	Tierversuche	55
2.2.9.1	Tierexperimente für die E2F1-Gentherapie	55
2.2.9.2	Tierexperimente für die IL-12/B7.1-Gentherapie in Mäusen	55
2.2.9.3	Tierexperimente für die IL-12/B7.1-Gentherapie in Murmeltieren	55

3.	Ergebnisse	57
3.1	Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit von p53 und p73 beim Pankreaskarzinom	57
3.1.1	Überprüfung des p53-Status bei den verwendeten Zelllinien	57
3.1.2	Effekt von p53 und p73 in Pankreastumorzelllinien	58
3.1.3	Untersuchung der fehlenden Apoptose-Induktion von p53 in AsPC-1 Zellen	62
3.1.4	Fehlende Ser46-Phosphorylierung von p53 in AsPC-1 Zellen verhindert die Aktivierung von p53AIP1	66
3.2	Therapeutische Wirksamkeit von E2F1 beim Pankreaskarzinom	68
3.2.1	Überprüfung der Expression von ER-E2F1 in Pankreastumorzelllinien	68
3.2.2	Wirksamkeit von E2F1 und Gemcitabine in Pankreastumorzellen	69
3.2.3	Untersuchung des Mechanismus der durch E2F1 und Gemcitabine vermittelten Apoptose	72
3.2.4	Die Wirksamkeit der E2F1/Gemcitabine-Kombinationstherapie <i>in vivo</i>	74
3.3	Immuntherapie beim Pankreaskarzinom	77
3.3.1	Quantifizierung von IL-12 und B7.1 in Pan 02 Pankreaskrebszellen	77
3.3.2	Rückbildung von etablierten Pankreastumoren nach intratumoraler Injektion von AdIL-12/B7.1	79
3.3.3	Immuneffektormechanismen bei der von IL-12 und B7.1 induzierten Immunantwort gegen nicht immunogene Pan 02 Tumoren	81
3.3.4	Antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 in Nacktmäusen	84
3.4	Immuntherapie bei nichttransplantierten hepatozellulären Karzinomen in Murmeltieren	86
3.4.1	Quantifizierung von IL-12 und B7.1 in Murmeltierzellen	86
3.4.2	Antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 gegen nichttransplantierte, WHV-induzierte hepatozelluläre Karzinome	88
3.4.3	Immuneffektormechanismen bei der Regression von primären HCCs	90
4.	Diskussion	93
4.1	Vergleich von p53- und p73-Gentherapie beim Pankreaskarzinom	93
4.2	E2F1-Gentherapie beim Pankreaskarzinom	95
4.3	Erfolgreiche Immuntherapie beim Pankreaskarzinom	98
4.4	Erfolgreiche Immuntherapie bei WHV-induzierten HCCs in Murmeltieren	101
4.5	Ausblick	104
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literaturverzeichnis	107
7.	Anhang	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ad	Adenovirus
Apaf-1	apoptosis activating factor 1
ARF	alternate reading frame
bp	Basenpaare
C346	C346 Cosmid
cDNA	copy DNA
d.h.	dass heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFPS	GFP-Spektrin-Fusionsprotein
h	Stunde
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIPK2	homeodomain-interacting protein kinase-2
HPRT	hypoxanthine-guanine phospho-ribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
ITR	inverted terminal repeats
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
M	molar (mol/Liter)

min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
n	Anzahl der Tiere in einem Versuch
OD	optische Dichte
pA	Poly-Adenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly(ADP)-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming units
PI	Propidiumiodid
PIDD	p53-induced death domain
PIG	p53-induced gene
p53AIP1	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
RB	Retinoblastom-Gen bzw. -Protein
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur (bei Zentrifugationen)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität; 1U = 1 mol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
z.B.	zum Beispiel
'	Minute
"	Sekunde

1. Einleitung

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) liegt im oberen Bereich der Bauchhöhle, oberhalb des Zwölffingerdarms und hinter dem Magen, nahe der Wirbelsäule und vor den Nieren. Sie ist eine Drüse von etwa 15-20 cm Länge, die man anatomisch in drei Abschnitte unterteilt: 1.) den Kopf, der in der Biegung der Zwölffingerdarmschlinge liegt, 2.) den Körper, der die Wirbelsäule und die Aorta in Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbels überquert, und 3.) den Schwanz, der bis zur Milz reicht.

Das Pankreas besteht aus einem exokrinen (sekretorischen) und einem endokrinen Anteil. Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse, die pro Tag mehr als einen Liter Verdauungssaft produziert, der über das Pankreasgangsystem in den Zwölffingerdarm abgegeben wird. Er enthält verschiedene Verdauungsenzyme, die für die Aufschließung und Digestion der einzelnen Nahrungsbestandteile notwendig sind. Dazu gehören eiweißspaltende Enzyme (Proteasen, z.B. Trypsin), fettspaltende Enzyme (Esterasen, z.B. Lipase), kohlenhydratspaltende Enzyme (Carbohydrasen, z.B. Amylase) und nukleinsäurespaltende Enzyme (Nukleasen). Das endokrine Pankreas wird von der Gesamtheit der Langerhans-Inseln (Inselapparat) gebildet. Hier werden die Hormone Insulin und Glukagon, die den Blutzuckerspiegel regulieren, produziert.

Fällt aus irgendwelchen Gründen (z.B. nach Pankreasentfernung oder -zerstörung) eine der beiden Funktionen des Pankreas aus, so hat dies unbehandelt auf Dauer lebensbedrohliche Auswirkungen auf den Organismus. Das Fehlen der Enzymproduktion führt dazu, dass Nahrungsbestandteile nicht mehr in den Körper aufgenommen werden können und der Organismus dadurch auszehrt. Kann der Körper kein Insulin mehr produzieren, entsteht die Zuckerkrankheit, der Diabetes mellitus.

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt die fünfthäufigste Todesursache durch bösartige Neubildungen in den westlichen Industrieländern dar, in den USA sogar die vierthäufigste, obwohl diese Krebsart von der absoluten Zahl der Erkrankungen her, im Vergleich zu anderen, zu den nicht häufigen zählt [1,2]. Beispielsweise werden in den USA im Jahre 2002 über 169.000 neue Fälle von Lungenkrebserkrankungen erwartet, wohingegen beim Pankreaskarzinom „nur“ von etwa

30.000 Neuerkrankungen auszugehen ist [1]. Histologisch lassen sich verschiedene Formen von Tumoren der Bauchspeicheldrüse unterscheiden. Bei weitem am häufigsten sind duktale exokrine Tumoren, die vom Gangsystem des Pankreas ausgehen. Das duktale Adenokarzinom des Pankreas macht etwa 80-85% aller Krebserkrankungen dieses Organs aus [3].

Mehr noch als bei anderen Krebsarten gilt beim Pankreaskarzinom der Grundsatz, dass die Heilungs- und Überlebenschancen umso besser sind, je früher der Tumor erkannt wird. Die in den letzten Jahren erreichten großen Fortschritte in der Diagnostik kommen beim Pankreaskarzinom jedoch kaum zum Tragen, da die Symptome zu Beginn der Erkrankung häufig uncharakteristisch sind. Die häufigsten Beschwerden und Symptome sind Gewichtsverlust, Schmerzen, Gelbsucht und in selteneren Fällen Appetitverlust, Übelkeit und Diabetes mellitus. Alle diese Symptome können auch andere, vergleichbar harmlose Ursachen haben. Aus diesem Grund ist bei den meisten Patienten die Erkrankung bei Diagnosestellung schon sehr weit fortgeschritten.

Bauchspeicheldrüsenkrebs besitzt mit die schlechteste Prognose aller humanen Malignome. Hierfür gibt es im wesentlichen zwei Gründe: Zum einen zeigen 90% der Patienten bei Diagnosestellung bereits einen lokal weit fortgeschrittenen Tumor oder sogar Fernmetastasen, wodurch eine chirurgische Resektion des Tumors nicht mehr vorgenommen werden kann [4,5]. Zum anderen ist ein Pankreaskarzinom, das nicht mehr operativ entfernt werden kann, mit den anderen heute zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen (Strahlentherapie, Chemotherapie) kaum heilbar. Der mittlere Überlebenszeitraum von Patienten, deren Pankreasmalignom chirurgisch nicht mehr resezierbar ist, beträgt 4-6 Monate, und die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Patienten liegt bei unter 3% [1,4,5].

Die Ursachen für die Entstehung von Bauchspeicheldrüsenkrebs sind bisher weitgehend ungeklärt. Jedoch ist vor allen Dingen das Rauchen ein gut dokumentierter Risikofaktor [6-8], wohingegen die Rolle von anderen Faktoren, so zum Beispiel Alkoholkonsum, Koffeinkonsum und Pankreatitis (chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse), kontrovers diskutiert wird [7]. Auf molekularer Ebene scheint neben der Aktivierung von Onkogenen (hier vor allem K-ras) die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. p16, p53, Rb and DPC4) eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Tumoren zu spielen [9,10]. Darüber hinaus besitzen mehr als 75% aller Pankreaskarzinome mindestens drei dieser genetischen Alterationen zur gleichen Zeit, was eine Erklärung für die bei Pankreaskarzinomen beobachtete besondere Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie sein könnte [11,12].

Gegenwärtig gibt es für Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas keine kurative Therapie. Sowohl chirurgische Resektion als auch Chemo- und Strahlentherapie haben nur palliative Wirkung und führen nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der Überlebenszeit [4,13-15]. Präoperative Chemoradiotherapie hat in den letzten Jahren zu einer Verbesserung der Lebensqualität (QOL, quality-of-life) bei Bauchspeicheldrüsenkrebs-Patienten geführt, jedoch in keinem Fall zu einer Heilung [16]. Bis vor kurzem war die Standard-Therapie für Patienten mit fortgeschrittener Krankheit die Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU), entweder allein oder in Kombination mit anderen Medikamenten oder Therapien (z.B. Strahlentherapie) [17,18]. Inzwischen ist aber allgemein akzeptiert, dass die Ansprechrate mit 5-FU meist bei unter 10% liegt mit einem sehr geringen Einfluss auf die QOL oder das Überleben [19]. Zudem waren die Ergebnisse, die man mit 5-FU Kombinationstherapien erhielt, nicht besser als mit 5-FU alleine und darüber hinaus mit einer größeren Toxizität verbunden [20-22]. Neuere Chemotherapeutika wie Paclitaxel oder Docetaxel zeigten zwar zum Teil recht hohe Ansprechraten, hatten aber auch nur geringen Einfluss auf das Überleben und die QOL [23,24]. Das derzeit gebräuchlichste Chemotherapeutikum bei der Behandlung von nicht-resezierbaren, fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen ist Gemcitabine (Gemzar®), ein Deoxycytidin-Analogon, das im Vergleich zu 5-FU eine größere Effektivität und geringere Nebenwirkungen zeigt. Gemcitabine hat trotz relativ bescheidener Ansprechraten vielversprechende Aktivität bei der Behandlung von Patienten gezeigt in Bezug auf eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs, eine Reduktion der Symptome und eine längere Überlebenszeit [17,25-28]. Aufgrund des neuen Wirkungsmechanismus, der geringen Toxizität und der therapeutischen Wirksamkeit wird Gemcitabine vor allen Dingen in Kombinationstherapien mit anderen Antitumor-Mitteln, am erfolgreichsten mit 5-FU, und mit Strahlentherapie eingesetzt [29,30].

Da die meisten konventionellen Behandlungsmethoden, mit Ausnahme der chirurgischen Resektion im Anfangsstadium des Tumors, beim Pankreaskarzinom nicht wirksam sind, wurden verschiedene neue und alternative Therapiestrategien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Chang et al. [31] behandelten nicht resezierbare Pankreastumor-Patienten mit allogenen gemischten Lymphozyten-Kulturen unter Verwendung einer endoskopischen Ultraschall-gesteuerten Injektionstechnik mit vielversprechenden Anfangserfolgen. Außerdem wurden gängige Chemo- und Radiotherapien in Kombination mit Immuntherapie in ersten Studien in der Klinik getestet, auch hier recht erfolgversprechend [32-35]. Motoi et al. [36] zeigten, dass die gleichzeitige Infektion eines replikations-kompetenten Adenovirus (repliziert

selektiv nur in p53-defizienten Tumorzellen) und eines Adenovirus, der für die Expression eines Zytokins codiert, zu einem starken Anstieg der Zytokinmenge führte und daraus folgend zu einer vollständigen Pankreastumorrückbildung, allerdings nur im Mausmodell. Ein anderer Ansatz basiert auf einem inzwischen besseren Verständnis der molekularen Grundlagen von Pankreaskarzinomen und ihren häufigsten genetischen Alterationen. Die Induktion des sogenannten programmierten Zelltodes (Apoptose) durch Einbringung von Tumorsuppressorgenen in Tumorzellen ist eine Möglichkeit für mögliche neue klinische Ansätze. So ist z.B. p53 in ungefähr 70% aller Pankreaskarzinome mutiert. Die Einbringung von p53 in Pankreastumorzellen mit Hilfe verschiedener Vektorsysteme führte zu Apoptose und Tumorrückbildung im Mausmodell [37,38]. Erste klinische Studien in nicht resezierbaren Pankreastumoren mit replikations-selektiven Adenoviren, die nur in p53-negativen Tumorzellen replizieren und diese dann lysieren, waren allerdings nicht sehr ermutigend [39].

Gegenwärtig ist also keine kurative Therapie für nicht resezierbare Pankreaskarzinome verfügbar, so dass alternative Therapiestrategien dringend erforderlich sind.

1.2 Apoptose und Zellproliferation

Wachstum ist eine der Grundeigenschaften lebender Substanzen. In den verschiedenen Geweben des Körpers ist die Fähigkeit zur Zellneubildung physiologischerweise eingeschränkt und einer genau abgestimmten Regulation unterworfen. Dies betrifft einerseits den wachstumsfördernden Prozess der Zellproliferation und andererseits den zum programmierten Zelltod führenden Vorgang der Apoptose. Eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der Proliferation führt zu einem progressiven Anstieg der Zellzahl und kann zur Tumorigenese führen. Durch Induktion des zellulären Selbstzerstörungsmechanismus, der Apoptose, kann es zur frühzeitigen Eliminierung dereguliert proliferierender Zellen kommen.

Apoptose ist ein mehrstufiges Zelltod-Programm, das in jeder Zelle des Körpers in latenter Form vorhanden ist. Es kann durch zwei alternative Wege eingeleitet werden: zum einen durch Todes-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (extrinsischer Weg) und zum anderen über die Mitochondrien (intrinsischer Weg) [40,41]. Auf beiden Wegen führt die Induktion von Apoptose durch proapoptotische Signale zur Aktivierung von Initiator-Caspasen: beim extrinsischen Weg Caspase-8 und wahrscheinlich Caspase-10, die durch die Bindung von Todes-Liganden an Todes-Rezeptoren (z.B. Fas) aktiviert werden, und beim intrinsischen Weg Caspase-9, die durch die Freisetzung von Cytochrom C aktiviert wird. Diese spalten und

aktivieren die sogenannten „Effektor“-Caspasen, hauptsächlich Caspase-3, -6 und -7. Die aktivierten „Effektor“-Caspasen spalten sich dann gegenseitig, und eine proteolytische Kaskade von Caspase-Aktivierungen beginnt. Letztendlich spalten die aktivierten „Effektor“-Caspasen zelluläre Substrate (die sogenannten „Todes-Substrate“), was zu charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen und schließlich zur Apoptose führt [42]. Bei den Caspasen handelt es sich um eine Familie von cytoplasmatisch lokalisierten Cystein-Proteasen mit einer Substratspezifität für Asparaginsäure-Reste. Diese liegen in Form inaktiver Pro-Caspasen vor, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden [43].

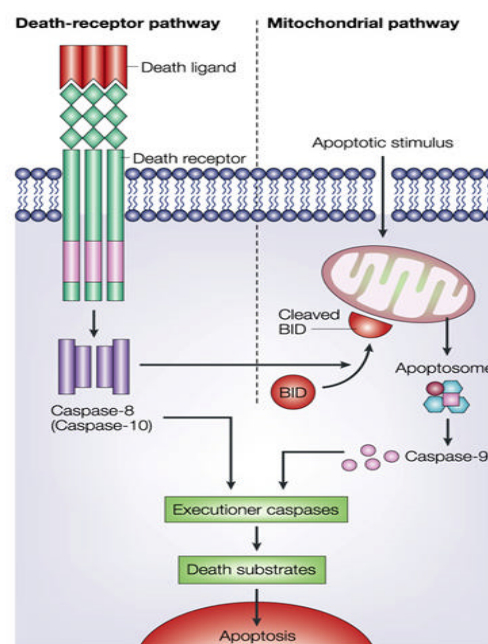


Abb. 1.2.1: Darstellung der beiden unterschiedlichen Apoptose-Signalwege. Abbildung modifiziert nach Igney und Kramer, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) [82].

Bei der Behandlung von Krebs mit Hilfe von Strahlen- und Chemotherapie werden die Zielzellen hauptsächlich durch die Induktion von Apoptose getötet. Daher kann durch Veränderungen von wichtigen Faktoren des Apoptose-Signalweges der durch diese Therapien bewirkte Tumorzelltod beeinflusst bzw. verhindert werden. Tumorzellen können sich durch die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen oder die verminderte Produktion von pro-apoptotischen Proteinen (bzw. Mutation der Gene, die zur Bildung von pro-apoptotischen Proteinen führen) der Apoptose entziehen. Das ist ein wesentliches Kennzeichen von Krebs. Für die Entwicklung effektiver Therapiestrategien ist ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zu einer Tumorresistenz gegen Apoptose führen, notwendig, um dadurch

am Ende Tumorzellen für Apoptose und damit auch für eine effektive Tumorthherapie zu resensibilisieren [44,45].

1.3 Der Tumorsuppressor p53

Wie schon erwähnt, gibt es für Tumorzellen eine Reihe von Möglichkeiten, eine Resistenz gegen Apoptose zu erlangen. Der am häufigsten vorkommende Verlust eines pro-apoptotischen Regulators durch Mutation betrifft das p53 Tumorsuppressor-Gen. Die daraus resultierende funktionelle Inaktivierung des Genproduktes, des p53 Proteins, ist in nahezu allen humanen Neoplasien zu beobachten [46,47]. Da p53 ein entscheidender Initiator des intrinsischen apoptotischen Signalweges ist [48], kann der Verlust von funktionellem p53 Apoptose verhindern und Tumorentstehung beschleunigen, wie in transgenen Mäusen gezeigt werden konnte [49,50]. Daher hat p53 einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli.

Das p53 Protein ist ein Sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf zellulären Stress und DNA-Schädigung die Expression einer ganzen Reihe von Genen reguliert, die in Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur und Apoptose involviert sind, und dadurch die Entstehung von Krebs verhindert [51-55]. Das wichtigste Zielgen für einen p53-induzierten Zellzyklus-Arrest ist der CDK-Inhibitor p21^{Cip1/Waf1} [56]. Ein weiteres wichtiges Zielgen ist Mdm2, ein Onkogen, das die transkriptionelle Aktivität von p53 reprimiert und dessen Degradation reguliert. Gleichzeitig besteht ein positiver „Feedback loop“ zwischen p53 und Mdm2, bei dem Mdm2 als Folge einer erhöhten p53 Aktivität stärker exprimiert wird. Diese Rückkopplungsschleife, in der p53 Mdm2 hochreguliert, wohingegen Mdm2 p53 herunterreguliert, kann man als Regulierungselement der Zelle auf äußere und innere Einflüsse bezeichnen [57-59]. Durch die Interaktion von Mdm2 mit p14ARF wird die Bindung von Mdm2 an p53 verhindert, was zur Aktivierung von p53 führt.

Bei extremem Stress und schwerer DNA-Schädigung löst p53 Apoptose aus, indem es zur Aktivierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie (z.B. Bax, PUMA und Noxa) und zur Repression von anti-apoptotischen Bcl-2 Familien Proteinen (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L) und Survivin führt [51,52,60-62]. Darüber hinaus kann p53 auch weitere Gene transaktivieren, die zur Apoptose beitragen können. Dazu gehören Apaf-1, PIDD, p53DINP1 und vor allen Dingen p53AIP1 [63-66]. Weiterhin zählen dazu die sogenannten PIGs (p53-induced genes), die oxidativen Stress durch Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS,

reactive oxygen species) induzieren [67]. Außer diesen genannten Proteinen, die in den intrinsischen Apoptose-Signalweg involviert sind, kann p53 auch CD95 (APO-1/Fas), TRAIL-Rezeptor 2 (TRAIL-R2/DR5) und TRAIL-R1 transkriptionell aktivieren und damit Zellen für die über Todes-Rezeptoren vermittelte Apoptose (den extrinsischen Weg) sensibilisieren [51,68-70]. Damit wird deutlich, dass p53 die Expression eines breiten Spektrums an Todes-Effektoren induzieren kann. Zudem vermitteln auch Transkriptions-unabhängige Aktivitäten von p53 einige seiner pro-apoptischen Wirkungen. Dazu gehören Protein-Protein-Interaktionen, direkte Wirkungen in den Mitochondrien und die Relokalisation von Todes-Rezeptoren an die Zelloberfläche [71-73].

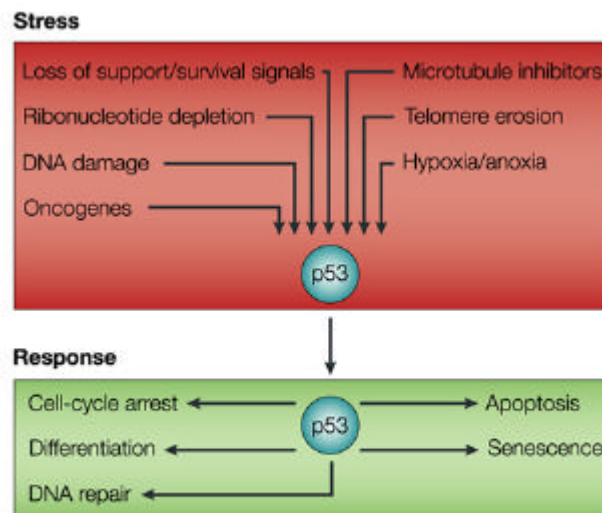


Abb. 1.3.1: Darstellung der p53-Signalwege. p53 vermittelt die Antwort auf verschiedene Stresssignale. Es wurden unterschiedliche zelluläre Antworten nach einer p53-Aktivierung beschrieben, der daraus folgende Effekt ist jedoch im Allgemeinen die Inhibierung des Zellwachstums. Abbildung modifiziert nach Vousden und Lu, Live or let die: the cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) [75].

Um die oben genannten Funktionen wie Zellzyklus-Kontrolle und Aktivierung von Apoptose ausüben zu können, muss das p53-Protein durch post-translationale Modifikationen aktiviert werden, wozu Interaktionen mit spezifischen Enzymen erforderlich sind [74,75]. Dabei wird p53 an mehreren Aminosäureresten stark phosphoryliert, sodass diese Modifikationen mit der Fähigkeit von p53 in Verbindung gebracht wurde, eine apoptotische Antwort zu induzieren. Von besonderem Interesse ist dabei die Phosphorylierung von p53 am Serin-Rest 46 (Ser-46), die notwendig ist, damit p53 die Expression von apoptotischen Zielgenen wie p53AIP1, nicht aber die von Zellzyklus-Arrest-vermittelnden Genen wie CDKN1A, induzieren kann [66,76].

Die Regulierung der Ser-46 Phosphorylierung könnte daher entscheidend sein, um den Signalweg (Arrest oder Apoptose), der sich aus der Aktivierung von p53 ergibt, festzulegen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Kinasen an der Modifikation von p53 beteiligt sind, abhängig von der Art der DNA-Schädigung [65,76-79]. Zusätzlich zu einer Phosphorylierung könnten auch andere post-translationale, kovalente Modifikationen von p53 eine wichtige Rolle bei der Regulierung der p53-Aktivität spielen. Dazu gehören Sumoylierung und Acetylierung, wobei eingehendere Untersuchungen hier noch ausstehen [75].

Da der Verlust von funktionellem p53 in fast allen Arten von humanen Krebserkrankungen vorkommt, besteht ein Ansatz in der Tumor-Gentherapie darin, das Wildtyp-p53-Gen in Tumorzellen einzubringen, die mutiertes p53 exprimieren [80]. Obwohl dieser Ansatz sowohl in Tieren als auch in Menschen erfolgreich angewendet werden konnte [80,81], existiert in verschiedenen Tumorzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber p53-vermittelter Apoptose [82]. Diese Resistenz kann beispielsweise durch hohe p21-Spiegel [83], durch hohe Level an Mdm2, z.B. infolge von ARF-Mutationen, oder durch fehlende post-translationale Modifikation von p53 hervorgerufen werden [82]. Auch der Verlust von p53-Cofaktoren für die Apoptose-Induktion, wie z.B. der ASPP (apoptosis stimulating protein of p53)-Proteinfamilie in vielen Brusttumoren (meist p53-Wildtyp), kann zu einer p53-Resistenz führen [84]. Daher ist es unabdingbar für eine erfolgreiche Tumorthherapie, p53-unabhängige Mechanismen der Apoptose-Induktion zu berücksichtigen, d.h. Gene einzusetzen, die unabhängig vom endogenen p53-Status in der Tumorzelle zur Apoptose führen, um diese Blockade der p53-vermittelten Apoptose zu umgehen.

1.4 Das p53-Familienmitglied p73

Bis vor kurzem galt p53 als einzigartig in seiner Gestalt und Funktion, da keine verwandten Gene bekannt waren. Das änderte sich erst 1997 durch die Entdeckung von p73 [85]. Kurze Zeit später wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander p63 identifiziert, das dritte Mitglied dieser Familie [86]. Alle Mitglieder dieser Protein-Familie zeigen ein hohes Maß an Sequenzhomologie, vor allem in der zentralen DNA-Bindungs-Domäne, der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne und der carboxy-terminalen Oligomerisierungs-Domäne [87]. Damit einhergehend haben diese drei Familienmitglieder auch überlappende funktionelle Eigenschaften als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression der gleichen Gruppen von Genen durch direkte Bindung an ursprünglich als p53-spezifisch identifizierte

Bindungsstellen innerhalb von Promotoren. Die transkriptionelle Aktivierung dieser Zielgene führt zur Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose [88]. Im Gegensatz zu p53 haben p63 und p73 aber auch Bedeutung bei Wachstum und Entwicklung, wie in Knock-out-Mäusen gezeigt werden konnte [88].

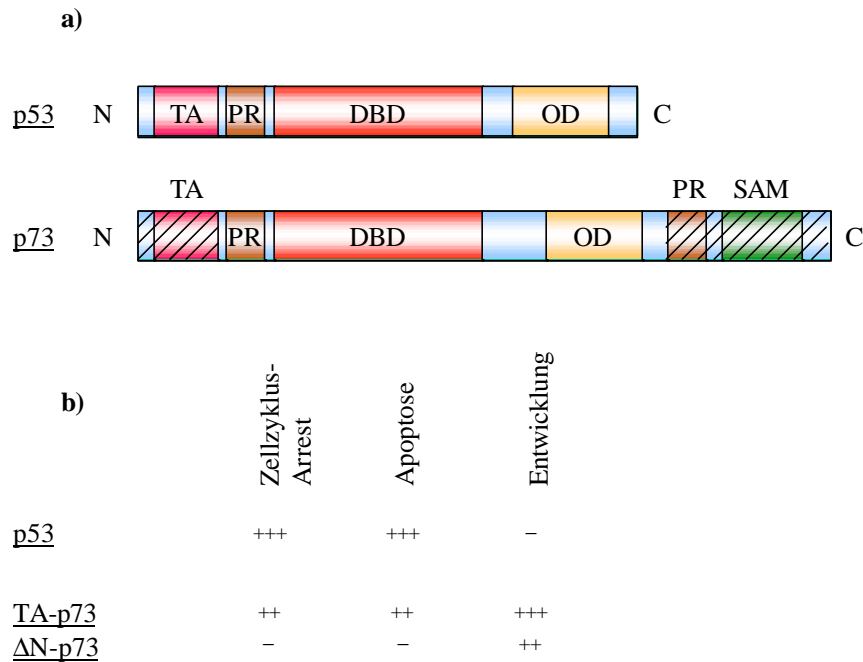


Abb. 1.4.1: Struktur und Funktionen von p53 und p73. a) Die allgemeine Domänenstruktur ist bei p53 und p73 konserviert. Die gestrichelten Linien am C- und am N-Terminus von p73 zeigen an, dass unterschiedliche Isoformen existieren. DBD, DNA-binding domain; OD, oligomerization domain; PR, proline-rich domain; SAM, sterile alpha motif. b) Die Funktionen von p53 und der TA- und ΔN-Isoformen von p73 sind zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Melino et al., p73: friend or foe in tumorigenesis, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) [88].

Im Gegensatz zu p53 führt das TP73-Gen (das für p73 codiert) zur Bildung von mehreren unterschiedlichen mRNAs, die in eine Reihe verschiedener Proteine translatiert werden. Die verschiedenen mRNAs entstehen sowohl durch alternatives Spleißen als auch durch den Gebrauch eines alternativen Promotors [89]. Der größte Teil des alternativen Spleißens findet am 3'-Ende statt und bringt Transkripte hervor, die für Proteine mit unterschiedlichen C-terminalen Strukturen codieren. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten in normalen Zellen mindestens sechs alternativ gespleißte p73 mRNAs identifiziert werden, die α, β, γ, δ, ε und ζ genannt wurden und die TA-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne und die Oligomerisierungsdomäne gemeinsam haben [90]. Während die TA-p73 Isoformen (enthalten die Transaktivierungs(TA)-Domäne) als Transkriptionsfaktoren fungieren, die Zellzyklus-

Arrest und Apoptose induzieren, sind andere Isoformen, denen die N-terminale TA-Domäne fehlt (Δ N-p73 Isoformen), nicht dazu in der Lage, Wachstumsarrest oder Zelltod zu induzieren. Die Δ N Isoformen haben jedoch eine wichtige regulatorische Funktion, da sie einen dominant-negativen Effekt auf p53 und TA-p73 ausüben, indem sie deren Transaktivierungs-Aktivität und damit auch deren Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, blockieren [91]. Sowohl p53 als auch TA-p73 können die Expression der Δ N-p73 Isoformen induzieren. Daraus ergibt sich eine dominant-negative Feedback-Schleife, die die Funktion von p53 und TA-p73 reguliert, in ähnlicher Weise wie die Mdm2-p53 Schleife [91].

Nicht nur p53, auch p73 wird durch DNA-Schädigung aktiviert, und diese Aktivierung ist unabhängig vom p53-Status ausreichend, um Zelltod auszulösen [92-94]. Obwohl der Modus der als Antwort auf DNA-Schädigung erfolgten p73-Aktivierung noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so zeigen die gemachten Beobachtungen doch, dass die pro-apoptotische Aktivität von p73 durch direkte Interaktion mit c-Abl (Abelson leukemia) verstärkt wird und in c-Abl-negativen Zellen verringert ist. Da c-Abl selbst durch ATM (ataxia telangiectasia mutated) phosphoryliert und aktiviert wird, könnte auch ATM an diesem Signalweg beteiligt sein [88,89]. Vor kurzem wurde eine potentielle p53-Bindungsstelle im alternativen Promotor des p73-Gens identifiziert, die responsiv für p53, p73 und DNA-Schädigung ist [95]. Die Aktivierung von p73 nach DNA-Schädigung scheint nicht nur auf der Transkriptionsebene zu erfolgen, sondern auch durch post-translationale Modifikationen. Dabei scheinen unterschiedliche Kinasen daran beteiligt zu sein, abhängig von der Art der Schädigung [88]. Darüber hinaus kann p73 auch durch Onkogene wie z.B. E2F1, c-Myc und E1A aktiviert werden und nachfolgend Zielgene aktivieren, um Apoptose zu induzieren [88,89].

Wie schon erwähnt, können die TA-p73 Isoformen Zellzyklus-Arrest und Apoptose induzieren. Dies geschieht durch Regulierung der Expression von zahlreichen Genen, von denen einige auch p53-Zielgene sind, so z.B. CDKN1A (kodiert für p21^{Cip1/Waf1}), p53R2, PUMA und Bax [85,96-98]. Die transkriptionelle Aktivität von p73 ist jedoch meist schwächer als die von p53 und variiert zudem zwischen den einzelnen Isoformen [85,96,97,99]. Dabei ist β -p73 im Vergleich zu α -p73 häufig der stärkere transkriptionelle Aktivator und dadurch auch effektiver bei der Apoptose-Induktion, wahrscheinlich hervorgerufen durch einen inhibitorischen Effekt der nur in der α -Isoform vorhandenen SAM-Domäne [96,99,100].

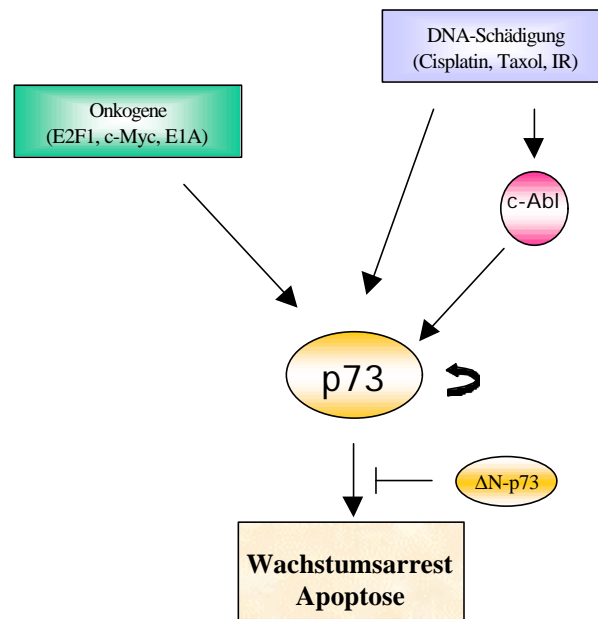


Abb. 1.4.2: Aktivierung und Inhibierung von p73. Abbildung modifiziert nach Stiewe und Pützer., p73 in apoptosis, *Apoptosis* 6 (2001) [89].

Obwohl p73 Tumorsuppressor-Eigenschaften besitzt, ist TP73 im Gegensatz zu TP53 (codiert für p53) nur in einer sehr geringen Zahl von humanen Tumoren mutiert [90]. Daher ist in den meisten Tumorzellen endogenes p73 vorhanden [90]. Der Einsatz von p73 in der Tumorentherapie ist aber aus zwei Gründen dennoch sinnvoll und erfolgversprechend. Erstens war die Aktivierung von Zielgenen und nachfolgend die Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose meist durch eine Überexpression von p73 erzielt worden [86], die man im Rahmen einer Gentherapie ja auch hervorruft. Und zweitens kann p73 auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren, wie mehrfach gezeigt werden konnte [86,88,89], und ist daher besonders dort geeignet, wo Resistenzen gegenüber p53-vermittelter Apoptose bestehen [101].

1.5 Der Transkriptionsfaktor E2F1

Die E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren reguliert die Expression einer Reihe von Genen, die für die DNA-Synthese und die Zellzyklus-Kontrolle am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus benötigt werden [102-105]. Die E2F-Familie besteht aus sechs Mitgliedern (E2F1 bis E2F6), die zum Teil überlappende Zielgene regulieren. Die E2F-Proteine bilden das Endglied eines linearen genetischen Signalweges (des Rb-Weges), innerhalb dessen ihre Aktivität durch Tumorsuppressorproteine wie p53, p16 sowie Rb selbst reguliert wird. Die Tatsache, dass die Gene, die die E2F-Aktivität kontrollieren, die häufigsten genetischen

Veränderungen aufweisen und diese direkt mit dem Auftreten einer Reihe von humanen Tumoren korrelieren [106], zeigt die Bedeutung von E2F für das normale Zellwachstum. Die E2Fs weisen mehrere hoch konservierte Regionen auf, die für funktionelle Domänen kodieren, und verantwortlich sind für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung, Heterodimerisierung, Transaktivierung und die Bindung an die Rb-Proteinfamilie (Rb, p107, p130) [107].

Innerhalb der E2Fs stellt E2F1 den Schlüsselmediator für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus dar [108]. Die Rb-Bindungsregion von E2F1 ist C-terminal gelegen und wird von der Transaktivierungs-Domäne überlappt [109]. Entsprechend seiner Rolle beim G1/S-Phase Übergang, ist die E2F1-Aktivität während des Zellzyklus streng reguliert. In der frühen G1-Phase ist E2F1 nur in sehr geringem Maße exprimiert [109]. Dabei wird die E2F-abhängige Transaktivierung von Zielgenen durch Interaktion mit hypophosphoryliertem Rb inhibiert [110]. In der späten G1-Phase kommt es zur Induktion der E2F1 Transkription und zeitgleich zur Akkumulation des E2F1 Genproduktes [111]. Damit einhergehend führt die Inaktivierung von Rb durch Phosphorylierung zur Dissoziation des E2F1/Rb-Komplexes und zur Freisetzung und damit Aktivierung von E2F1. Dies hat den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zur Folge [107].

Obwohl E2F1 ein starker wachstumsfördernder Transkriptionsfaktor ist, haben Studien mit Knockout-Mäusen gezeigt, dass E2F1 auch Tumorsuppressor-Funktionen besitzt. Bei den E2F1^{-/-} Mäusen resultierte die Deletion des E2F1 Gens in einer verminderten Apoptose-Funktion bei deutlich erhöhter Tumorzinzidenz als Hinweis für die entscheidende Rolle von E2F1 bei der Hemmung der Zellproliferation [112]. Die Rolle von E2F1 als Tumorsuppressor beruht auf seiner Fähigkeit, bei deregulierter Expression Apoptose induzieren zu können [108,113]. Auch *in vivo* führt die ektope Expression des E2F1-Proteins zur Induktion von Apoptose und zur Tumorsuppression, wie unter anderem durch adenoviralen Gentransfer in subkutane Gliome im Nacktmausmodell gezeigt werden konnte [114].

Es konnten mehrere unterschiedliche Mechanismen identifiziert werden, die bei der durch Expression von E2F1 hervorgerufenen Apoptose eine Rolle spielen. Einer dieser Mechanismen der E2F1-induzierten Apoptose schließt das Tumorsuppressorprotein p53 mit ein [108]. Dabei aktiviert E2F1 im ersten Schritt die Transkription des Tumorsuppressorproteins p14ARF [115]. Dies führt durch die direkte Assoziation von ARF mit dem p53-Inhibitor Mdm2 zu einer Akkumulation des p53-Proteins, da die Interaktion von ARF und Mdm2 die durch Mdm2 vermittelte Degradation von p53 verhindert [107]. Somit führt die E2F1-vermittelte Induktion

von ARF auf indirektem Weg zu einer Akkumulation von p53 und daraus folgend zu einem Anstieg der Expression von p53-Zielgenen, was letztendlich die Einleitung von Apoptose zur Folge hat [107].

Aber E2F1 kann auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren, wie in p53-negativen oder p53-mutierten Zelllinien gezeigt werden konnte. Dabei wurde von unserer Arbeitsgruppe gefunden, dass p73 an der Induktion von E2F1-vermittelter Apoptose beteiligt ist [116]. Anders als bei p53 wird der p73-Promotor direkt von E2F1 aktiviert. Die nachfolgende Expression von p73 führt zu einer Hochregulierung von p53-Familien Zielgenen, die in Zelltod resultiert [116]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der p73-Funktion die Fähigkeit von E2F1, Apoptose zu induzieren, signifikant reduziert [107]. Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) ein direktes transkriptionelles Ziel von E2F1 ist und dass auch der E2F1/Apaf-1 Signalweg unabhängig von p53 ist [117,118]. Die durch E2F1 induzierten erhöhten Apaf-1 Proteinlevel resultieren dann ohne mitochondriale Schädigung in einer direkten Aktivierung von Caspase-9, was zu einer Initiation der Caspase-Kaskade und damit zu Apoptose führt [118].

Es ist schon länger bekannt, dass neben dem E2F1-Volllängenprotein auch eine E2F1-Mutante, der die Transaktivierungs-Domäne fehlt, in der Lage ist, Apoptose zu induzieren [119]. Hieraus wurde geschlossen, dass es auch Mechanismen für die E2F1-induzierte Apoptose geben muss, die unabhängig von der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen sind. Neben der Aktivierung pro-apoptotischer Faktoren kann E2F1 auch durch Inhibierung von anti-apoptotischen Signalen Apoptose induzieren [120]. Dies geschieht aber nicht auf dem Weg der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen: Zum einen kann E2F1 durch direkte Bindung an die p65-Untereinheit von NF- κ B dessen anti-apoptotische Aktivität inhibieren [121]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass E2F1 die Expression von Mcl-1, eines anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds, stark reprimiert, was ebenfalls zur Induktion von Apoptose führt. Diese transkriptionelle Repression erfolgt durch direkte Bindung von E2F1 an den Mcl-1 Promotor, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, und ist nur abhängig von der DNA-Bindungsdomäne von E2F1, nicht jedoch von der Transaktivierungsdomäne [122].

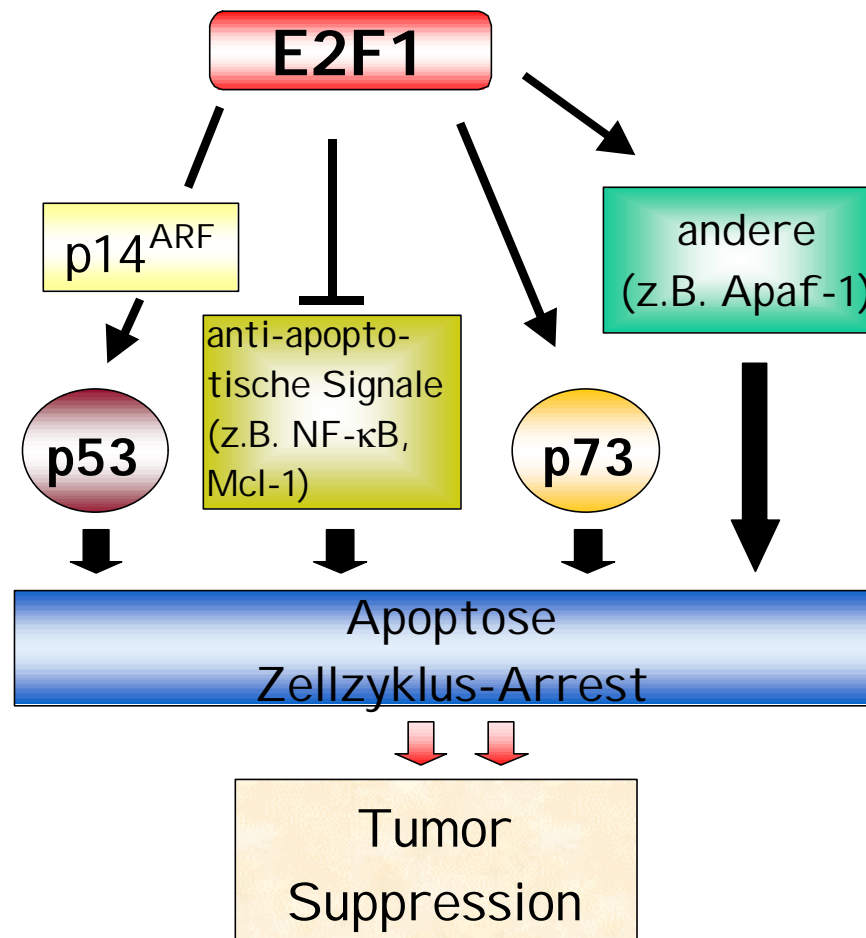


Abb. 1.5.1: Darstellung der E2F1-Apoptose-Signalwege. Abbildung modifiziert nach Soengas und Lowe, p53 and p73: seeing double?, *Nat. Gen.* 26 (2000).

Die Relevanz von E2F1 für die Tumor-Gentherapie ergibt sich dadurch, dass es Tumorsuppressorfunktion besitzt und unter den Bedingungen einer deregulierten (verstärkten) Aktivierung Apoptose induzieren kann. Darüber hinaus kann die E2F1-vermittelte Apoptose über verschiedene Mechanismen ablaufen und ist unabhängig von funktionellem p53. Daher kann E2F1 auch bei Tumoren eingesetzt werden, die eine Resistenz gegenüber p53-vermittelter Apoptose besitzen.

1.6 Tumor-Immuntherapie

Neben dem Einbringen von Tumorsuppressor-Genen stellt die Immuntherapie einen weiteren vielversprechenden Ansatz in der Tumor-Gentherapie dar. Ziel der immunologischen Intervention bei Tumoren ist die Stimulierung von antitumoralen Immuneffektorzellen durch

Transfer immunologisch aktiver Proteine (z.B. Zytokine) in die Tumorzellen. Dadurch soll eine gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion induziert werden, mit dem Ziel, den Primärtumor zurückzubilden und eine protektive Immunität gegenüber residuellen Tumorzellen oder Metastasen zu vermitteln.

Die Immunüberwachung durch Effektorzellen des Immunsystems ist hauptsächlich verantwortlich für die Abwehr von neoplastischen Zellen. Da einige Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen und in immunkompetenten Wirten zu proliferieren, scheinen die Immunmechanismen, die zu einer Entdeckung und Eliminierung von bösartigen Zellen führen, ungenügend zu sein [123]. Die wichtigsten Antitumor-Effektorzellen sind die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [124]. Die Funktion dieser Effektorzellen wird von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (Major Histocompatibility Complex I, MHC I)-Molekülen kontrolliert. Die meisten Tumoren exprimieren auf der Zelloberfläche Peptid-Antigene in Assoziation mit MHC I-Molekülen, sodass Immuneffektorzellen in der Lage sein sollten, zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden [125]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass viele Tumorantigene von Antitumor-Effektorzellen erkannt werden, haben Tumorzellen Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, der Entdeckung durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen [126]. So zeichnen sich einige Tumoren im Vergleich zur Normalzelle durch eine verminderte Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche aus [127], wodurch es zur mangelhaften Tumorantigen-Präsentation und zum Ausbleiben der Immunantwort durch CTLs kommt. Andere Tumoren entziehen sich einer Immunantwort durch eine verminderte (z.B. Pankreastumoren) oder völlig fehlende Expression der Tumor-assoziierten Antigene. Die Aktivität der Immuneffektorzellen, die eine Hemmung des Tumorwachstums vermitteln, wird vor allem durch lösliche Zytokine reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass immunmodulatorische Zytokine, wenn sie von den Tumorzellen selbst freigesetzt werden, die Entwicklung einer tumorzellspezifischen protektiven Immunantwort fördern [128-130]. Eine Antitumor-Aktivität konnte nach einer Tumorzell-Transduktion mit Interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-18, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- β und IFN- γ gezeigt werden [131-141]. Zudem wurde eine systemische Immunität mit IL-2, IL-6, IL-7, IL-12 und IL-18 beobachtet.

Jedoch werden die immunologischen Mechanismen, die zu einer Rückbildung von Tumoren nach einem Zytokin-Genstransfer führen, nicht nur durch das verwendete Zytokin, sondern auch

durch das Tumormodell beeinflusst. Tumorzellen können durch Unterschiede in der Oberflächenmolekül-Expression, der Wachstumskinetik und der Immunogenität in der Anfälligkeit für Effektormechanismen des Wirtes variieren [142]. Daher muss für jedes Tumormodell das geeignete Zytokin ermittelt werden.

1.6.1 Interleukin-12 (IL-12) in der Tumor-Immuntherapie

Von den bisher in der Tumor-Immuntherapie verwendeten Zytokinen besitzt Interleukin-12 (IL-12) eine besonders starke antitumorale Wirksamkeit [143-145]. IL-12 ist ein heterodimeres Molekül, bestehend aus zwei Untereinheiten, p35 und p40, die kovalent gebunden sind. Nur die Coexpression beider Untereinheiten-cDNAs ergibt ein biologisch aktives Protein [146]. Es ist ein immunstimulierendes Protein, das zuerst beschrieben wurde für seine Fähigkeit, $CD8^+$ -T-Zellen zu stimulieren und die Interferon (IFN)- γ Produktion von NK-Zellen anzuregen, weshalb es auch NKSF (natural killer cell stimulatory factor) genannt wird [146-148]. Inzwischen ist bekannt, dass IL-12 normalerweise von aktivierten Monozyten-Makrophagen und B-Lymphozyten, aber auch von Dendritischen Zellen produziert wird. Rezeptoren für IL-12 werden auf aktivierten $CD56^+$ -NK-Zellen und aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert [147,148].

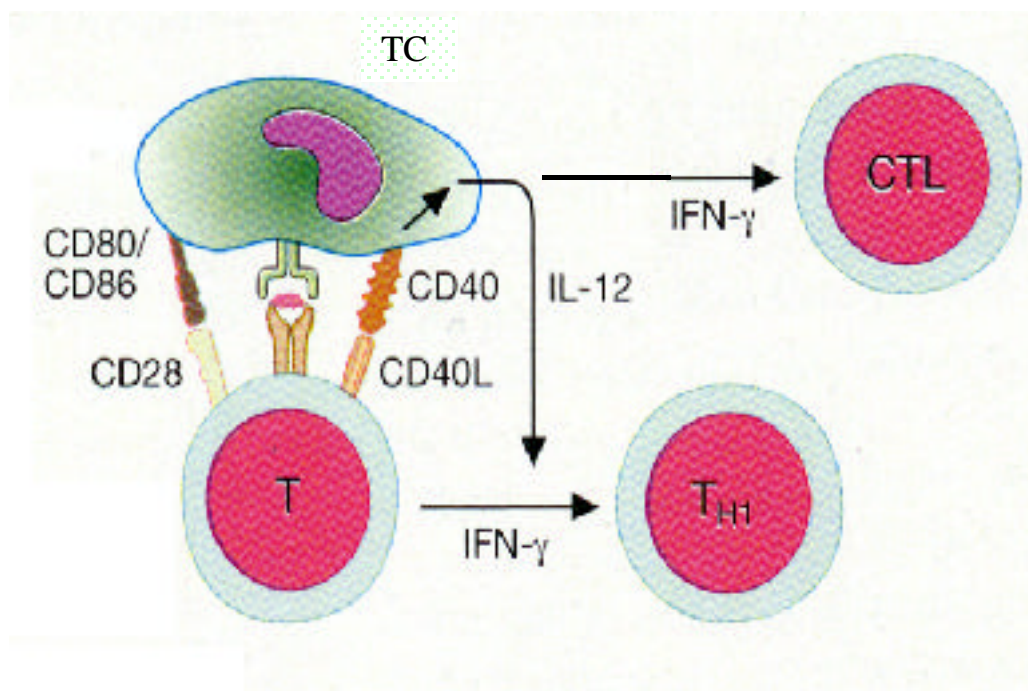


Abb. 1.6.1.1: Darstellung der durch IL12 vermittelten T-Zell-Stimulation. TC: Tumorzelle; CD80: B7.1; T: T-Zelle; TH1: T-Helferzelle; CTL: zytotoxische T-Lymphozyten.

Die biologischen Effekte von IL-12 sind vielfältig. IL-12 bindet an seine Rezeptoren auf aktivierten NK- und T-Zellen, regt diese Zellen zur Proliferation an, erhöht deren lytische Aktivität und stimuliert diese Zellen zur Produktion hoher IFN- γ Level. Durch IL-12 wird die NK-Zell-Zytotoxizität gegen Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen und Antikörper-tragende Zielzellen gesteigert. Außerdem fördert IL-12 die selektive Reifung von aktivierten CD4⁺-T-Zellen zu Helfer-Effektor-Zellen (Th1) und von aktivierten CD8⁺-T-Zellen zu CTLs. So ist IL-12 der entscheidende Initiator der zellvermittelten Immunität, indem es eine protektive Th1-Antwort des Immunsystems bei einer Primärinfektion herbeiführt [137,147-152].

Die oben genannten Eigenschaften von Interleukin-12 haben es zu einem für die Tumor-Immuntherapie hochinteressanten Forschungsobjekt gemacht. Dabei zeigte sich sowohl bei der Injektion von rekombinantem IL-12 als auch bei der IL-12-Gentherapie die Ausbildung von antitumoralen Immunantworten in vielen verschiedenen Maus-Tumormodellen [148,151,155,156]. Die von IL-12 vermittelte Tumorregression und teilweise auch anti-metastatische Wirksamkeit beruhte dabei abhängig vom Tumormodell auf unterschiedlichen Mechanismen. Die Depletion von CD8⁺-T-Zellen oder sowohl CD8⁺-T-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen war in den meisten Fällen für eine Unterdrückung der antitumoralen Effekte von IL-12 erforderlich. Dagegen hatte eine Depletion von CD4⁺-T-Zellen und NK-Zellen meistens nur geringe Auswirkungen. CD4⁺-T-Zellen sind nur in wenigen Tumormodellen für die therapeutische Wirksamkeit von IL-12 notwendig, und scheinen in manchen Modellen sogar die Wirksamkeit eher zu verringern. NK-Zellen scheinen dagegen vor allem in weniger immunogenen Tumormodellen eine wichtige Rolle zu spielen. In allen untersuchten Tumormodellen war die antitumorale Wirksamkeit von IL-12 zumindest zum Teil durch IFN- γ vermittelt, jedoch ist die IFN- γ -Produktion nicht der einzige Antitumor-Mechanismus [148,156]. Allerdings zeigte sich in einigen Tumormodellen, dass die durch IL-12 vermittelte Tumorregression zeitlich begrenzt war und die Tumoren nicht vollständig zurückgebildet wurden und es somit nur zu einer Tumorstillstandsvorgängerung kam. Außerdem wurde die Experimente in transplantierten Tumoren durchgeführt, und die antitumorale Wirksamkeit von IL-12 könnte in natürlich gewachsenen (primären) Tumoren geringer sein [148,156,157].

Erste klinische Studien mit IL-12 mussten in der Phase II abgebrochen werden, da sich zum Teil schwere toxische Reaktionen in den Patienten zeigten. Auch in Tiermodellen hatte IL-12 in einigen Fällen starke Toxizität gezeigt. Nach einer Unterbrechung von mehreren Jahren wird IL-12 neuerdings aber wieder in klinischen Studien eingesetzt [156,158]. Um die Wirksamkeit

von IL-12 zu erhöhen und die durch IL-12 verursachte Toxizität zu vermindern, wurde die Wirksamkeit von IL-12 in Kombination mit anderen antitumoralen Mediatoren in Tierversuchen getestet. Dabei ergaben sich einige vielversprechende Kombinationen, die eine verminderte Toxizität und synergistische Effekte in der Tumorbekämpfung zeigten [148, 156].

1.6.2 Der Costimulator B7.1 (CD80) in der Tumor-Immuntherapie

B7.1 (auch CD 80 genannt) ist ein stark glykosylierter, membrangebundener Ligand, der auf Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APCs) wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) exprimiert wird. Die Rezeptoren für dieses Molekül, CD28 und CTLA-4 (CD152), sind hauptsächlich auf T-Lymphozyten zu finden [159], aber CD28 wird auch auf murinen und humanen natürlichen Killer (NK)-Zellen exprimiert. Die Rezeptoren sind an der Aktivierung dieser Zellen beteiligt [160,161].

Die Immunantwort auf der T-Zell-Ebene ist abhängig von costimulierenden Molekülen, die zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation vorhanden sein müssen. So entwickeln T-Zellen eine Toleranz gegenüber Antigenen auf Tumorzellen, denen costimulierende Moleküle wie B7.1 fehlen. Auf diese Weise können sich Tumorzellen einer Erkennung durch das Immunsystem durch die Induktion einer T-Zell-Anergie entziehen [162]. Zur Aktivierung von T-Zellen sind zwei Signale erforderlich: 1.) Die Erkennung des Antigens in Assoziation mit MHC-Molekülen durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR), und 2.) die Interaktion von costimulierenden Molekülen (z.B. B7.1) auf der Antigen-präsentierenden Zelle mit ihren natürlichen Liganden (CD28 und CTLA-4 bei B7.1, s.o.) auf der T-Zelle, die man als Costimulation bezeichnet [163,164]. Die Bindung des TCR an das im Komplex mit MHC gebundene Antigen führt zur Induktion von Signalwegen, die zur T-Zell-Proliferation führen, während die Bindung an costimulierende Moleküle zur verstärkten Expression von Zytokinen führt, die für die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation erforderlich sind. In der Abwesenheit von geeigneten costimulierenden Molekülen führt eine alleinige T-Zell-Rezeptor-Antwort zur Anergie (d.h. zur Toleranz der Antigen-präsentierenden Zelle und zum Verlust der für die Tumor-Eliminierung erforderlichen T-Zellfunktionen) oder sogar zur Apoptose der Antigen-spezifischen T-Zelle [162,164].

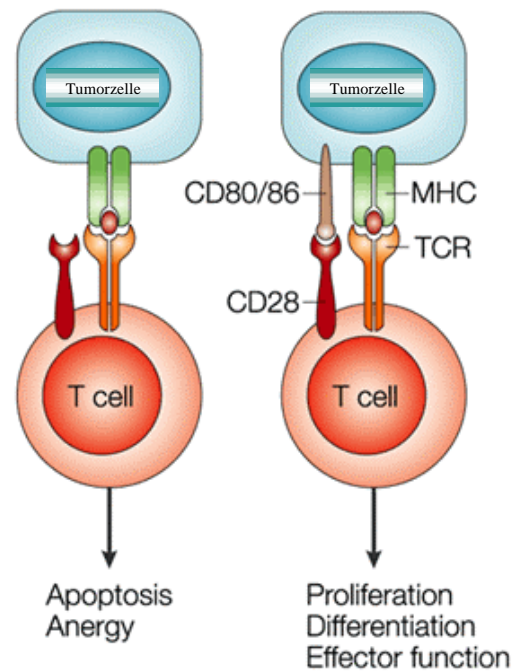


Abb. 1.6.2.1: Darstellung der B7.1-Costimulation. Darstellung modifiziert nach Alegre et al., T-cell regulation by CD28 and CTLA-4, *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001).

Die Analyse einer Vielzahl von humanen Tumoren auf eine endogene B7-Expression ergab einen Mangel an B7 bei den meisten der untersuchten Tumoren [165]. Das lässt darauf schließen, dass ein Mangel an B7-Molekülen bei vielen Tumoren zu deren schlechter Immunogenität beitragen könnte. Eine Reihe von Studien zeigte, dass die Transfektion von B7.1 in Maus-Tumorzelllinien eine Antitumor-Immunität induzieren kann, transfizierte Tumoren wurden *in vivo* abgestoßen [157,165]. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Wirksamkeit von B7.1 von der Immunogenität des verwendeten Tumormodells abhängt [166]. Der Mechanismus der von B7.1 hervorgerufenen antitumoralen Immunogenität beruht zum Teil auf der Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen durch die erfolgte Costimulation. Allerdings wird für diese Aktivierung zum einen eine intakte Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen auf der Tumorzelle benötigt (ist bei Tumoren häufig fehlerhaft), und zum anderen professionelle APCs [165]. Daher müssen vor allem bei nicht-immunogenen Tumormodellen andere B7.1-Rezeptor-tragende Immuneffektorzellen wie NK-Zellen am Abtöten von B7.1-positiven, aber nicht B7.1-negativen Tumorzellen beteiligt sein. Das konnte für einige

Tumormodelle gezeigt werden [160,161,167,168]. Durch die Aktivierung von NK-Zellen, die dann Tumorzellen vernichten, kann B7.1 die Verfügbarkeit von Tumorantigenen für die Aufnahme durch professionelle APCs erhöhen. Diese wiederum sind dann in der Lage, eine T-Lymphozyten-abhängige Antitumor-Immunantwort einzuleiten [169].

Wie B7.1, so wird auch B7.2 (CD86), ein Homolog von B7.1, auf den meisten APCs bei einer Aktivierung hochreguliert [164]. B7.1 und B7.2 binden an die gleichen Rezeptoren und scheinen überwiegend überlappende Funktionen zu besitzen [170]. In der Tumor-Immuntherapie hat sich jedoch gezeigt, dass B7.1 im Vergleich zu B7.2 die größere Wirksamkeit besitzt, wahrscheinlich bedingt durch Unterschiede in der Regulierung von Effektor-T-Zell-Antworten [171-174], und daher als Costimulator das größere Potential besitzt.

1.6.3 Kombination von IL-12 und B7.1 in der Tumor-Immuntherapie

Die Tumor-Immuntherapie mit einem einzelnen immunmodulierenden Gen führt nicht immer zu einer ausreichenden Antitumor-Immunantwort. Aus diesem Grund werden vielfach Kombinationen dieser Gene eingesetzt.

Die Wirksamkeit von Genkombinationen mit B7.1 hängt sowohl vom verwendeten Zytokin als auch vom Tumormodell ab [175-178]. Die Kombination von B7.1 und IL-12 ist schon in einer ganzen Reihe von Maus-Tumormodellen verwendet worden und hat sich meist als sehr wirksam erwiesen [175,176,179-183]. Dabei agierten IL-12 und B7.1 synergistisch in der Verhinderung einer Tumorbildung oder der Regression bereits bestehender Tumoren. Allerdings gab es Unterschiede zwischen den einzelnen Tumormodellen. Die Kombination von IL-12 und B7.1 war aber im Vergleich zu IL-12 oder B7.1 allein in allen Fällen effektiver [175,176,179-183].

Entscheidend für den Erfolg der Kombinationstherapie war dabei scheinbar die Art der induzierten Immunantwort. Bei einer alleinigen Aktivierung von NK-Zellen kam es zu keiner protektiven Immunität, wohingegen die Beteiligung von T-Lymphozyten zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses führte [176]. Die induzierten Immuneffektor-Mechanismen hingen dabei vom verwendeten Tumormodell ab [176,183]. Bei den mit Adenovirus-Vektoren durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die kombinierte therapeutische Wirksamkeit von IL-12 und B7.1 stärker ist, wenn beide von der gleichen Tumorzelle exprimiert werden. Daher ist für eine Tumorthherapie die Applikation eines IL-12/B7.1-Kombinationsvirus, das

beide Gene enthält, effektiver als die Koinjektion zweier verschiedener Adenovirus-Vektoren, die entweder IL-12 oder B7.1 exprimieren [175]. Die bisher durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass Tumorzellen, die sowohl B7.1 als auch IL-12 exprimieren, in der Lage sind, unterdrückte Tumor-reaktive T-Lymphozyten zu reaktivieren und so eine effektive antitumorale Immunantwort zu induzieren [157].

1.7 Adenoviren als Gentherapie-Vektoren

Adenoviren wurden in den letzten vier Jahrzehnten nach ihrer erstmaligen Isolierung ausgiebig charakterisiert. Es handelt sich um hüllenlose DNA-Viren. Das adenovirale Genom ist ein linearer Doppelstrang von etwa 36 Kilobasen-Paaren (kb) und umfasst die frühen Regionen E1 bis E4, die für regulatorische Proteine kodieren, und die alternativ gespleißte späte Region, bestehend aus den fünf Transkripten L1 bis L5. An beiden Enden des Genoms befindet sich eine inverse terminale Repetition (ITR), die regulatorische Sequenzen enthält und für die DNA-Replikation von Bedeutung ist. Die Proteine der E1-Region sind an der Expression der anderen frühen und späten Gene beteiligt und regulieren die Wirtszell- und virale RNA- und Proteinsynthese. Durch Entfernen der E1-Region werden die Viren replikationsdefekt [184]. Die von der E2-Region kodierten Proteine sind für die DNA-Replikation notwendig. Die E3-Genprodukte sind in virale Mechanismen involviert, die es der Virus-infizierten Zelle erlauben, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. E4-kodierte Proteine kontrollieren die Virus-Transkription und sind für die DNA-Replikation und Abschaltung der zellulären Proteinsynthese von Bedeutung. Die späte Region wird nach Beginn der DNA-Replikation exprimiert und kodiert für die Strukturproteine des Cores und des Kapsids sowie für Proteine, die für den Zusammenbau der Virionen benötigt werden.

Adenoviren haben eine große Bedeutung gewonnen als Vektoren für den Transfer von fremden Genen in Säugetierzellen im Rahmen einer Gentherapie. Sie haben den Vorteil, dass sie biochemisch und genetisch gut charakterisiert sind, sie sind leicht zu manipulieren und sie können zu hohen Titern hochgezogen werden [185]. Adenoviren, die durch die Deletion der E1-Region replikations-defekt gemacht worden sind, können in E1-exprimierenden 293 Zellen vermehrt werden [184], und durch das Entfernen von weiteren nicht-essentiellen Regionen kann die Klonierungs-Kapazität weiter gesteigert werden. In E1/E3 deletierte adenovirale Vektoren können bis zu 8 kb fremde DNA inseriert werden [184]. Zudem können Adenoviren viele verschiedene Zelltypen infizieren und sowohl replizierende als auch nicht-replizierende

Zellen transduzieren [186,187]. Außerdem konnten Adenoviren bisher mit keiner neoplastischen Erkrankung in Verbindung gebracht werden und verursachen normalerweise nur relativ mild verlaufende, selbstlimitierende Infektionen in immunkompetenten Individuen. Im Gegensatz zu Retroviren kommt es bei adenoviralen Vektoren nur ausgesprochen selten zur stabilen Integration ins zelluläre Genom, wodurch hiermit verbundene mutagene Effekte weitgehend auszuschließen sind.

Ein Nachteil der Adenovirus-Vektoren der ersten und zweiten Generation, die noch eine Reihe viraler Gene enthalten, ist die aufgrund der Expression dieser Gene nachgewiesene Induktion einer zellulären und humoralen Immunreaktion gegen die adenoviralen Proteine und die transduzierte Zelle [188,189]. Das Virus verbleibt nach intratumoraler Applikation nicht lokal begrenzt nur im Bereich der Injektionsstelle, sondern etwa ein Drittel des Vektors infizieren auch andere Gewebe und Organe [190], wobei vornehmlich die Leber betroffen ist. Daher kann die Expression der viralen Proteine, neben der Tatsache, dass sie lebertoxisch wirken, auch die Expression der therapeutischen Gene limitieren [189]. Eine Alternative stellen Helfervirus-abhängige (helper dependent, HD) Adenovirus-Vektoren dar, bei denen alle kodierenden Sequenzen des adenoviralen Genoms deletiert sind [191]. Bei diesem System liefert ein

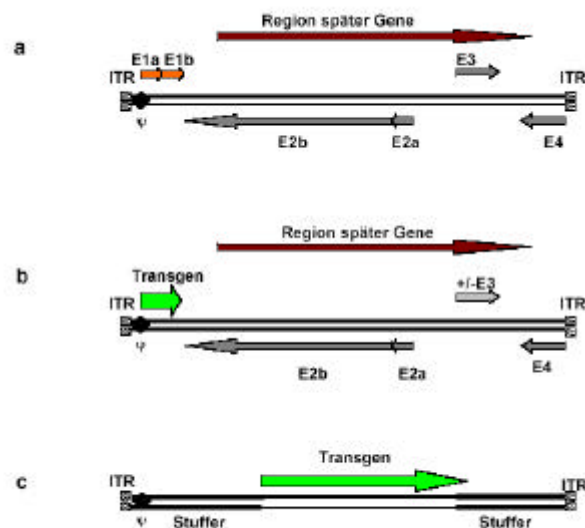


Abb. 1.7.1: Schematische Darstellung von Adenoviren. a) Unmodifiziertes Wildtyp-Adenovirus. b) Erstgenerations-Adenovirus-Vektor mit Transgen in deletierter E1-Region. c) Drittgenerations-Adenovirus-Vektor mit Transgen und Stuffersequenzen, aber ohne kodierende Adenovirusgenom-Sequenzen. Darstellung modifiziert nach Robbins et al., Viral vectors for gene therapy, *Trends Biotechnol.* 16 (1998).

Helfervirus *in trans* alle Proteine, die notwendig sind für die Verpackung des Vektors. Der Vektor selbst enthält nur die für die Virusreplikation erforderlichen *cis*-Elemente wie die ITRs und das Verpackungssignal. Unter mithilfe der Cre-Rekombinase wird dabei die Verpackung des Helfervirus verhindert. Nur der das Verpackungssignal enthaltende und für das Transgen kodierende Vektor wird in infektiöse Virionen verpackt [192,193]. Der Vorteil dieser Vektoren ist die hohe Klonierungskapazität (bis zu 37 kb), die höhere Sicherheit und die geringere Immunogenität. HD-Adenovirus-Vektoren zeigen in einer Reihe von Tiermodellen hervorragende Genexpressionsprofile bei reduzierter Toxizität nach systemischer Vektorgabe [194].

Als Transportsystem für therapeutische Fremdgene in Säugerzellen stellen adenovirale Vektoren der ersten und dritten („gutless“-Vektoren) Generation das derzeit effizienteste Gentransfersystem sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* dar und sind damit sehr attraktiv für die Tumorthherapie [195].

1.8 Problemstellung und Zielsetzung

Die gegenwärtig verfügbaren Therapien für die Behandlung des Pankreaskarzinoms wie chirurgische Resektion und Chemo- und Strahlentherapie haben nur palliative Wirkung und führen nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der Überlebenszeit. Daher sind neue, alternative Therapiestrategien dringend erforderlich.

I.) Ein möglicher Ansatz basiert auf der Annahme, dass es sich bei Malignomen um die abnorme Akkumulation von Zellen handelt, die aus dem verminderten Absterben der Zellen resultiert, das durch die Störung von Tumorsuppressorfunktionen hervorgerufen wird. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der adenovirale Gentransfer verschiedener Tumorsuppressoren in humane Pankreastumorzelllinien und etablierte Pankreas-Tumoren durchgeführt und untersucht werden, ob daraus resultierend eine Apoptose-Induktion erfolgt.

- (1) Entwicklung der α -p73- und β -p73-exprimierenden Ad-Vektoren: Vektorkonstruktion durch Verwendung des AdEasy-Systems und *in vivo* Rekombination in 293 Zellen (p53- und E2F1-exprimierende Ad-Vektoren waren bereits vorhanden)
- (2) Austestung und Vergleich der tumorsupprimierenden Wirkung von p53 und p73 im Pankreastumormodell
- (3) Austestung der tumorsupprimierenden Wirkung von E2F1 im Pankreastumormodell, allein und in Kombination mit dem gegenwärtig in der Klinik gebräuchlichsten Chemotherapeutikum Gemcitabine

II.) Ein weiterer Ansatz beruht auf der Tatsache, dass Tumorzellen durch das Immunsystem nicht effizient detektiert und eliminiert werden können. Dies geschieht meist durch die fehlende Fähigkeit des im Komplex mit MHC-Molekülen gebundenen Antigens, eine adäquate T-Zell-Proliferation zu induzieren. Daher sollte als weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit der selektive adenovirale Transfer eines immunstimulierenden Zytokins (IL-12) und eines costimulierenden Moleküls (B7.1) in etablierte Pankreastumoren durchgeführt werden und die therapeutische Wirksamkeit untersucht werden.

- (4) Untersuchung der therapeutischen Effizienz des AdIL-12/B7.1-Vektors im Maus-Pankreastumormodell und der zugrundeliegenden Immuneffektormechanismen

Um eine Aussage über die Wirksamkeit von IL-12 und B7.1 in klinisch relevanten, nicht-transplantierten Tumoren machen zu können, wurde AdIL-12/B7.1 auch bei der Behandlung von primären Tumoren in Murmeltieren eingesetzt.

- (5) Untersuchung der therapeutischen Effizienz des AdIL-12/B7.1-Vektors in primären Tumoren (hepatozelluläre Karzinome im Murmeltier-Modell) und der zugrundeliegenden Immuneffektormechanismen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

<u>AsPC-1</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen Pankreasadenokarzinom; ATCC CRL 1682
<u>Capan-1</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen Pankreasadenokarzinom; ATCC HTB 79
<u>Capan-2</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen Pankreasadenokarzinom; ATCC HTB 80
<u>MZA</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen Pankreasadenokarzinom; zur Verfügung gestellt von David E. Smith (Mayo Clinic, Rochester, USA)
<u>Pan02</u>	etablierte Zelllinie aus einem murinen Pankreasadenokarzinom; 506852; NCI-Frederick Cancer Research Facility
<u>293</u>	mit Ad5-E1A stabil transformierte menschliche embryonale Nierenzellen; Microbix Biosystems Inc. (Toronto, Kanada)
<u>H1299</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom; zur Verfügung gestellt von B. Opalka (Innere Tumorklinik, Essen)
<u>MCF-7</u>	etablierte Zelllinie aus einem humanen Mammakarzinom; ATCC HTB 22; ATCC (Rockville, USA)
<u>WH12/6</u>	etablierte Zelllinie aus Murmeltier-Leberzellen

2.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> (Gibco BRL, Eggenstein)
<i>E. coli</i> XL2-Blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Die Genbezeichnungen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* [196].

2.1.3 Plasmide

pAdEasy1	zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA
pShuttle CMV	zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, USA
pcDNA α -p73	zur Verfügung gestellt von G. Melino, Rom, Italien
pcDNA β -p73	zur Verfügung gestellt von G. Melino, Rom, Italien

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primär-Antikörper:

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft
E2F1	sc-251 (KH95)	Santa Cruz, Kalifornien, USA
p73	# 558785 (ER-15)	PharMingen, Kalifornien, USA
p53	OP43 (Ab-6, DO-1)	Oncogene, Kalifornien, USA
p53 Ser46	# 2521S	Cell Signaling, Massachusetts, USA
B7.1 (FITC-konjugiert)	# 09604D (16-10A1)	PharMingen, Kalifornien, USA

2.1.4.2 Sekundär-Antikörper (Peroxidase-konjugiert):

Anti-Mouse Ig, HRP-linked (NA 931)	Amersham, Braunschweig
Anti-Rabbit Ig, HRP-linked (NA 934)	Amersham, Braunschweig
Anti-Mouse Ig, Alexa Fluor 546	Molecular Probes, Eugene, USA

2.1.5 Versuchstiere

nu/nu (Nackt)-Mäuse: Die Tiere stammten aus dem Zentralen Tierlabor der Universität von Essen.

C57BL/6 Mäuse: Die Tiere stammten aus den Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland.

Murmeeltiere (*Marmota monax*): Die Tiere wurden von Marmotech, Inc., Ithaca, NY, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Zellkultur (Medien, Lösungen und Seren)

DMEM	GibcoLifetechnologies, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	Seromed Biochrom KG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäure 100x MEM	GibcoLifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B (250 μ g/ml)	GibcoLifetechnologies, Eggenstein

Das FCS wurde vor Gebrauch 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

Trypsin-Lösung: 0,5 M EDTA

	2 g/l Trypsin
Glutamin-Lösung:	200 mM L-Glutamin (Merck, Darmstadt)
P/S-Lösung:	25000 U/ml Penicillin G (Hoechst, Frankfurt/Main) 25 mg/ml Streptomycinsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
PBS ⁻ :	127 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄
HBS-Puffer:	20 mM HEPES 135 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 5,5 mM Glukose pH 7,1
CaCl ₂ -Lösung:	2,5 M CaCl ₂
Cytomix:	120 mM KCl 150 µM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 25 mM HEPES, pH 7,6 2 mM EGTA, pH 7,6 1 mM MgCl ₂ , pH 7,6 2 mM ATP, pH 7,6 5 mM Gluthation (reduziert) 10% (v/v) FCS

Alle Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert.

10% FCS-DMEM Medium:	450 ml DMEM 50 ml FCS 2 ml P/S-Lösung 5 ml Glutamin-Lösung 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 2 ml Amphotericin B
----------------------	--

4-Hydroxy-Tamoxifen-Lsg.: 1 mM in Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.1.7 Medien und Lösungen für Bakterienarbeiten

LB-Medium:	10 g Pepton (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 10 g NaCl (Merck, Darmstadt) 5 g Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ad 1 Liter mit H ₂ O pH auf 7,5 eingestellt, autoklaviert
------------	---

SB-Medium:	80 g LB-Premix (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 88 g Trypton (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 60 g Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 4 g Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim) 20 ml 1 M NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim) ad 4 Liter mit H ₂ O, autoklaviert
Ampicillin-Lösung:	50 mg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim) steril filtriert. Je 2 µl Lösung pro ml LB-/SB-Medium.
Kanamycin-Lösung:	50 mg/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich, Steinheim) steril filtriert. Je 2 µl Lösung pro ml LB-/SB-Medium.
Glycerin-Lösung:	Glycerin (wasserfrei, Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst zu 86% (v/v) in Wasser, autoklaviert
S1-Lösung:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
S2-Lösung:	0,2 M NaOH 1,0% SDS
S3-Lösung:	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
N2-Lösung:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ 900 mM KCl 15% Ethanol 0,15% Triton-X 100 pH 6,3
N3-Lösung:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ 1,15 M KCl 15% Ethanol pH 6,3
N5-Lösung:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ 1 M KCl 15% Ethanol pH 8,5

Diese Lösungen (S1, S2, S3, N2, N3, N5) waren als Fertiglösungen von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Düren im Labor vorrätig.

- Isopropanol, Merck, Darmstadt
- 1,22 M β-Mercaptoethanol, Stratagene, La Jolla, CA, USA
- 70% (v/v) Ethanol: Ethanol (Merck, Darmstadt) in Wasser

- Nucleobond AX 500 Säulen, Macherney-Nagel GmbH & Co KG, Düren

2.1.8 Nukleinsäurearbeiten

2.1.8.1 Lösungen, Puffer und Mixe

- 50x TAE-Lösung: 2 M Tris-Acetat (Serva GmbH, Heidelberg)
50 mM EDTA, pH 8,0 (Serva GmbH, Heidelberg)
ad 1 Liter mit H₂O
- 5x TBE-Lösung: 27,5 g Borsäure (Serva GmbH, Heidelberg)
54 g Tris-HCl (Serva GmbH, Heidelberg)
20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Serva GmbH, Heidelberg)
ad 1 Liter mit H₂O
- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) (Serva GmbH, Heidelberg)
2 mM EDTA (Serva GmbH, Heidelberg)
- GTE-Puffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,0) (Serva GmbH, Heidelberg)
10 mM EDTA (Serva GmbH, Heidelberg)
50 mM Glukose
- Lysozym-Puffer: 5 mg/ml Kükenlysozym (Roche, Mannheim) in GTE-Puffer
- 20xSSC-Puffer: 3 M NaCl (Merck, Darmstadt)
0,3 M Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)
auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
- 10x Gelladepuffer: 50% (v/v) Glycerin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
0,25% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
0,25% (w/v) Xylencyanol (Merck, Darmstadt)
- Marker-Mix: 50 µl 1kB Plus DNA Ladder (GibcoLifetechnologies, Eggenst.)
50 µl 10x Gelladepuffer
400 µl Bidestilliertes Wasser
- Klenow-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) (Serva GmbH, Heidelberg)
1 mM EDTA (pH 8,0) (Serva GmbH, Heidelberg)
50 mM NaCl
5 mM Dithiothreitol
- Ligase-Puffer: 30 mM Tris-HCl (pH 7,8) (Promega, Mannheim)
1 mM ATP
10 mM MgCl₂
10 mM Dithiothreitol
- 30% (w/v) APS-Lösung: Ammoniumpersulfat in Wasser (Serva GmbH, Heidelberg)
 - 40% Acrylamid 4K-Mix 29:1 (Applichem, Darmstadt)
 - TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylendiammin (Biorad, Hercules, CA, USA)

- Ethidiumbromid-Lösung: 10 µg/µl in Wasser (Serva GmbH, Heidelberg)
- 7% (v/v) HAc-Lösung: Essigsäure (Merck, Darmstadt) in Wasser
- peqLab Gold Universal Agarose (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Kodak Biomax MS Filme
- Entwickler: Dokumol Entwickler (Tetenal, Norderstedt) 1+5 in Wasser
- Fixierer: Superfix Fixierer (Tetenal, Norderstedt) 1+7 in Wasser

Alle weiteren Reagenzien, deren Herkunft nicht genauer angegeben wurde, stammen von Sigma-Aldrich (Steinheim), GibcoLifetechnologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt) oder Serva GmbH (Heidelberg).

2.1.8.2 Produkte für die RT-PCR

- Ampuwa Wasser (Fresenius, Bad Homburg)
- α -³²P[dCTP] 3000 µCi/mmol / 540 µCi in 54 µl (Hartmann Analytic, Braunschweig)
- SybrGold I, gelöst in 2,5% (v/v) DMSO (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- RNase Inhibitor RNasin 40 U/µl (Promega, Madison, WI, USA)

Alle weiteren Produkte wurden von Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA verwendet.

- 10 mM dNTP Mix
- 25 mM MgCl₂
- GeneAmp 10x PCR Buffer II
- AmplitaqGold DNA Polymerase 5 U/µl
- 50 µM Oligo-dT

2.1.8.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Polymerase-Kettenreaktionen wurden von der Firma Metabion, Planegg-Martinsried, synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Vor Gebrauch wurde die Primerlösung mit sterilem destilliertem Wasser auf 10 µM verdünnt. Die Sequenzen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Bezeichnung	Sequenz
5'-GAPDH	5'-CAC AGT CCA TGC CAT CAC-3'
3'-GAPDH	5'-CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'
5'-p73	5'-GAC GGA ATT CAC CAC CAT CCT-3'
3'-p73	5'-CCA GGC TCT CTT TCA GCT TCA-3'
5'-CD 8	5'-CAT GGC TCT GGC TGG TCT TC-3'
3'-CD 8	5'-ACC ACA GTC AGC TTC GTC CC-3'
5'-CD 4	5'-GGA AAC GCT CCC ACT CAC CC-3'
3'-CD 4	5'-CAC GCA AGC CAG GAA CAC TG-3'

5'-IFN γ	5'-CGC TAC ACA CTG CAT CTT GG-3'
3'-IFN γ	5'-GAG CTC ATT GAA TGC TTG GC-3'
5'-TAP 1	5'-GCT CGT TGG CAC CCT CAA AC-3'
3'-TAP 1	5'-TGG TTG GAG TCC GGT TCA GG-3'
5'-TAP 2	5'-GCA GAC TGT GCG AAG CTT TG-3'
3'-TAP 2	5'-GCC TGG GAT ACG AAA AGG AG-3'
5'-LMP 2	5'-ACC GGG ACA ACC ATC ATG-3'
3'-LMP 2	5'-TTA GCA TCC CTC CCA TGG-3'
5'-LMP 7	5'-TTA ACC CTT ACC TGC TTG GC-3'
3'-LMP 7	5'-ATA AGC AAT AGC TCT GCG GC-3'
5'-MHC I	5'-CAC ACT CGC TGA GGT ATT TC-3'
3'-MHC I	5'-TTG CTC TGG TTG TAG TAG CC-3'
5'-p21	5'-TTC TAA TGC CAG AGG CTG G-3'
3'-p21	5'-TGT GGA CCT GTC ACT GTC TTG-3'
5'-GADD 45	5'-TGA ACT CAC TCA GCC CCT TG-3'
3'-GADD 45	5'-TCT GCA GAT CCA CTT CAC CC-3'
5'-14-3-3 σ	5'-AGG TTG TCT CGC AGC AGC TG-3'
3'-14-3-3 σ	5'-TGC GTG AGT ACC GGG AGA AG-3'
5'-p53 R2	5'-CCT TTT CCC TCA CCA TTG GC-3'
3'-P53 R2	5'-ATC TCG CCC TGC ATA TTC CC-3'
5'-p53AIP1	5'-TGG CTC CAG GAA GGA AAG GC-3'
3'-p53AIP1	5'-TGC TTT CTG CAG ACA GGG CC-3'
5'-mdm2	5'-TGC TAC TAG AAG TTG ATG GCT GAG-3'
3'-mdm2	5'-TCA AGT TAC TGT GTA TCA GGC AGG-3'
5'-PIDD	5'-GCA CCA GGC AGG CAT TGG AC-3'
3'-PIDD	5'-GCC ATG TGC TGG AGC TGC AG-3'
5'-PIG 3	5'-TTG CTG GCT CCT GGA GGT GG-3'
3'-PIG 3	5'-TGG CTG CTC CGC GAG GAT AC-3'
5'-Bax	5'-CCC CAG TTG AAG TTG CCG TC-3'
3'-Bax	5'-GAT CAT GAA GAC AGG GGC CC-3'

2.1.8.4 Enzyme

EcoRI	12 U/ μ l (Promega, Mannheim)
Hind III	10 U/ μ l (Promega, Mannheim)
Kpn I	10 U/ μ l (Promega, Mannheim)
Pme I	10 U/ μ l (New England Biolabs, Frankfurt/Main)
Xho I	10 U/ μ l (New England Biolabs, Frankfurt/Main)

Klenow-Enzym	(DNA-Polymerase I, large fragment) (Roche, Mannheim)
T4-DNA-Ligase	(Promega, Mannheim)

2.1.9 Puffer und Lösungen für Proteinarbeiten

Zell-Lysispuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	150 mM NaCl
	0,1% (w/v) SDS
	1% (v/v) Triton X-100

Laemmli-Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 10% (v/v) Glycerin
 10% (w/v) SDS
 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,05% (w/v) Bromphenolblau

5x SDS-Laufpuffer: 125 mM Tris (Base)
 1,25 mM Glycin
 0,5% SDS

5x Transferpuffer: 970 mM Glycin
 125 mM Tris/HCl (pH 8,3)

2.1.10 Puffer und Lösungen für Virusarbeiten

5% Natriumdesoxycholat: 5 g Natriumdesoxycholat mit H₂O auf 100 ml auffüllen, autoklavieren

0,1 M Tris/HCl, pH 8,0: 6 g Tris mit H₂O auf 400 ml auffüllen, pH 8,0 mit HCl einstellen, mit H₂O auf 500 ml auffüllen, autoklavieren

CsCl-Lösungen: 1,25 d; 1,35 d; 1,5 d
 nach dem Lösen je 1 ml rausnehmen und wiegen \Rightarrow muß entsprechend der Dichte wiegen (also 1,25 g, 1,35 g oder 1,5 g)
 \Rightarrow steril filtrieren

<u>Dichte</u>	<u>CsCl</u>	<u>10 mM Tris</u>
1,5 d	90,8 g	109,2 g
1,35 d	70,4 g	129,6 g
1,25 d	54,0 g	146,0 g

Agarosemedium (1%): 1g Agarose auf 100 ml Wasser, autoklavieren, auf 44°C abkühlen lassen und bis zum Overlay auf dieser Temperatur halten

Overlay-Medium: 100 ml 2xMEM
 10 ml FCS
 2 ml Glutamin
 2 ml nicht essentielle Aminosäuren
 2 ml Ampho B
 800 μ l P/S-Mix
 auf 44°C erwärmen, kurz vor dem Overlay das Medium zur Agaroselösung geben, mischen und auf die Zellen geben

2.1.11 Kits

- Omniscript RT-PCR Kit (Quiagen, Hilden)

- MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden)
- MinElute PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden)
- RNase-free DNase Set (Quiagen, Hilden)
- RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden)
- mouse IL-12p70 DuoSet ELISA Kit (R&D Systems Europe, Oxon, England)
- Cell Titer 96 Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim)

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

- Zellkulturschalen (Biochrom KG, Berlin)
- Zentrifugenröhrchen (15ml/50ml) (Biochrom KG, Berlin)
- 96-well Mikrotiterplatten (Biochrom KG, Berlin)
- Quick Seal Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, USA)
- Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, USA)
- Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (Pierce, Rockford, IL, USA)

2.1.13 Geräte

- Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus)
- Ultrazentrifuge Coulter L7 (Beckman, Palo Alto, USA)
- Sorvall RC-5 Zentrifuge (Du Pont, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
- Thermocycler (Mastercycler gradient) (Eppendorf AG, Hamburg)
- Spektralphotometer DU64 (Beckman, Palo Alto, USA)
- FACSVantage Durchflusscytometer (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Tumorzellen

Die verschiedenen (adhärent wachsenden) Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ auf beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Bei genügend hoher Zelldichte (durchschnittlich alle 3-4 Tage) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium (DMEM mit 10%FCS für alle verwendeten Zelllinien, siehe 2.1.6) abgesaugt, die Zellen mit PBS⁼ gewaschen und anschließend mit 0,5-2 ml (je nach Größe der Zellkulturschale) einer sterilen Trypsin-EDTA-Lösung 1' bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot der durch die Behandlung mit Trypsin abgelösten und in frischem Medium aufgenommenen Zellen wurde auf neuen Zellkulturschalen ausgesät, je nach Zelllinie in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:20.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einer Suspension wurde ein Aliquot dieser Zellen mit dem gleichen Volumen einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Minuten wurden die Zellen mit einem Haemocytometer (nach Neubauer) ausgezählt.

2.2.1.3 Induktion durch 4-Hydroxy-Tamoxifen

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und frisches Medium, versetzt mit 4-Hydroxy-Tamoxifen auf eine Endkonzentration von 1 µM, auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann nach 0, 4, 8 und 24 Stunden geerntet.

2.2.1.4 Gemcitabine-Behandlung

Das Nucleosid-Analogon Gemcitabine (Eli Lilly Co., Indianapolis, IN, USA) wurde in PBS⁼ aufgelöst. Für eine Behandlung wurde Medium mit Gemcitabine zu einer Endkonzentration von 10 µM versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Behandlung erfolgte entweder nur mit Gemcitabine allein oder in Kombination mit einer Adenovirus-Infektion über einen Zeitraum von 1 bis 5 Tagen.

2.2.1.5 Ernten von Zellen

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit Trypsin-Lösung versetzt. Die trypsinisierten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Alternativ konnten die Zellen auch mit einem Gummischaber abgelöst und dann mitsamt Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10', 4°C, 1200 Upm), das Medium abgesaugt und das Zell-Pellet direkt weiterverwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.6 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Die Zellen wurden auf 60 mm-Zellkulturschalen bei 70-80% Konfluenz in 5 ml DMEM mit 10%FCS transfiziert. In einem Eppendorf-Zentrifugenröhrchen wurden 169 µl steriles Wasser und 5 µl 2 M CaCl₂-Lösung zusammengegeben. Nun wurden tropfenweise 50 µl DNA-Lösung (mit 0,1 µg/µl DNA) und anschließend noch einmal 26 µl 2 M CaCl₂-Lösung zugegeben und gemischt. In einem zweiten Röhrchen wurden 250 µl 2x HBS-Puffer vorgelegt. In dieses Röhrchen wurde mit Hilfe einer Pipette Luft hineingeblasen und währenddessen wurde tropfenweise die CaCl₂-DNA-Lösung zugegeben. Nun wurde der Ansatz 1' stehengelassen. Dann wurde der Kalzium-Phosphat-DNA-Präzipitat-Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen, mit PBS⁻ gewaschen, und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.1.7 Elektroporation (nach van den Hoff [196])

Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert und in Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (10', 4°C, 1200 Upm) wurde das Zellpellet in 10 ml PBS⁻ resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und anschließend in eiskaltem Cytomix in einer Konzentration von 3×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Nun wurden 10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA mit H₂O auf ein Volumen von 25 µl gebracht. Die DNA-Lösung wurde mit 225 µl Zellsuspension gemischt, in Gene Pulser Küvetten (0,4 cm Breite) gegeben und 10' auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser II mit einem Capacitance Extender II (BioRad) bei 250 V und 975 µF standardmäßig durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend 10' bei 37°C inkubiert und dann in 1 ml Medium aufgenommen. Aliquots dieser Zellsuspension wurden dann auf Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.2 Bakterienarbeiten

2.2.2.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Die Bakterien (100 μ l Bakteriensuspension, mit 2 μ l 1,22 M β -Mercaptoethanol versetzt) wurden nach dem Auftauen auf Eis mit 10-50 ng Plasmid-DNA oder 5-20 μ l eines Ligationsansatzes (siehe 2.2.3.3) transformiert und 30' auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90'' auf 42°C wurde der Ansatz für 2' auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200 μ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz unter Schütteln für 30' bei 37°C inkubiert. Danach wurde entweder der ganze Ansatz oder nur ein Teil davon auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bactoagar und 100 μ g/ml Ampicillin oder Kanamycin) ausgestrichen. Die Platten wurden für mindestens 8 h, meist aber über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Elektrotransformation

20 μ l elektrokompente Bakterien wurden mit 6 μ l Ligationsansatz gemischt, in eisgekühlte E. coli Pulser Küvetten pipettiert und bei 1,8 kV im E. coli Gene Pulser elektroporiert. Der Transformationsansatz wurde unmittelbar in 500 μ l LB-Medium aufgenommen und 30' bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.3 Bakterien-Glycerin-Stocks

Zur Langzeit-Aufbewahrung wurde ein Aliquot der in selektivem Medium dicht gewachsenen Einzelkolonien vor jeder Maxipräparation (siehe 2.2.2.5 und 2.2.2.6) mit der gleichen Menge an 86%-igem Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

2.2.2.4 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (sog. Minipräparation) [197]

Für die Minipräparation wurden 5 ml steriles LB- oder SB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin oder Kanamycin) mittels einer autoklavierten Pipettenspitze mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Thermoschüttler bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Von der erhaltenen Bakteriensuspension wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Eppendorf- Tischzentrifuge; 14000 Upm; RT; 3'). Das Bakteriensediment wurde

in 300 µl kalter S1-Lösung resuspendiert und nach Zugabe von 300 µl S2-Lösung kurz durchmischt und 5' bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl S3-Lösung hinzugefügt, der Ansatz gründlich durchgemischt und für 10' auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge; 14000 Upm; RT; 15') wurde der Überstand in 630 µl Isopropanol überführt, einmal umgeschwenkt und 30' bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge; 14000 Upm; RT; 15') wurde der Überstand entfernt, die Plasmid-DNA im Membranpumpen-Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2.5 Plasmidpräparation im großen Maßstab (sog. Maxipräparation) [197]

Ein einzeln gewachsener Klon bzw. 500 µl von einer 5 ml Bakterienkultur (siehe 2.2.2.4) wurden zum Animpfen von 200 ml sterilem LB- oder SB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin verwendet. Der Ansatz wurde in einem Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 200 Upm über Nacht im Thermoschüttler inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert (GS3-Rotor; 5000 Upm; 4°C; 15'), das Bakteriensediment in 12 ml S1-Lösung resuspendiert und in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 12 ml S2-Lösung wurde vorsichtig gemischt und 5' bei RT inkubiert. Nun wurden 12 ml S3-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und weitere 5' auf Eis inkubiert. Der erhaltene Niederschlag wurde durch Zentrifugation (GSA-Rotor; 15000 Upm; 4°C; 30') sedimentiert und der Überstand durch einen Faltenfilter auf eine Nucleobond AX 500 Säule aufgetragen, die zuvor mit 6 ml N2-Lösung äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 12 ml N3-Lösung gewaschen und anschließend wurde die DNA mit 6 ml N5-Lösung eluiert. Das Eluat wurde mit 4,2 ml (0,7-faches Volumen) Isopropanol versetzt und 60' bei 4°C und 6000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Wasser resuspendiert, mit 40 µl (0,1-faches Volumen) 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) und 1 ml (2,5-faches Volumen) absolutem Ethanol versetzt und 30' bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und 10' bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Membranpumpen-Vakuum getrocknet und in 100 µl TE-Puffer oder PCR-H₂O aufgenommen.

2.2.2.6 Maxipräparation mit Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

450 ml SB-Medium (mit Selektionsantibiotikum) wurden mit einem einzeln gewachsenen Klon oder 200 µl einer Bakterien-Mini-Kultur (siehe 2.2.2.4) angeimpft und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Nach Zentrifugation (GS3-Rotor, 10', 4°C, 5000 Upm) wurde das Pellet zum Aufschluss der Bakterien in 40 ml frisch angesetztem Lysozym-Puffer resuspendiert und 20' bei RT inkubiert. Durch Zugabe von alkalischem SDS-Lysis-Puffer (1% SDS (v/v); 0,2M NaOH; frisch angesetzte wässrige Lösung) und Inkubation auf Eis für 20' erfolgte die vollständige Lyse der Bakterien. Die Proteine wurden durch Zugabe von 40 ml 3M Kaliumacetat-Lösung (pH 5,5) und Inkubation für 20' auf Eis gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (GS3-Rotor, 10', 4°C, 5000 Upm) und der Überstand durch mehrere Lagen Mullbinden in 100 ml vorgelegtes Isopropanol abfiltriert. Nach 30' Fällung bei Raumtemperatur wurde wieder zentrifugiert (GS3-Rotor, 10', 4°C, 5000 Upm), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Nun wurde das Pellet in 7 ml 0,1xSSC-Puffer resuspendiert, in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1g Cäsiumchlorid pro ml Lösung versetzt. Nach dem vollständigen Lösen wurde die Lösung mindestens 30' auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (20', 4°C, 6000 Upm). Der Überstand wurde in ein Beckmann-Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt, mit 200 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und mit Mineralöl überschichtet. Die Röhrchen wurden mit Hilfe des Beckmann Quick Sealer verschlossen und im TI75-Rotor ultrazentrifugiert (16-20 h, 20°C, 55000 Upm).

Nach der Ultrazentrifugation wurde die rot angefärbte Plasmidbande mittels einer Kanüle vorsichtig abgezogen und zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrmals bis zur vollständigen Entfärbung der Butanolphase mit dem gleichen Volumen Butanol (mit TE-Puffer gesättigt) extrahiert. Die nun gereinigte Plasmid-DNA wurde mit dem 3-fachen Volumen an TE-Puffer verdünnt, durch Zugabe des 8-fachen Volumens an absolutem Ethanol gefällt und durch Zentrifugation (15', 4°C, 6000 Upm) sedimentiert. Nach Waschen mit 70%-igem Ethanol, erneuter Zentrifugation (15', 4°C, 6000 Upm) und anschließendem Trocknen für 5' bei 65°C wurde die DNA in 500 bis 1000 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.3 Nukleinsäurearbeiten

2.2.3.1 Restriktion von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der Klonierungen wurde ein Restriktionstest der isolierten Plasmide durchgeführt. Die Restriktion erfolgte unter den von den Enzymherstellern angegebenen Bedingungen betreffend der zu verwendenden Puffer, der Reaktionstemperatur und der Dauer der Restriktion. Hierbei wurde darauf geachtet, daß das Gesamtvolumen der Reaktion mindestens das Zehnfache des Volumens der eingesetzten Enzymlösung betrug, damit keine inhibitorischen Effekte durch das im Lagerungspuffer der Enzyme in hohem Anteil enthaltene Glycerin auftraten. Dadurch wurde gelegentlich in größeren Volumina als dem Standardansatz von 20 µl restringiert.

Das Ergebnis der Restriktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.1) kontrolliert.

Zur direkten Aufreinigung von Ansätzen (nach Restriktion oder Klenow-Auffüllung) wurde der jeweilige Ansatz mit dem 5-fachen Volumen an PB-Puffer (MinElute PCR Purification Kit, Quiagen) versetzt und nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.3.2 Klenow-Auffüllung von Nukleinsäuren

Die Klenow-Auffüllung erfolgte in einem Standardansatz von 20 µl (mit 1x Klenow-Puffer) für 45' bei 37°C. Die eingesetzte Enzymmenge betrug eine Einheit Klenow-Enzym pro Ansatz. Der Ansatz enthielt außerdem 0,25 mM jedes dNTP. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über eine Qiagen MinElute Säule aufgereinigt.

2.2.3.3 Ligation von Nukleinsäure-Enden

Die Ligrationsreaktion zum Einschleusen eines Fragments in einen linearisierten Vektor wurde in einem Standardansatz von 20 µl durchgeführt, der eine Einheit Ligase, Ligationpuffer, 100 bis 200 ng linearisierte Vektor-DNA und den zwei- bis vierfachen molaren Überschuß an DNA-Fragment beinhaltete. Die Ligation wurde standardmäßig bei 16°C (bei Fragmenten mit EcoRI-Schnittstellen bzw. bei blunt-end-Ligationen bei 4°C) über Nacht durchgeführt. Als Blindprobe diente ein Ansatz ohne Fragment.

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) der Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Photometers (Gene Quant, Pharmacia). Von der zu messenden Lösung wurde eine Verdünnung hergestellt, die eine OD_{260} zwischen 0,2 und 0,8 ergab, da in diesem Bereich die Nukleinsäure-Konzentration und die gemessenen OD-Werte eine lineare Korrelation aufweisen. Ein OD-Wert von 1,0 bei $\lambda=260$ nm entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$.

Zur Überprüfung der Reinheit der DNA wurde die Ratio OD_{260}/OD_{280} aufgenommen; diese sollte möglichst im Bereich der optimalen Reinheit von 1,8 liegen.

2.2.3.5 Isolierung von Gesamt-RNA

a) aus Zellen: Das geerntete Zellpellet (siehe 2.2.1.5) wurde in 350 μl RLT-Puffer (mit frisch zugesetzten 10 μl β -Mercaptoethanol pro ml) resuspendiert und zur Homogenisierung auf eine QIAshredder Säule gegeben und zentrifugiert (2', RT, 14000 Upm).

b) aus Gewebe: Das bei -80°C eingefrorene Gewebe wurde auf Trockeneis mit Hilfe von Pinzette und Skalpell zerkleinert. Nun wurden 20-30 mg des gefrorenen Gewebes in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser gegeben und mit einem gekühlten Pistill zu Pulver gemörsert (unter Stickstoff-Kühlung). Das Gewebe-Pulver wurde in 350 μl RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol, siehe oben) aufgenommen und das Lysat auf eine QIAshredder Säule gegeben und zentrifugiert (2', RT, 14000 Upm).

Das Homogenisat (aus Zellen oder Gewebe) wurde nun mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol versetzt, kurz gemischt und auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und zentrifugiert (15", RT, 14000 Upm). Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden). Dabei wurde zusätzlich das RNase-free DNase Set verwendet, um genomische DNA zu entfernen.

Die Elution der RNA erfolgte in 50 μl RNase freiem Wasser. Nach Entnahme eines Aliquots für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA-Lösung bis zur Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein 5 μl -Aliquot mit 295 μl H_2O verdünnt und am Photometer vermessen. Eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht 40 μg RNA pro ml wässrige Lösung.

2.2.3.6 Reverse Transkription

Die Generierung von cDNA aus zuvor aus Zellen isolierter Gesamt-RNA erfolgte durch Reverse Transkription mit dem Omniscript RT Kit der Firma Quiagen, Hilden.

In einem 100 µl PCR-Eppendorfgefäß wurden je 2 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl gebracht und mit je 7,5 µl Master Mix auf 20 µl aufgefüllt.

Master-Mix: 2 µl 10x RT-Puffer
2 µl Oligo-dT (10 µM)
2 µl dNTP-Mix (5 mM)
1 µl Reverse Transkriptase (4 U/µl)
0,5 µl RNasin (40 U/µl)

Der 20 µl-Ansatz wurde 1 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert und anschließend mit 30 µl PCR-Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Lösungen bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Methode der sog. "polymerase chain reaction" (PCR, [198]).

Für einen typischen 30 µl PCR-Ansatz wurden in einem 100 µl PCR-Eppendorfgefäß 2 µl cDNA als "Template" vorgelegt und mit 28 µl Master-Mix versetzt.

Master-Mix: 21,2 µl PCR-Wasser
0,6 µl 5'-Primer (10 µM)
0,6 µl 3'-Primer (10 µM)
0,6 µl dNTP-Mix (10 mM)
1,8 µl MgCl₂
3,0 µl PCR-Puffer (10x)
0,2 µl HotGoldStar-Taq-Polymerase (5 U/µl)

Bei semi-quantitativen radioaktiv markierten PCR wurden außerdem noch 0,1 µl α³²P-dCTP (3000 µCi/mmol) eingesetzt.

Die Ansätze wurden in einer sogenannten "Touchdown-PCR" mit einem "hot start" [199] nach folgendem Programm im Thermocycler amplifiziert (T_M = Schmelztemperatur der Primer):

95°C,	10'	}	10 Zyklen (je -0,5°C beim Annealing)
95°C,	15"		
$T_M+2^\circ\text{C}$,	30"		
72°C,	1'		
95°C,	15"	}	15-25 Zyklen
$T_M-3^\circ\text{C}$,	30"		
72°C,	1'		
72°C,	2'		
Kühlung bei 4°C			

Um ein semi-quantitatives Resultat zu erhalten, wurde die niedrigste Anzahl an Zyklen verwendet, die nötig war, um ein deutliches Signal im linearen Bereich zu erhalten.

Der Erfolg einer PCR wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Native Agarosegele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in horizontalen Elektrophoresekammern erfolgte je nach Größe der Fragmente in Agarosegelen mit 0,8% bis 2% Agarosegehalt. Für das Herstellen der Gele sowie als Elektrophorese-Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde mit der entsprechenden Menge 1x TAE versetzt und aufgeköcht, und nach kurzer Abkühlung wurden 2 µl Ethidiumbromidlösung (als unter UV-Licht verstärkt fluoreszierenden Interkalationsfarbstoff, um die DNA-Banden sichtbar zu machen) je 100 ml 1x TAE hinzugefügt und ein Gel in einem Biorad-Gelschlitten gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente für 0,5 bis 1,5 h bei einer Spannung von 10-15 V/cm.

Falls benötigt, wurde nach der Elektrophorese von dem Gel unter UV-Licht ein Bild aufgenommen.

2.2.4.2 Polyacrylamidgele

In einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden

16,9 ml bidestilliertes Wasser
5,0 ml 5x TBE-Puffer
3,2 ml 40% Acrylamid-Mix 4K
35,0 µl TEMED

zusammenpipettiert. Die Lösung wurde durch Vortexen gemischt und danach wurden 100 µl 30%-ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung zugegeben und erneut durch Vortexen gemischt. Mit dem Mini Protean III Cell System (Biorad) wurde ein 1,5 mm starkes, vertikales Gel gegossen. Das nach etwa 60' polymerisierte Gel wurde in 1x TBE als Laufpuffer bei einer angelegten Spannung von 5-10 V/cm betrieben. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in 1x TBE-SybrGold-Lösung für 15' auf dem Schüttler gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet. Radioaktive Gele wurden nach der Elektrophorese in 7% HAc-Lösung eingebracht und 20' unter Schütteln fixiert. Anschließend wurde das Gel auf einem Geltrockner im Membranpumpen-Vakuum getrocknet. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte mittels Autoradiographie (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.3 Autoradiographie

Die elektrophoretisch getrennten, radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden durch Exposition der getrockneten Gele auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. Dazu wurden in einer Röntgenkammer mit Biomax Intensifying Screen Röntgenfilme auf die Gele gelegt. Je nach Signalstärke erfolgte die Exposition von 5' bis zu 6 Tagen bei -80°C . Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Auswertung der PCR-Gele (sowohl radioaktiv als auch durch SybrGold-Lösung sichtbar gemachte Banden) erfolgte in der relativen Software-Einheit PSL unter Verwendung des TINA-Programms, Version 2,09.

2.2.4.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarose

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen) und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in einem Volumen von 10 bzw. 30 μl PCR-Wasser eluiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 Analyse von Proteinen

2.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen von einer Zellkulturschale wurden mit kaltem PBS⁻ gewaschen, anschließend in 1 ml PBS⁻ abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10', 4°C, 2500 Upm). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50-200 µl Zell-Lysispuffer (mit 1/10 Volumen Protease-Inhibitoren) resuspendiert und 30' auf Eis lysiert. Unlöslicher Zelldebris wurde durch Zentrifugation (15', 4°C, 14000 Upm) abgetrennt, das Zelllysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Aliquot eine Proteinkonzentrations-Bestimmung durchgeführt. Der Rest des Zellextraktes wurde bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [200]

Proteinkonzentrationen wurden über photometrische Messung der Extinktion des charakteristisch blauen Komplexes aus Proteinen und dem Farbstoff Serva Blue G ermittelt. Dazu wurden 200 µl 5 x Bradford-Reagenz (BioRad) vorgelegt und mit 800 µl Probelösung versetzt:

700 µl H₂O

1-10 µl Zellextrakt, mit PBS⁻ auf 100 µl gebracht

200 µl Bradford-Reagenz

Nach einer Inkubation von 10' bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ mit einem Photometer bestimmt. Anhand einer Standardkalibrierkurve, die mit BSA (bovine serine albumine, Rinderserumalbumin)-Konzentrationen zwischen 1 und 5 µg pro 800 µl Probelösung gemessen wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem unter denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Trenn- und Sammelgele erfolgte gemäß Sambrook et al. [197]. Eingesetzt wurden je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine 7,5-12,5%-ige Polyacrylamid-Gele, wobei das Massenverhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid 29:1 betrug. Die Zellextrakte wurden mit Probenpuffer gemischt und 5' bei aufgekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld in einer MiniPROTEAN II Kammer (BioRad) bei einer

konstanten Spannung von 100 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der als Marker mit aufgetragene vorgefärbte Proteinstandard entsprechend der Fragestellung aufgetrennt war.

2.2.5.4 Western-Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine ECL-Nitrocellulose-Membran übertragen. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde kurz in Transfer-Puffer equilibriert und die Proteine anschließend in einem "Semi-dry Blotting"-System für 30-90' bei 1,25 mA/cm² auf die Membran übertragen.

2.2.5.5 Immundetektion (ECL-System)

Die ECL-Nitrocellulose-Membran wurde in PBS⁻ mit 0,1% Tween-20 und 10% Milchpulver entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert. Die erste Antikörper-Inkubation erfolgte anschließend entweder für 1 h bei RT (wenn über Nacht blockiert wurde) oder über Nacht bei 4°C. Die Antikörperkonzentration betrug 1 µg/ml in PBS⁻ mit 0,1% Tween-20 und 5% Milchpulver. Anschließend wurde 3 mal 10' mit PBS⁻ mit 0,1% Tween-20 gewaschen. Die Inkubation mit einem entsprechenden horseradish-Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper wurde für 45' bei einer Antikörperverdünnung von 1:2000 bis 1:5000 in PBS⁻ mit 0,1% Tween-20 und 5% Milchpulver durchgeführt. Anschließend wurde 3 mal 10' mit PBS⁻ mit 0,1% Tween-20, einmal 10' mit PBS⁻ mit 0,2% Tween-20 und am Ende einmal mit PBS⁻ gewaschen. Die Chemilumineszenz-Detektion wurde mit dem "Super Signal West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce) und "Scientific Imaging Film X-OMAT AR" (Kodak) durchgeführt.

2.2.5.6 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Für ELISA-Messungen wurden Zellen mit AdIL-12/B7.1 (siehe 3.3 und 3.4) oder AdIL-12 (siehe 3.3) infiziert und in Medium bis zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe 3.3 und 3.4) im Brutschrank inkubiert. Die Expressionslevel des in den Überstand von infizierten Zellen sezernierten mIL-12 wurden mit Hilfe des Maus IL-12p70 Duo Set ELISA Kits (R&D Systems) quantifiziert. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.5.7 B7.1 Durchflusszytometrie-Analyse

Für die Detektion von B7.1 wurden die Zellen (sowohl mit AdIL-12/B7.1 infizierte als auch unbehandelte (Kontroll-)Zellen) trypsiniert, in eiskaltem PBS⁻ mit 1% FCS resuspendiert. Dann wurde 1 µl des mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierten anti-Maus B7.1 Antikörpers (PharMingen) zugegeben und für 60' auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, in 500 µl PBS⁻ resuspendiert und nachfolgend auf eine Fluoreszenz hin mit einem FACSVantage Durchflusszytometer (Becton Dickinson) analysiert. Als Negativkontrolle für eine B7.1 Expression wurden für die Mausexperimente (siehe 3.3) humane Pankreastumorzellen (AsPC-1) und für die Murmeltierexperimente (siehe 3.4) humane MRC5 Fibroblasten verwendet. Diese Zellen können nicht mit dem Maus B7.1 Antikörper reagieren, da sie humanen Ursprungs sind.

2.2.5.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Zellen wurden auf einem Glasdeckgläschen ausgesät und mit Adp53 infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit eiskalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen und dann für 1 h mit dem Erstantikörper inkubiert (anti-p53, Ab-6; Oncogene). Anschließend wurde wieder zweimal mit PBS⁻ gewaschen und dann mit dem entsprechenden Zweitantikörper (Alexa⁵⁴⁶-konjugierter anti-mouse, Molecular Probes) für 1 h inkubiert. Nun wurde wieder mit PBS⁻ gewaschen und anschließend für 5' mit DAPI-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS⁻ wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-aktivierten Laser-Mikroskop analysiert.

2.2.6 Zytotoxizitäts-Untersuchungen

2.2.6.1 MTT-Assay

Es wurden je nach Zelllinie $0,5 \times 10^4$ bis 2×10^4 Zellen in die Vertiefungen einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Ad-Vektoren infiziert und für 30' bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Infektion wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und wieder im Brutschrank für den zu untersuchenden Zeitraum inkubiert. Dabei wurden mit AdER-E2F1 infizierte Zellen (siehe 3.2) entweder in der Abwesenheit oder Gegenwart von 4-Hydroxytamoxifen inkubiert (siehe 2.2.1.3). Bei einer Kominationsbehandlung von Virusinfektion und Gemcitabine-Behandlung (siehe 2.2.1.4 und 3.2) wurde das Chemotherapeutikum nach der halbstündigen Virusinfektion in das frische Medium zugesetzt. Für jeden MTT-Assay wurden die einzelnen Experimente immer in Triplikaten, also in drei wells gleichzeitig, durchgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen abgezogen und ein Mix aus 100 μl Medium und 20 μl MTT-Lösung (Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) auf die Zellen gegeben. In vitalen Zellen wird das schwach gelbe Substrat MTT, ein Tetrazolium-Salz, mitochondrial von verschiedenen Dehydrogenasen zu einem dunkelbraunen Formazan-Farbstoff reduziert. Nun wurde 1-3 h bei 37°C inkubiert und nach ausreichender Farbentwicklung die Konzentration des gelösten Formazanproduktes dann photometrisch unter Verwendung eines ELISA Readers bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert. Als Blank wurde die Extinktion einer keine Zellen enthaltenen Vertiefung gewählt. Die Anzahl vitaler Zellen in einer Population in Relation zu untransfizierten Zellen wurde dann als Quotient der entsprechenden Extinktionen ermittelt, wobei der Wert der unbehandelten Zellen als 100% festgesetzt wurde.

2.2.7 Apoptose-Untersuchungen

2.2.7.1 FACS-Analysen

Die für die FACS-Analysen verwendeten Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach einer Virus-Infektion oder Gemcitabine-Behandlung geerntet. Dazu wurden die Zellen samt Zellkulturüberstand gesammelt und abzentrifugiert (10', 4°C, 1200 Upm). Anschließend wurde das Zellpellet zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen (Zentrifugation jeweils: siehe oben) und dann in 1 ml eiskaltem PBS⁻ resuspendiert. Nun wurden die Zellen unter Vortexen mit 10 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol fixiert und 24 h bis 4 Wochen bei -20°C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (10', 4°C, 2000 Upm), der Ethanol sorgfältig abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen (Zentrifugation jeweils: 10', 4°C, 1600 Upm). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PI-Färbelösung (100 µg/ml Propidiumiodid, 100 µg/ml RNase A in PBS⁻) für mindestens 30' (dunkel, 4°C) inkubiert.

Die Fluoreszenz einzelner Zellen wurde mit einem Argon-Ionenlaser angeregt, die Detektion und Datenaquisition erfolgte mit dem Durchfluscytometer FACSVantage und der CellQuest Software (Becton Dickinson). Pro Messung wurden 10.000 events erfasst. Die Verteilung der Zellen aufgrund ihres DNA-Gehaltes wurde als Histogramm dargestellt. Die Apoptose-Quantifizierung erfolgt durch Messung des Anteils der Zellen mit sub-G1 DNA-Gehalt. Werden Zellen mit Ethanol (70%) fixiert, so kann fragmentierte DNA (charakteristisch für Apoptose-induzierten Zelltod) aufgrund der eintretenden Permeabilisierung der Zellmembran aus den Zellen austreten. Nach Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI), zeichnen sich fixierte, apoptotische Zellen daher durch ihre, auf einem verminderten DNA-Gehalt beruhende, reduzierte Rotfluoreszenz aus. In einer durch FACS-Analyse erstellten Verteilung der gesamten Zellpopulation auf der Basis des DNA-Gehaltes bilden die apoptotischen Zellen einen charakteristischen sub-G1-Peak.

In der Mehrzahl der durchgeführten Experimente wurde als Kontrollvektor AdGFPS eingesetzt, der für das GFP-Spectrin-Protein codiert. Das GFP-Spectrin wird aufgrund der carboxyterminal an das Enhanced Green Fluorescent Protein fusionierten Pleckstrin-Homologie-Domäne des humanen β IIISpektrins an intrazelluläre Membranen gebunden. Während die Grünfluoreszenz des unmodifizierten GFP im Rahmen einer für Apoptose-FACS-Analysen erforderlichen Fixation mit 70% Ethanol verloren geht, bleiben die Fluoreszenzeigenschaften des GFPS dabei unverändert.

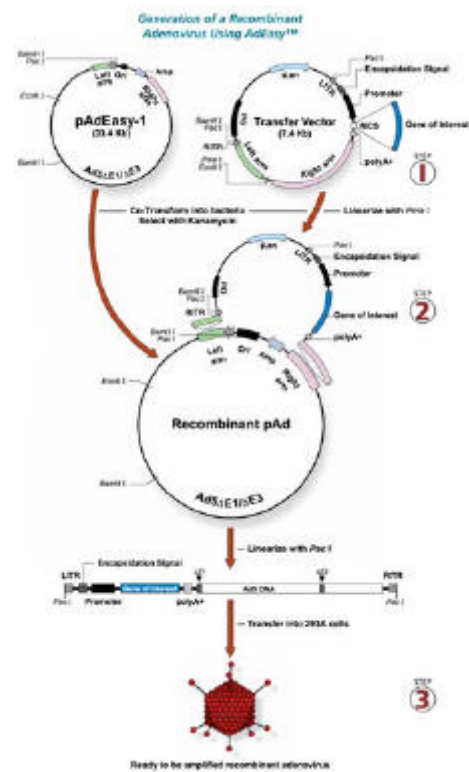
2.2.8 Virusarbeiten

2.2.8.1 Klonierung von Ada-p73 und Adb-p73 mit Hilfe des AdEasy-Systems [201]

Die beiden Adenovirus-Vektoren wurden mit Hilfe des AdEasy-Systems hergestellt ([201], zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein). Die cDNAs für α - und β -p73 (zur Verfügung gestellt von G. Melino) wurden mit XhoI und KpnI aus dem pcDNA-Vektor ausgeschnitten. Der pShuttleCMV-Vektor wurde ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnitten und die cDNAs hineinkloniert. Daraus resultierten die Plasmide pShuttleCMV α -p73 und pShuttleCMV β -p73.

Die Richtigkeit der Klonierung wurde mit einem Kontrollverdau mit EcoRI überprüft. Die Viren

wurden dann durch Cotransformation der mit PmeI linearisierten pShuttle-Plasmide zusammen mit pAdEasy 1 in *E. coli* BJ5183 und nachfolgende homologe Rekombination hergestellt. Der Erfolg der Klonierung wurde auch hier wieder mittels Kontrollverdau (EcoRI und HindIII) überprüft. Die so entstandenen rekombinanten pAd α -p73- und pAd β -p73-Plasmide wurden nun mit PacI linearisiert und mit Hilfe einer Kalzium-Phosphat-Transfektion (siehe 2.2.1.6) in 293-Zellen transferiert, um virale Partikel zu produzieren. Die Zellen wurden für 5 bis 7 Tage im Brutschrank inkubiert, dann abgeschabt und mitsamt Medium in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen wurden mehrmals geknackt (Einfrieren (fl. N₂), auftauen (37°C-Wasserbad)) und der Überstand auf neue 293-Zellen gegeben, um die Virusmenge zu erhöhen. Die Zellen wurden wieder für mehrere Tage im Brutschrank inkubiert und der Vorgang (Zellen ernten, knacken, Überstand auf neue 293-Zellen geben) mehrmals wiederholt. Nun wurde der Überstand dazu verwendet, 293-Zellen für eine High Titer-Virus-Präparation (siehe 2.2.8.3) zu infizieren. Die einzelnen Schritte sind in nebenstehender Abbildung noch einmal dargestellt.



2.2.8.2 Plaque-Infektion

Die nach einer Titerbestimmung entstandenen infektiösen Virus-Plaques (siehe 2.2.8.5) konnten nun bei Bedarf ausgestochen, aufgereinigt und anschließend für eine sogenannte High Titer-

Infektion (siehe 2.2.8.3) verwendet werden. Die Plaque-Infektion wurde folgendermaßen durchgeführt:

In ein Cryo-Tube wurden 1 ml PBS⁺⁺+10% Glycerin gegeben. Ein nach erfolgreicher Transfektion entstandener Plaque wurde mit einer Pasteur-Pipette ausgestochen (dabei ansaugen) und in das Cryo-Tube (siehe oben) gegeben. Nun wurde das Virus geknackt (Einfrieren (fl. N₂) und auftauen (37°C-Wasserbad)). Am Vortag ausgesäten kleinen 293-Platten (60 mm) wurde das Medium abgezogen und 200 µl Plaque-Lösung langsam auf die Platte getropft (gleichmäßig verteilen). Anschließend wurde für 30 min. im 37°C-Brutschrank inkubieren gelassen und dann 5 ml DMEM+10% FCS vorsichtig zugeben ⇒ 37°C-Brutschrank. Nach 3-5 Tagen war die Infektion vollständig (alle Zellen rund und in Lösung). Die Platten wurden abgeschabt und die Zelllösung in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden 3x geknackt (Einfrieren (fl. N₂), auftauen (37°C-Wasserbad)) und anschließend abzentrifugiert (10', 1200 Upm, 4°C). Der das Virus enthaltene Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8.3 Virus-Präparation (High Titer)

Das durch Plaque-Infektion oder durch AdEasy-Klonierung erhaltene Virus wurde nun auf großen 293 Platten vermehrt. Die nach Infektion von acht großen Platten und anschließender Aufreinigung erhaltene Virus-Präparation, der sogenannte High Titer, wurde nach der Titerbestimmung (siehe 2.2.8.5) für *in vitro* Versuche verwendet. Die Virus-Präparation wurde folgendermaßen durchgeführt:

Acht große Platten 293-Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 80-90% wachsen gelassen. Nun wurde 1 ml Überstand einer Plaque-Infektion oder einer AdEasy-Klonierung mit 15 ml DMEM+10% FCS gemischt und je 2 ml dieser Mischung wurden auf die 8 Platten getropft (vorher Medium abziehen). Nach einer halben Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden pro Platte vorsichtig 23 ml Medium zugeben. Die Platten wurden dann für 2-5 Tage im 37°C-Brutschrank inkubiert, bis möglichst alle infizierten Zellen rund und in Lösung waren. Nun wurden die Zellen abgeschabt (falls noch nicht in Lösung) und zusammen mit dem Überstand in vier 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer Zentrifugation (10', 1200 Upm, 4°C) wurde der Überstand abgegossen, die Zellpellets in insgesamt 3-5 ml PBS⁺⁺+10% Glycerin aufgenommen und in 15ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Nun wurde das Virus geknackt: 3x eingefroren (flüssiger Stickstoff) und aufgetaut (37°C). Nach einer Zentrifugation

(10', 6000 Upm , 4°C) wurde der Überstand in Cryo-Tubes überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8.4 Virus-Präparation (mit CsCl-Dichtegradientenzentrifugation)

Für die Tierversuche musste die High Titer-Viruspräparation noch weiter aufgereinigt werden. Nach Titerbestimmung konnten die so erhaltenen Virus-Präparationen sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Versuche eingesetzt werden. Die Durchführung verlief folgendermaßen:

32 große Platten 293-Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 80-90% wachsen gelassen. Dann wurden 200-500 µl High Titer mit 64 ml DMEM+10% FCS gemischt und davon je 2 ml auf die 32 Platten getropft (vorher Medium abziehen). Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C wurden 23 ml Medium pro Platte vorsichtig zugegeben und die Platten im 37°C-Brutschrank für 2-5 Tage inkubiert, bis möglichst alle infizierten Zellen rund und in Lösung waren. Dann wurden die Zellen abgeschabt (falls noch nicht in Lösung) und zusammen mit dem Überstand in 2 Zentrifugen-Tubes gegeben. Nach einer Zentrifugation (30', 2600 Upm , 5°C) wurde der Überstand abgegossen, die Zellpellets entweder direkt bei -20°C eingefroren oder in 15 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 (steril filtriert) aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für die weitere Präparation wurden die Pellets aufgetaut und (falls noch nicht geschehen) in 15 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 resuspendiert und in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wurden 1,5 ml 5% Natriumdesoxycholat zugegeben, gut gemischt und 30' bei Raumtemperatur stehen gelassen (sehr viskose Suspension). Jetzt wurden 150 µl 2M MgCl₂ und 75 µl DNase I-Lösung zugegeben, gut gemischt und im 37°C-Wasserbad 30-60' inkubieren gelassen (wichtig: alle 10' mischen). Dabei nahm die Viskosität der Lösung ab. Nach einer Zentrifugation (15', 4000 Upm , 5°C) wurden je 5 ml des Überstandes auf einen vorbereiteten Gradienten geschichtet (siehe Abb. 2.2.8.4) und für die nachfolgende Ultrazentrifugation mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 gut austariert. Je Zellysate wurden 3 Zentrifugentubes verwendet. Nach der Ultrazentrifugation (SW40-Rotor, 1 h, 35000 Upm, 10°C) wurden die Virusbanden ausgestochen. Dazu wurden die Zentrifugenröhrchen in ein Stativ gespannt, die Öffnung mit Parafilm abgedichtet und mit einer Kanüle ein kleines Loch hineingestochen. Die Kanüle wurde nun erhitzt und dann ein kleines Loch unten ins Röhrchen gestochen, wobei das Parafilmloch mit einem Finger abgedichtet wurde. Nun wurde aus dem unteren Loch die Lösung herauslaufen gelassen und jede Virusbande in einem neuen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und mit 1,35d-Lösung aufgefüllt. Nun wurde erneut ultrazentrifugiert (SW40-Rotor, 16-24 h, 35000 Upm, 10°C) und die Virusbanden anschließend (3 Banden pro Virus) in

einem möglichst kleinen Volumen gesammelt. Die gesammelte Dialyse wurde nun mit Hilfe einer Spritze in eine Slide-A-Lyzer-Dialysekassette (Pierce) gegeben und bei 4°C für 3 mal 8 h

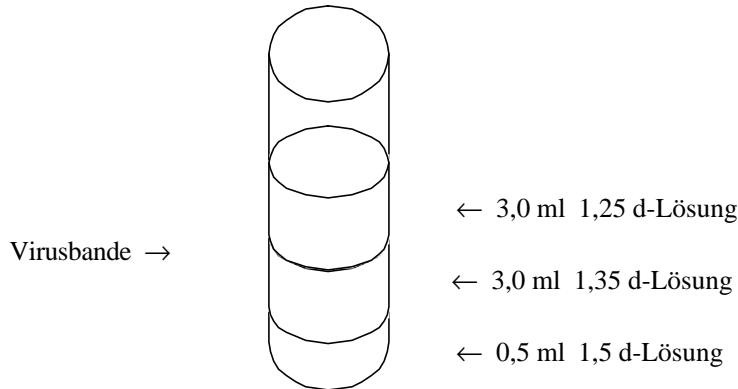
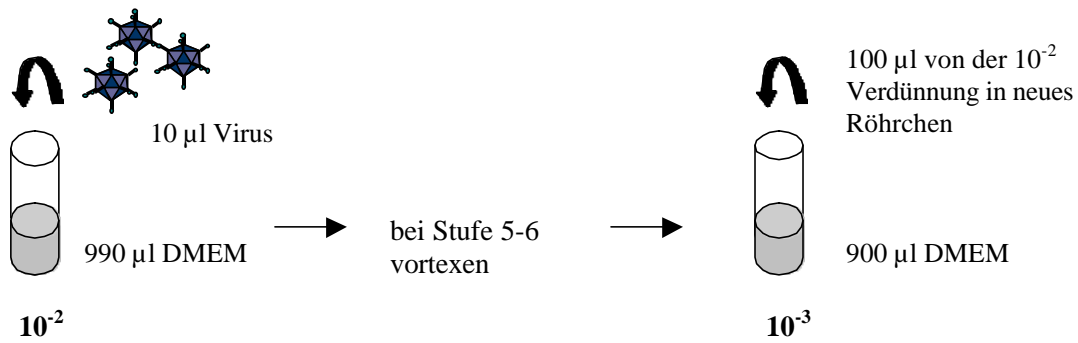


Abb. 2.2.8.4: Gradient für die Ultrazentrifugation

mit je 500 ml Puffer 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) dialysiert. Nach beendeter Dialyse wurde das Virus aus der Dialyse-Kassette geholt, mit sterilem Glycerin auf einen Anteil von 10% Glycerin aufgefüllt, gut gemischt und in Cryo-Tubes gegeben. Das aufgereinigte Virus wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8.5 Virus-Titration (Plaque-Assay)

Für die aus der High Titer- oder der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation-Präparation erhaltenen Viren musste nun noch der Titer, d.h. der Zahl der infektiösen Viren, bestimmt werden, bevor die Viren für die Versuche eingesetzt werden konnten. Dabei wurde für jedes Virus eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-11} in Röhrchen mit DMEM+10%FCS angesetzt (siehe Abb. 2.2.8.5). Für jeden Verdünnungsansatz wurde eine Doppelbestimmung gemacht, d.h. für jede Verdünnung wurden zwei kleine Platten mit 293-Zellen (70-80% konfluent) verwendet. Das Medium wurde von den Zellen abgezogen und jeweils 200 µl Medium-Virus-Gemisch langsam auf die Platten getropft und dabei gleichmäßig verteilt. Nun wurde im 37°C-Brutschrank für 30' inkubiert, anschließend vorsichtig und langsam 5 ml Medium zugegeben und über Nacht im Brutschrank stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgezogen und 10 ml Agarosemedium langsam zugegeben. Nach ungefähr 10' war der Agaroseoverlay fest und die Platten wurden in den Brutschrank



usw. bis 10^{-11}

⇒ pro Röhren also 900 µl Medium-Virus-Gemisch

Abb. 2.2.8.5: Beispiel für eine Verdünnungsreihe

zurückgestellt. Nach 10 Tagen wurden die entstandenen Virus-Plaques bei den einzelnen Verdünnungen gezählt, der Mittelwert aus der Doppelbestimmung gebildet und so der Titer erhalten, der in pfu (plaque forming units) pro ml angegeben wurde.

2.2.8.6 Drittgenerations-Adenovirus-Vektoren

Die bei der E2F1-Gentherapie beim Pankreaskarzinom (siehe 3.2) verwendeten HD (helper dependent)-Ad-Vektoren HD-AdE2F1 und HD-AdGFPS wurden von B.M. Pützer hergetellt. Detaillierte Angaben über die genaue Herstellung sind publiziert (siehe eigene Publikationen, 2.))

2.2.9 Tierversuche

2.2.9.1 Tierexperimente für die E2F1-Gentherapie (siehe 3.2)

Sechs bis acht Wochen alten *nu/nu* Nacktmäusen wurden in die rechte hintere Flanke 10^7 MZA Tumorzellen subkutan injiziert. Mäusen, die einen sichtbaren Tumor entwickelt hatten, wurde intratumoral eine entsprechende Konzentration von HD-AdE2F1 oder des Kontrollvektors HD-AdGFPS injiziert. Gemcitabine wurde intraperitoneal über einen Zeitraum von 10 Tagen (am 1., 4., 7. und 10. Tag, jeweils 60 mg/kg) injiziert. Bei der Kombinationstherapie wurde die erste Gemcitabine-Injektion zusammen mit der Virus-Injektion durchgeführt. Das Tumorstadium wurde anschließend zwei Mal wöchentlich kontrolliert. Dazu wurden die Tumoren mit Hilfe einer Schieblehre in zwei senkrecht zueinander stehenden Durchmessern vermessen. Die Tiere wurden getötet, wenn der längere Durchmesser größer als 15 Millimeter war oder wenn beide Durchmesser über 10 Millimeter betragen.

2.2.9.2 Tierexperimente für die IL-12/B7.1-Gentherapie in Mäusen (siehe 3.3)

Das transplantierbare duktales Pankreasadenokarzinom-Modell wurde schon beschrieben [202]. Um etablierte Tumoren zu erhalten, wurden 5×10^6 Pan02 Zellen (in 100 μ l PBS⁻ resuspendiert) subkutan in die rechte hintere Flanke von entweder 6 bis 8 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Mäusen oder von *nu/nu* Nacktmäusen injiziert. Nachdem sich bei den Mäusen sichtbare Tumoren entwickelt hatten (ungefähr 21 Tage nach Injektion), wurde den Mäusen intratumoral die entsprechende Konzentration an Virus (in PBS⁻) injiziert. Das Tumorstadium wurde vor der Virus-Injektion und nachfolgend zwei Mal wöchentlich bestimmt. Dazu wurden die Tumoren mit Hilfe einer Schieblehre in zwei senkrecht zueinander stehenden Durchmessern vermessen. Die Tiere wurden getötet, wenn der längste Durchmesser größer als 15 Millimeter war oder wenn beide Durchmesser über 10 Millimeter betragen. Zwei bis drei Monate nach einer vollständigen Tumorrückbildung wurden den Mäusen 10^6 frische Tumorzellen subkutan in die gegenüberliegende hintere Flanke injiziert und erneut die Bildung sichtbarer Tumoren beobachtet.

2.2.9.3 Tierexperimente für die IL-12/B7.1-Gentherapie in Murmeltieren (siehe 3.4)

Die Murmeltiere, die chronisch mit WHV (Murmeltier Hepatitis-Virus, mit humanem Hepatitis B-Virus verwandt) infiziert waren, besaßen einen oder mehrere hepatische Tumoren, die einen Durchmesser von mindestens 2 cm hatten. Die Tumorstadium wurde durch Ultraschall und

Magnetresonanzbildgebung (magnetic resonance imaging, MRI) bestimmt. Insgesamt wurden verschiedene Tumor-tragende Tiere behandelt. Die intratumorale Injektion der Adenovirus-Vektoren erfolgte entweder nach vorheriger Laparotomie oder ohne chirurgische Intervention unter MRI-Kontrolle.

Nach Vektor-Applikation wurden die Tiere über einen unterschiedlichen Zeitraum auf Tumorrückbildung hin beobachtet.

Detaillierte Angaben über die genaue Durchführung der Experimente sind publiziert (siehe eigene Publikationen, 1.)

Die statistische Signifikanz in dem relativen Anstieg oder der Abnahme des Tumolvolumens wurde durch den paired Student's *t* test berechnet. Alle statistischen Tests waren zweiseitig.

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Tierversuchs-Kommission der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit von p53 und p73 beim Pankreaskarzinom

Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 ist in die Karzinogenese involviert. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass Mutationen innerhalb des p53 Gens zu den am häufigsten in humanen Karzinomen detektierten Alterationen gehören [46]. Daher ist die therapeutische Wiedereinführung des Wildtyp-p53 Gens in Krebszellen eine oft durchgeführte Gentherapie-Strategie bei der Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten [203]. Die dadurch erhoffte Apoptose-Induktion durch Wildtyp-p53 funktioniert jedoch nicht in allen Fällen, was bei einigen Tumoren auf einer Resistenz gegenüber exogenem p53 beruht [83,204].

Aufgrund der bestehenden Resistenzen humaner Tumoren gegenüber z.B. Chemotherapie-induzierter Apoptose durch Mutationen des p53-Gens stellt der Einsatz von Apoptose-induzierenden Genen, die unabhängig vom p53-Status wirksam sind, eine Möglichkeit dar, im Rahmen einer Gentherapie diese Apoptose-Blockade zu umgehen. Eines dieser Gene stellt p73 dar. Bei Überexpression kann exogenes p73 einige der p53-Zielgene aktivieren und Apoptose induzieren [89]. Dabei konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die β -Isoform von p73 ein stärkerer Transaktivator als die α -Isoform und effektiver in der Induktion von Apoptose ist [86]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die apoptotische Aktivität und die daraus resultierende antitumorale Wirksamkeit von p73 beim Pankreaskarzinom untersucht und mit der von p53 verglichen werden. Dazu wurden p53 und α - sowie β -p73 durch adenovirale Vektoren in mehrere humane Pankreastumorzelllinien eingebracht und die Induktion eines Wachstumsarrests und/oder von Apoptose analysiert.

3.1.1 Überprüfung des p53-Status der verwendeten Zelllinien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente standen vier verschiedene Pankreastumorzelllinien zur Verfügung. Keine dieser Zelllinien verfügt über ein p53-Wildtyp-Protein, was auch der natürlichen Situation nahekommt, da ungefähr 70% aller Pankreaskarzinome kein funktionelles p53 besitzen. Zwei der verwendeten Zelllinien, MZA und Capan-1, exprimieren ein mutiertes p53-Protein, die zwei anderen, AsPC-1 und Capan-2, zeigen keine p53-Expression, d.h. sie sind p53-negativ [205, und eigene Sequenzieranalysen (MZA), siehe Abb. 3.1.1].

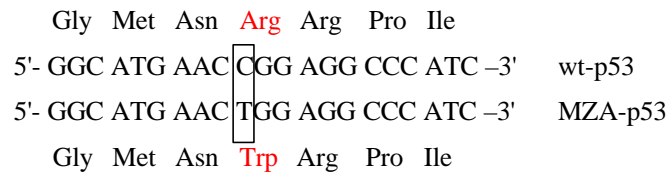


Abb. 3.1.1: Überprüfung der p53-Sequenz in MZA-Zellen. Sequenzieranalyse von p53 in MZA, wobei ein Teil der Gen-Sequenz von Exon 7 dargestellt ist. Es handelt sich um eine Punktmutation in Codon 248 in Exon 7 (R248W, Arginin (Arg) → Tryptophan (Trp)).

Die p53-Expression der Zelllinien wurde im Western-Blot mit Hilfe eines p53-Antikörpers, der sowohl mutiertes als auch Wildtyp-Protein erkennt, überprüft. Als Positivkontrolle dienten MCF-7 Zellen, eine humane Brustkarzinomzelllinie, die Wildtyp-p53 exprimiert (Abb. 3.1.2). Dabei zeigten AsPC-1 und Capan-2 Zellen wie erwartet keine p53-Expression, während die Expression des mutierten p53-Proteins in MZA und Capan-1 Zellen im Vergleich zu MCF-7 Zellen (Wildtyp) sehr hoch war.

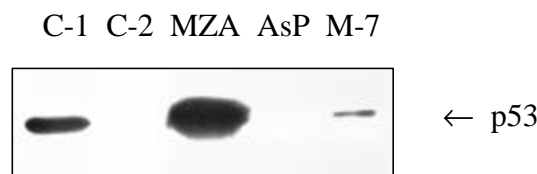


Abb. 3.1.2: Überprüfung der p53-Expression in verschiedenen humanen Pankreastumorzellen. Western-Blot von p53, wobei die Transgen-Expression von unbehandelten Zellen bestimmt wurde. Der verwendete p53-Antikörper erkennt sowohl mutiertes als auch Wildtyp-p53.

C-1: Capan-1; C-2: Capan-2; AsP: AsPC-1; M-7: MCF-7.

3.1.2 Effekt von p53 und p73 in Pankreastumorzelllinien

Nun sollte die Wirksamkeit von Wildtyp-p53 und der beiden p73-Isoformen α und β in den verschiedenen Pankreastumorzelllinien überprüft werden. Für den Gentransfer in die Zellen wurden replikations-defekte Erstgenerations-Adenoviren verwendet, die das jeweilige Transgen in der deletierten E1-Region enthalten. Diese werden im folgenden Adp53, Ad α -p73 und Ad β -p73 genannt (siehe Abb. 3.1.4). Um die Transgen-Expression der einzelnen Viren zu überprüfen, wurden AsPC-1 Zellen mit jedem der drei Ad-Vektoren infiziert und die Expression des Proteins 24 h nach der Infektion im Western-Blot überprüft (Abb. 3.1.3). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Proteine wurden schon nach 24 h stark überexprimiert, wodurch gezeigt werden konnte, dass der adenoviral-vermittelte Gentransfer der p53-Familienmitglieder sehr effizient war.

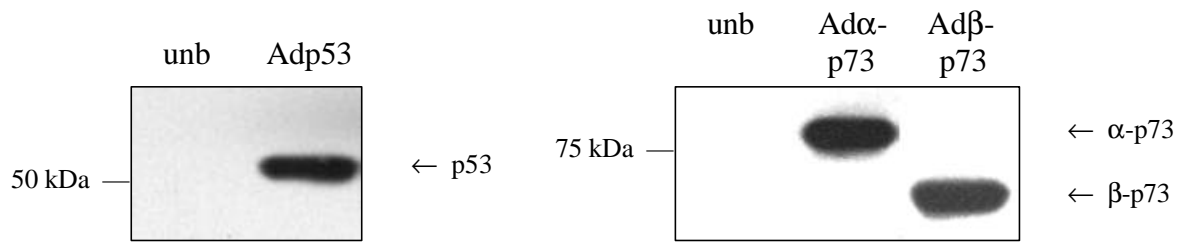


Abb. 3.1.3: Überprüfung der Protein-Expression der verwendeten Adenovirus-Vektoren Adp53, Ad α -p73 und Ad β -p73. AsPC-1 Zellen wurden mit dem jeweiligen Virus infiziert und die Protein-Expression nach 24 h überprüft. Western-Blot von p53 und p73, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle dienen.

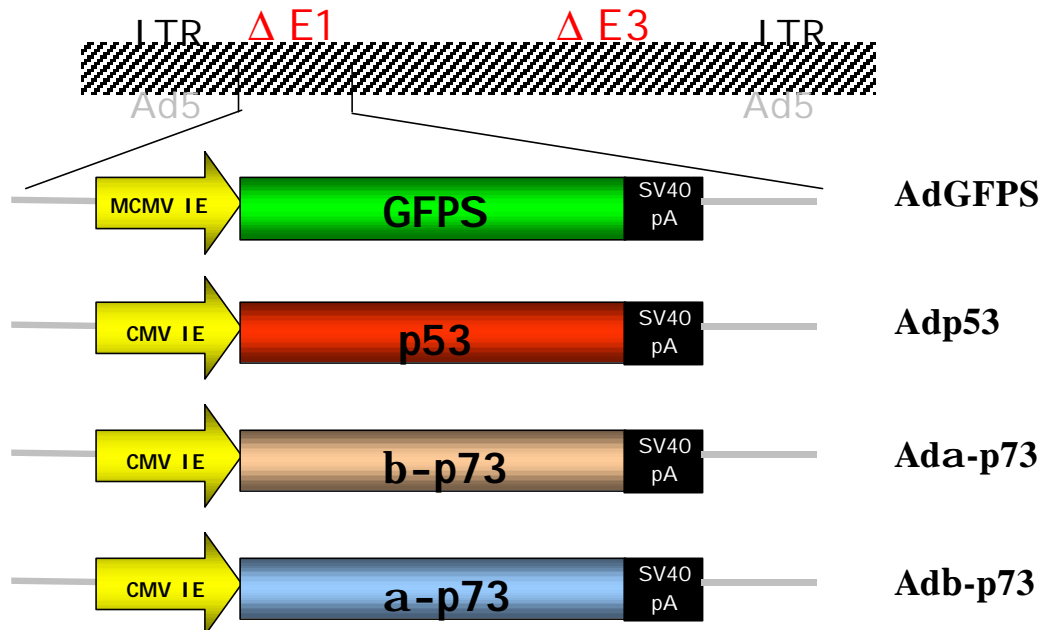


Abb. 3.1.4: Darstellung der in diesem Teil der vorliegenden Dissertation verwendeten Erstgenerations-Adenovirusvektoren. Die Viren enthielten die Expressionskassetten für GFP (AdGFPS), p53 (Adp53), α -p73 (Ad α -p73) und β -p73 (Ad β -p73) unter Kontrolle des murinen Cytomegalievirus-Promotors (MCMV; gilt für AdGFPS) bzw. des humanen Cytomegalievirus-Promotors (CMV; gilt für Adp53, Ad α -p73 und Ad β -p73). Die Gene wurden in die deletierte E1-Region inseriert. AdGFPS und Adp53 wurden von T. Stiewe hergestellt, die Generierung von Ad α -p73 und Ad β -p73 ist unter 2.2.8 beschrieben.

Nun wurden die einzelnen Pankreastumorzelllinien mit dem jeweiligen Virus mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) infiziert, die für eine erfolgreiche Infektion aller Zellen ausreichend war. Für eine 100%-ige Transduktion war für MZA Zellen eine MOI von 10, für AsPC-1 Zellen eine MOI von 30, für Capan-1 Zellen eine MOI von 100 und für Capan-2 Zellen eine MOI von 300 erforderlich. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe des AdGFPS-Kontrollvirus (codiert für die Spectrin-Variante des Green Fluorescent Protein,

GFPS; siehe Abb. 3.1.4) überprüft. Anschließend wurden die durch die Transgen-Expression vermittelten zytotoxischen Effekte und eine eventuelle Apoptose-Induktion in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei zeigten sich mit p53 teilweise sehr große Differenzen sowohl in der Apoptose-Induktion (Tab. 3.1.1 und Abb. 3.1.6) als auch in der vermittelten Zytotoxizität (Abb. 3.1.5, nur für MZA und AsPC-1 gezeigt) zwischen den einzelnen Zelllinien. Während die Adenovirus-vermittelte Wiedereinführung von Wildtyp-p53 in MZA und Capan-1 Zellen schon 48 h nach der Infektion zu massiver Zytotoxizität führte, die auf Apoptose beruhte, wie durch Durchflusszytometrie-Analysen gezeigt werden konnte, war die Wirksamkeit von Wildtyp-p53 in Capan-2 und AsPC-1 Zellen nur gering (Tab. 3.1.1 und Abb. 3.1.5 und 3.1.6). In letztgenannten Zelllinien wurden durch p53 nur wenige apoptotische Zellen nachgewiesen (Abb. 3.1.5 und 3.1.6). Die Apoptose-Raten schwankten zelllinienabhängig zwischen 3% in den AsPC-1 und 58% in MZA Zellen nach der Behandlung mit Adp53.

Dagegen zeigte sich in allen verwendeten Zelllinien nach der Behandlung mit Ad β -p73 eine starker Rückgang der Zahl lebender Zellen (Abb. 3.1.5, nur für MZA und AsPC-1 gezeigt). Auch hier wurden FACS-Analysen durchgeführt, die 48 h nach der Infektion in allen Zelllinien einen signifikanten Anstieg von sub-G1 Zellen zeigten, der kennzeichnend für Apoptose ist (Abb. 3.1.6). Die Zahl der apoptotischen Zellen schwankte hier zwischen 21% in Capan-2 und 72% in Capan-1 Zellen (Tab. 3.1.1 und Abb. 3.1.6). Die beobachteten zytotoxischen Effekte waren also auch bei β -p73 auf Apoptose zurückzuführen. Insgesamt war β -p73 effektiver als p53 in der Induktion von Apoptose und damit in der therapeutischen Wirksamkeit in den verwendeten Pankreastumorzelllinien. Nur in MZA Zellen zeigte p53 eine geringfügig stärkere Zytotoxizität und Apoptose-Induktionsraten (Abb. 3.1.5 und 3.1.6). Die andere eingesetzte p73-Isoform, α -p73, zeigte nur bei einer der Zelllinien, Capan-1, eine therapeutische Wirksamkeit (Tab. 3.1.1 und Abb. 3.1.5 und 3.1.6). Doch auch in den Capan-1 Zellen war die Wirksamkeit von α -p73 im Vergleich zu p53 und β -p73 weit geringer. In den anderen Zelllinien konnte man nach Behandlung mit Ad α -p73 in FACS-DNA-Profilen nur einen G1-Arrest erkennen im Vergleich zu Kontrollvirus-behandelten Zellen, jedoch keine Apoptose-Induktion (Abb. 3.1.6).

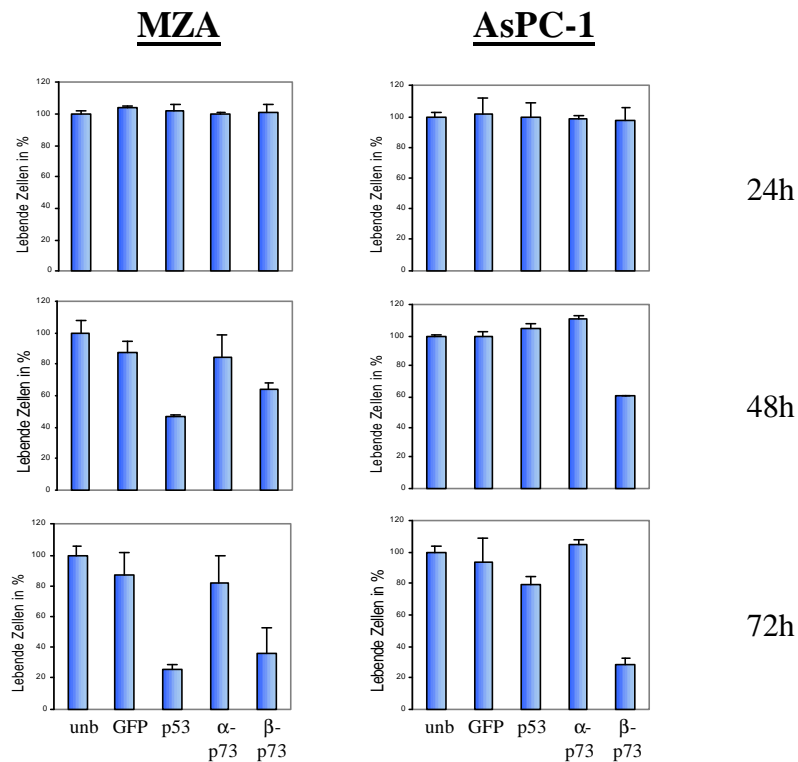


Abb. 3.1.5: Analyse der Lebensfähigkeit von humanen Pankreastumorzelllinien. Zellüberleben von MZA und AsPC-1 Zellen 24h, 48h und 72h nach Infektion mit AdGFPs (*GFP*), Adp53 (*p53*), Ad α -p73 (*a-p73*) oder Ad β -p73 (*b-p73*). Das Zellüberleben von unbehandelten Zellen (*unb*) wurde gleich 100% gesetzt. Die Bestimmung erfolgte durch einen MTT-Assay. Die Anzahl der lebenden Zellen ist der Mittelwert von drei verschiedenen wells \pm Standardabweichung (*Fehlerbalken*). Die Experimente wurden für jede Zelllinie dreifach durchgeführt.

Tabelle 3.1.1: Überprüfung der Apoptose-Induktion von p53 und p73 in Pankreastumorzelllinien (Durchflusszytometrie-Analysen)

Virus	<i>GFP</i> *	<i>p53</i> *	<i>a-p73</i> *	<i>b-p73</i> *
Zelllinie				
MZA	-	++	-	++
AsPC-1	-	-	-	++
Capan-1	-	++	+	++
Capan-2	-	+	-	+

* -: 0-10% sub G1; +: 10-30% sub G1; ++: > 30% sub G1
Messungen erfolgten 48h nach der Infektion

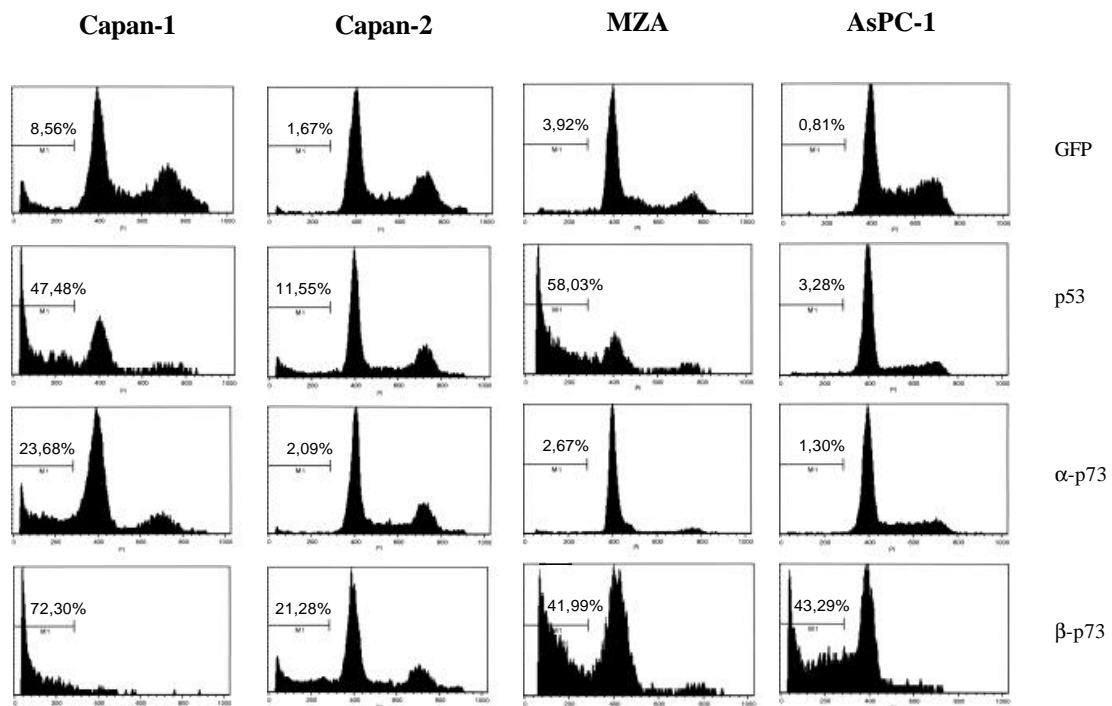


Abb. 3.1.6: Analyse der Apoptoserate von humanen Pankreastumor-Zelllinien. Durchflusszytometrie-DNA-Profile von MZA, AsPC-1, Capan-1 und Capan-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit AdGFPS (*GFP*), Adp53 (*p53*), Ad α -p73 (*α -p73*) und Ad β -p73 (*β -p73*). Die apoptotische Zellpopulation ist als M1 gekennzeichnet.

Bei den mit dem Kontrollvirus AdGFPS behandelten Zellen zeigte sich in keiner der untersuchten Pankreastumorzelllinien ein Anstieg in der sub-G1 Population, die beobachtete therapeutische Wirksamkeit von β -p73 und p53 war also nicht auf Virus-induzierte Effekte zurückzuführen. Die Beobachtung, dass β -p73 auch in den Zelllinien, in denen p53 gar keinen oder nur sehr geringen Effekt hatte, in der Lage war, effizient Apoptose zu induzieren, weist darauf hin, dass eine p73-Genexpression vielversprechend bei der Behandlung von p53-Genexpression-resistenten Krebsarten sein könnte.

Während der Durchführung dieser Arbeit konnte von einer anderen Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass ein Adenovirus-vermittelter Gentransfer von β -p73 auch *in vivo* antitumoral wirksam war [206]. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf *in vivo* Versuche mit Adp53 und Ad β -p73 verzichtet.

3.1.3 Untersuchung der fehlenden Apoptose-Induktion von p53 in AsPC-1 Zellen

Interessant war, dass es in AsPC-1 Zellen nur durch den adenoviralen Gentransfer von β -p73, nicht aber von Wildtyp-p53 zu einer Apoptose-Induktion kam, obwohl AsPC-1 Zellen p53-

negativ sind. Daher sollte nun untersucht werden, warum p53 in diesen Zellen nicht in der Lage ist, Apoptose zu vermitteln.

Als erstes wurde die p53-Protein-Expression in AsPC-1 Zellen nach Infektion mit Adp53 über einen längeren Zeitraum analysiert, um zu überprüfen, ob die p53-Proteinlevel rasch abgebaut werden. Als Positivkontrolle wurden in diesem und den nachfolgenden Experimenten H1299-Zellen (humane Lungenkrebszelllinie, p53-negativ) verwendet, für die gezeigt werden konnte, dass sowohl p53 als auch β -p73 und α -p73 (in geringerem Maße) effektiv Apoptose induzieren können [99]. H1299 und AsPC-1 Zellen wurden mit Adp53 infiziert, und die Protein-Expression mit Hilfe von Western-Blot-Analysen 24h, 48h und 72h nach der Infektion kontrolliert. Dabei konnte eine p53-Proteinexpression über den gesamten Zeitraum mit weitgehend gleichbleibenden Leveln in beiden Zelllinien detektiert werden (Abb. 3.1.7). Eine Abbau von p53-Proteinen konnte also in AsPC-1-Zellen nicht nachgewiesen werden.

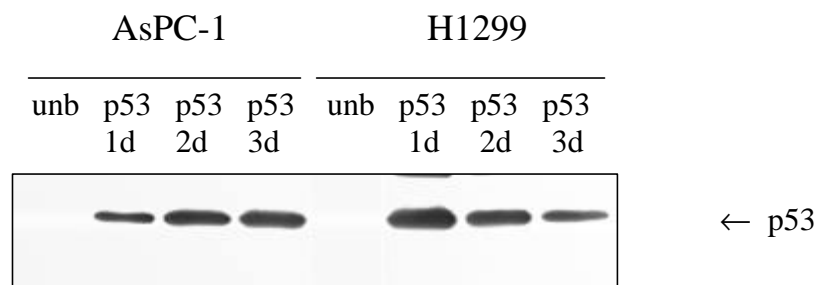


Abb. 3.1.7: Überprüfung der Protein-Expression des Adenovirus-Vektors Adp53 über einen längeren Zeitraum. AsPC-1 und H1299 Zellen wurden mit dem Virus infiziert und die Protein-Expression nach 24h, 48h und 72h überprüft. Western-Blot von p53, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle dienten. Eine p53-Proteinexpression war in beiden Zelllinien bei etwa gleichbleibenden Leveln im untersuchten Zeitraum nachweisbar.

Da kein p53-Protein-Abbau in AsPC-1 Zellen festgestellt werden konnte, mußte die fehlende Apoptose-Induktion andere Ursachen haben. Nun sollte die zelluläre Lokalisation von p53 untersucht werden, um festzustellen, ob p53 im Kern lokalisiert ist. Denn das p53 Protein ist ein Sequenz-spezifischer DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der nur im Zellkern seine Funktion ausüben kann. Daher wurden H1299 und AsPC-1 Zellen mit Adp53 infiziert und anschließend die Lokalisation des exogenen p53 analysiert. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und durch konfokale Lasermikroskopie sichtbar gemacht. Die Lokalisation des Zellkerns wurde dabei durch DAPI-Färbung detektiert. Es zeigte sich, dass sowohl in H1299 als auch in AsPC-1 Zellen die p53- und die Kern-Färbungen überlappend waren, und sich das p53 Protein daher im Zellkern befand (Abb. 3.1.8).

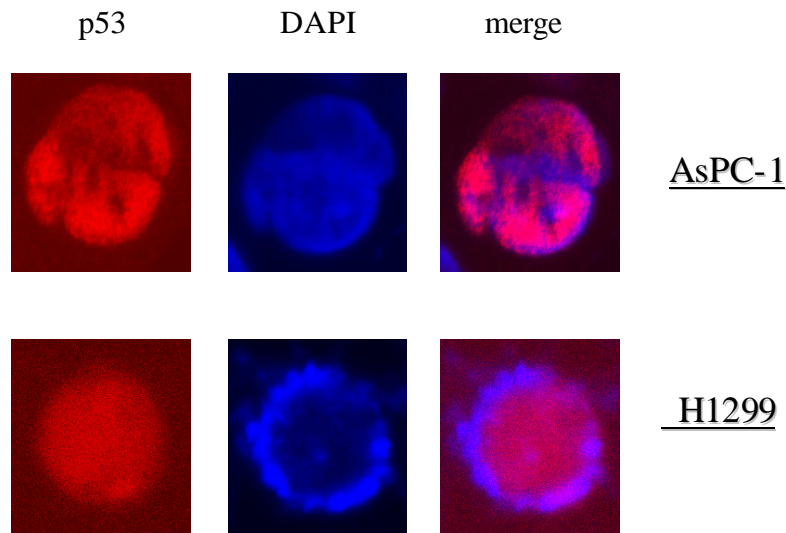


Abb. 3.1.8: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von AsPC-1 und H1299 Zellen 24h nach Infektion mit Adp53. Das p53-Protein wurde mit einem Alexa Fluor-gekoppelten Antikörper angefärbt (*p53*, linker Kasten). Die nukleare DNA wurde mit DAPI abgefärbt (*DAPI*, mittlerer Kasten). Die überlappende Lokalisation ist im rechten Kasten gezeigt (*merge*). Eine p53-Proteinlokalisierung war in beiden Zelllinien im Zellkern nachweisbar.

Sowohl die Dauer der Proteinexpression als auch die Kernlokalisierung von p53 ließen keine Rückschlüsse auf die geringe Wirksamkeit von p53 in AsPC-1 Zellen zu. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die beobachteten Differenzen in der Apoptose-Induktion zwischen p53 (keine Apoptose) und β -p73 (starke Apoptose) nach Überexpression in diesen Zellen auf eine unterschiedliche Regulation von apoptotischen Zielgenen zurückzuführen sind. Zum Vergleich wurden die Expressionslevel dieser Gene in AsPC-1 Zellen nach Infektion mit β -p73 kontrolliert. Dazu wurden AsPC-1 Zellen mit Adp53 und Ad β -p73 infiziert und 4h, 8h und 24h nach der Infektion wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Ein mehr als 2-facher Anstieg in den Expressionsleveln verglichen mit unbehandelten Zellen wurde als signifikant bezeichnet.

Die RT-PCR-Analysen ergaben, dass bis auf 14-3-3 σ alle untersuchten p53-Zielgene sowohl von p53 als auch von β -p73 aktiviert werden (Abb. 3.1.9), allerdings mit zum Teil erheblichen Unterschieden in der Stärke der Aktivierung (Tab. 3.1.2). Bei der Analyse der Expression von Genen, die als Antwort auf eine Aktivierung einen Wachstumsarrest vermitteln können, zeigte sich vor allen Dingen bei p21, einem bekannten Mediator von

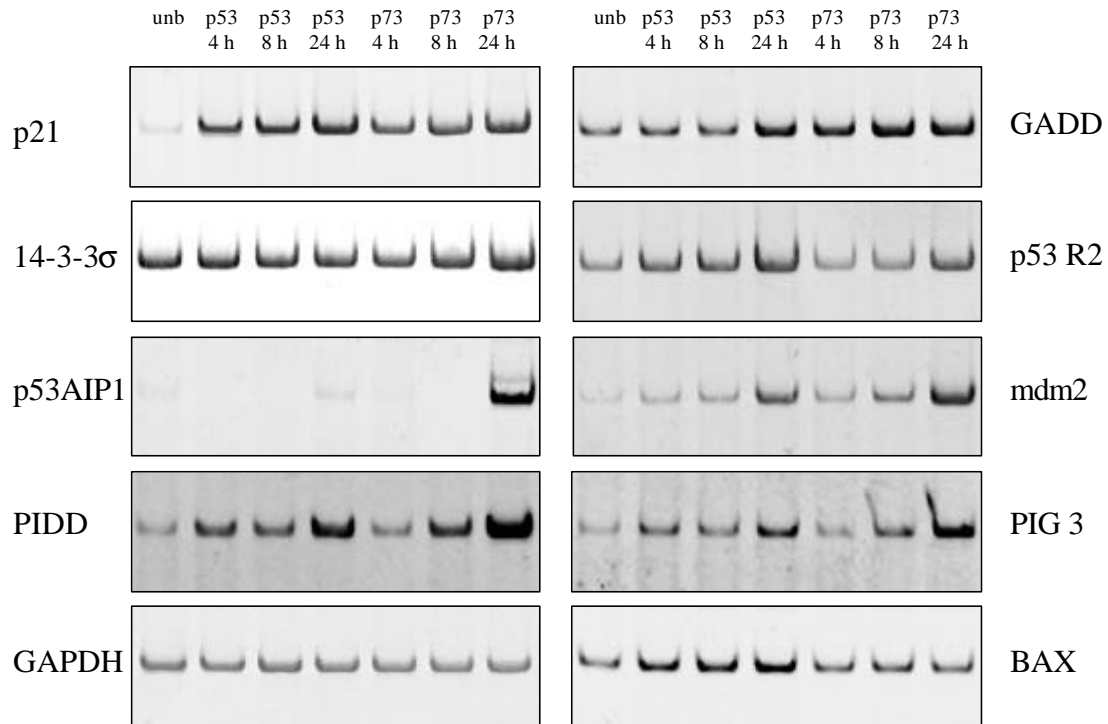


Abb. 3.1.9: Einige zelluläre p53-Zielgene werden in AsPC-1 Zellen von β -p73 anders als von p53 reguliert. AsPC-1 Zellen wurden 4h, 8h und 24h mit Adp53 oder Ad β -p73 behandelt, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Semiquantitative RT-PCR-Analysen von Gesamt-RNA für bekannte p53-Zielgene wurden unter linearen Amplifikations-Bedingungen durchgeführt. Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Expression ist als Kontrolle angegeben.

p53-induziertem Wachstumsarrest, ein starker Anstieg, der sowohl durch p53 als auch durch β -p73 induziert wurde (Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.2). Dagegen zeigte sich wie schon erwähnt bei 14-3-3 σ mit p53 kein Anstieg in der Genexpression, und auch mit β -p73 wurde 14-3-3 σ nur sehr schwach, aber nicht signifikant induziert (Tab. 3.1.2).

Weitere Analysen zeigten, dass Mdm2, ein Onkogen und negativer Regulator von p53, von β -p73 und p53 signifikant induziert wurde, wobei der durch β -p73 vermittelte Anstieg fast doppelt so hoch war (Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.2). Die nach einer DNA-Schädigung in die DNA-Reparatur involvierten Gene GADD 45 und p53 R2 zeigten sowohl mit Adp53 als auch mit Ad β -p73 einen leichten, etwa 2-3-fachen Anstieg in den Expressionsleveln (Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.2).

Bei der Analyse von mehreren pro-apoptotischen p53-Zielgenen zeigte sich, dass Bax nur sehr schwach von β -p73 aktiviert wurde und auch p53 nur eine geringfügig stärkere, wenn auch signifikante Induktion vermittelte (Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.2). Die anderen untersuchten Apoptose-Mediatoren zeigten jedoch mit β -p73 einen deutlich stärkeren Anstieg in ihren Expressionsleveln als mit p53. Während die Unterschiede bei PIDD und PIG3 noch recht

moderat waren und auch p53 einen erkennbaren Anstieg der Expressionslevel hervorrief, zeigten sich bei p53AIP1, einem p53-Zielgen, das über die Mitochondrien Apoptose induziert, sehr deutliche Differenzen. Die Induktion durch p53 war nur sehr schwach (1,5-fach), aber β -p73 induzierte einen 10-fach höheren Anstieg in den Expressionsleveln von p53AIP1 (Abb. 3.1.9 und Tab. 3.1.2).

Die bezogen auf unbehandelte Zellen etwa 15-fache Aktivierung von p53AIP1 durch β -p73 war die deutlich höchste bei allen untersuchten Genen.

Tabelle 3.1.2: Zusammenfassung der RT-PCR-Daten in AsPC-1 Zellen.

	p53*	β-p73*
<i>Wachstumsarrest</i>		
p21	8,4	8,4
14-3-3 σ	1	1,4
<i>Feedback Regulation</i>		
mdm2	4,7	8,2
<i>DNA-Reparatur</i>		
p53 R2	2,7	2,2
GADD 45	2,0	2,5
<i>Apoptose</i>		
Bax	2,1	1,3
PIDD	3,2	4,8
PIG 3	2,5	3,8
p53 AIP1	1,5	15,4

*Angegeben ist der maximale Anstieg der mRNA Expressionslevel der mit den jeweiligen Viren behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben (gleich 1 gesetzt).

3.1.4 Fehlende Ser-46-Phosphorylierung von p53 in AsPC-1 Zellen verhindert die Aktivierung von p53AIP1

Ziel der weiteren Untersuchungen war es, die Ursache für die fehlende Aktivierung von p53AIP1 in AsPC-1 Zellen nach Infektion mit Adp53 zu finden. Es war bekannt, dass eine Infektion mit einem Adenovirus-Vektor, der Wildtyp-p53 exprimiert, in H1299 Zellen zu einer starken Induktion von Apoptose führt [66]. Dabei kam es in RT-PCR-Analysen und auch im Western-Blot zu einem deutlichen Anstieg in den Expressionsleveln von p53AIP1.

Dies konnte in eigenen Experimenten in H1299 Zellen mit Adp53 bestätigt werden (ausgenommen Western-Blot, Daten hier nicht gezeigt). Dabei zeigten Oda et al. [66], dass p53AIP1 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von p53-abhängiger Apoptose besitzt, und dass die transkriptionelle Aktivierung von p53AIP1 über die Phosphorylierung von p53 am Serin-Rest 46 (Ser-46) reguliert wird.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob das nach Infektion mit Adp53 in AsPC-1 Zellen exprimierte p53-Wildtyp-Protein am Ser-46 phosphoryliert wird. Dazu wurden AsPC-1 Zellen und H1299 Zellen (Positivkontrolle) mit Adp53 infiziert und die Protein-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten im Western-Blot kontrolliert (Abb. 3.1.10). p53 wurde dabei zuerst mit einem Antikörper detektiert, der das p53-Protein unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand erkennt. Dabei wurde p53 in beiden Zelllinien im untersuchten Zeitraum detektiert (Abb. 3.1.10, A). Ganz andere Ergebnisse wurden dagegen mit den gleichen Proben bei Verwendung eines Antikörpers erhalten, der das p53-Protein nur bei vorliegender Phosphorylierung des Serin-Restes 46 erkennt. Übereinstimmend mit den bekannten Ergebnissen [66] konnte das p53-Protein weiterhin in mit Adp53 behandelten H1299 Zellen detektiert werden, das p53-Protein war hier also am Ser-46 phosphoryliert worden. Die mit Adp53 infizierten AsPC-1 Zellen ergaben jedoch kein Signal (Abb. 3.1.10, B).

Weitere Untersuchungen zu diesem Thema stehen noch aus.

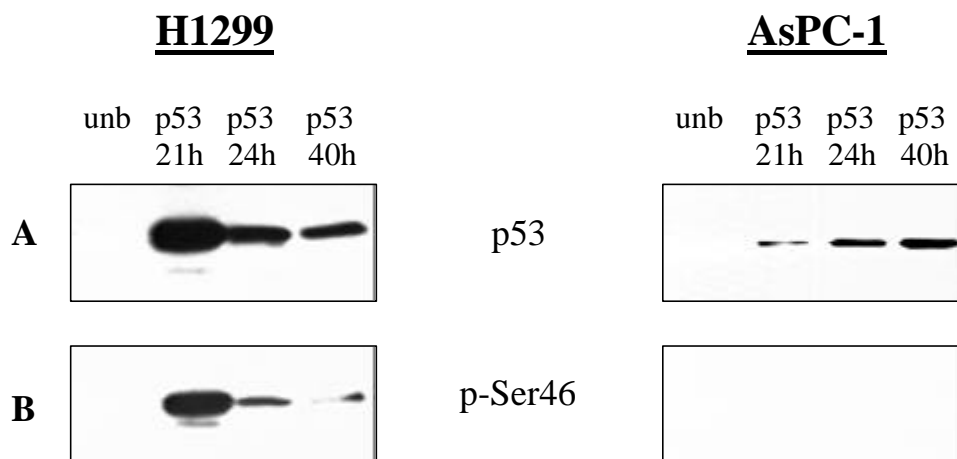


Abb. 3.1.10: Überprüfung der Phosphorylierung von p53 am Ser-46 über einen längeren Zeitraum. AsPC-1 und H1299 Zellen wurden mit Adp53 infiziert und die Protein-Expression nach 21h, 24h und 40h überprüft. Western-Blot-Analyse von p53, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle dienten. **A)** Eine p53-Proteinexpression war in beiden Zelllinien bei etwa gleichbleibenden Leveln im untersuchten Zeitraum mit anti-p53 Antikörper nachweisbar. **B)** Eine Phosphorylierung von p53 am Ser-46 war nur in H1299 Zellen zu detektieren unter Verwendung eines anti-p53-P-Ser-46-Antikörpers.

3.2 Therapeutische Wirksamkeit von E2F1 beim Pankreaskarzinom

E2F1 löst in einer Reihe von Zellsystemen Apoptose aus, entweder allein oder in Verbindung mit p53 [107]. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob eine E2F1-Genexpression auch das Überleben von Pankreastumor-Zelllinien beeinflussen kann. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien mit dem AdER-E2F1-Vektor, bei dem die Transgen-vermittelte Toxizität durch die Fusion an die Tamoxifen-induzierbare Östrogenrezeptor-Liganden-Bindungsdomäne reguliert ist, infiziert. Für diesen Vektor konnte gezeigt werden, dass er in Tumorzellen, denen funktionelles p53 fehlt, effizient Zelltod induzieren kann [207]. Das ist für das hier untersuchte Tumormodell von Bedeutung, da p53 in bis zu 70% aller Pankreasadenokarzinome mutiert ist. Das Fehlen von funktionellem p53 wird als eine der Ursachen für die Verhinderung von Apoptose angesehen, die zu einer Resistenz gegenüber Radio- oder Chemotherapie führt [208]. Daher stellt eine Regulierung des Apoptose-Signalweges, z.B. über E2F1, ein sinnvolles Angriffsziel für eine therapeutische Intervention beim Pankreaskarzinom dar.

3.2.1 Überprüfung der Expression von ER-E2F1 in Pankreastumor-Zelllinien

Bei dem für die *in vitro* Experimente verwendeten AdER-E2F1-Vektor wird die Aktivität des exprimierten ER-E2F1 Fusions-Proteins durch die Liganden-induzierte Translokation des Proteins aus dem Cytosol in den Nukleus als Folge der Bindung von 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) an die ER-Domäne reguliert. Um an die DNA binden und dann seine apoptotische Funktion ausüben zu können, muss E2F1 im Nukleus lokalisiert sein. Daher kann das ER-E2F1 Protein nur in Gegenwart von 4-OHT funktionell aktiv werden [207].

Die Pankreastumor-Zelllinien wurden *in vitro* mit AdER-E2F1 mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) infiziert, die eine 100%-ige Transduktion der jeweiligen Zelllinie sicherstellte. Die Expression von ER-E2F1 wurde nach 1, 3 und 5 Tagen kontrolliert. Dabei zeigte sich in allen Zelllinien eine konstante Expression des Proteins in dem untersuchten Zeitraum (Abb. 3.2.1).

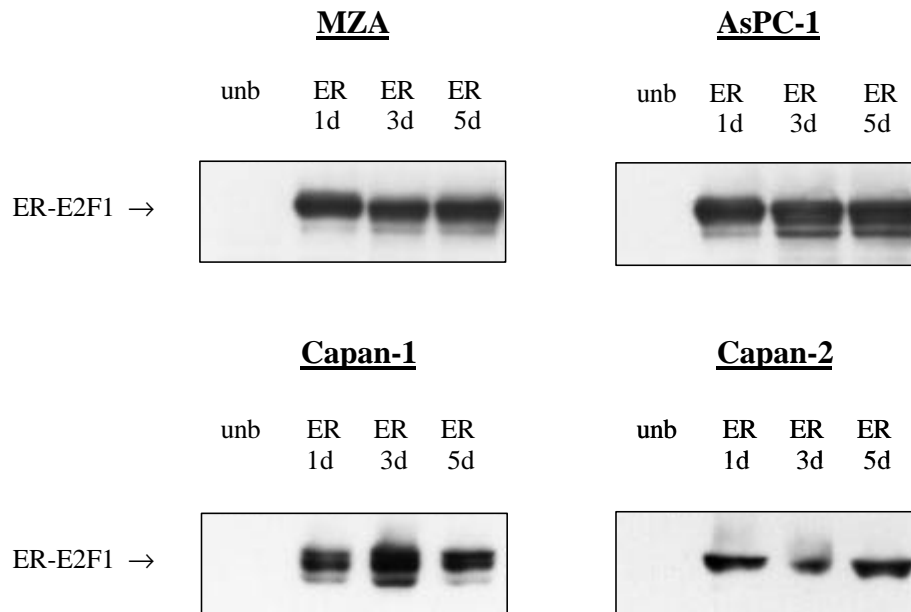


Abb. 3.2.1: Überprüfung der ER-E2F-Expression in verschiedenen humanen Pankreastumorzellen. Western-Blot von E2F1, wobei die Transgen-Expression vor und 1, 3 und 5 Tage nach der Infektion bestimmt wurde. Da nur die Expression überprüft werden sollte, wurde die Infektion ohne Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) durchgeführt, d.h. ER-E2F1 verblieb im Cytosol und konnte nicht therapeutisch wirksam werden.

3.2.2 Wirksamkeit von E2F1 und Gemcitabine in Pankreastumorzellen

Um den Einfluß von E2F1 auf das Zellwachstum und -überleben von Pankreastumorzellen zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit AdER-E2F1 in Gegenwart von 4-Hydroxy-Tamoxifen infiziert. Dabei waren zum Teil große Unterschiede in der Wirksamkeit von E2F1 zwischen den einzelnen Zelllinien feststellbar (Abb. 3.2.2 und 3.2.3). Um zu bestimmen, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen und das verringerte Zellüberleben gegenüber unbehandelten Zellen (anhand von MTT-Assays bestimmt, siehe Abb 3.2.3) auf eine durch den Einfluß von E2F1 vermittelte Apoptose zurückzuführen waren, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch E2F1 induzierte Zytotoxizität im Wesentlichen auf Apoptose beruht (Abb 3.2.4, IV). Die Apoptose-Raten schwankten dabei zelllinienabhängig zwischen ungefähr 6% in MZA bis zu 44% in Capan-1.

Das gegenwärtig in der Klinik gebräuchlichste Chemotherapeutikum für die Behandlung von Pankreastumor-Patienten mit fortgeschrittener Krankheit ist Gemcitabine, ein Desoxycytidin-Analogon. Als nächstes wurde daher die therapeutische Wirksamkeit von

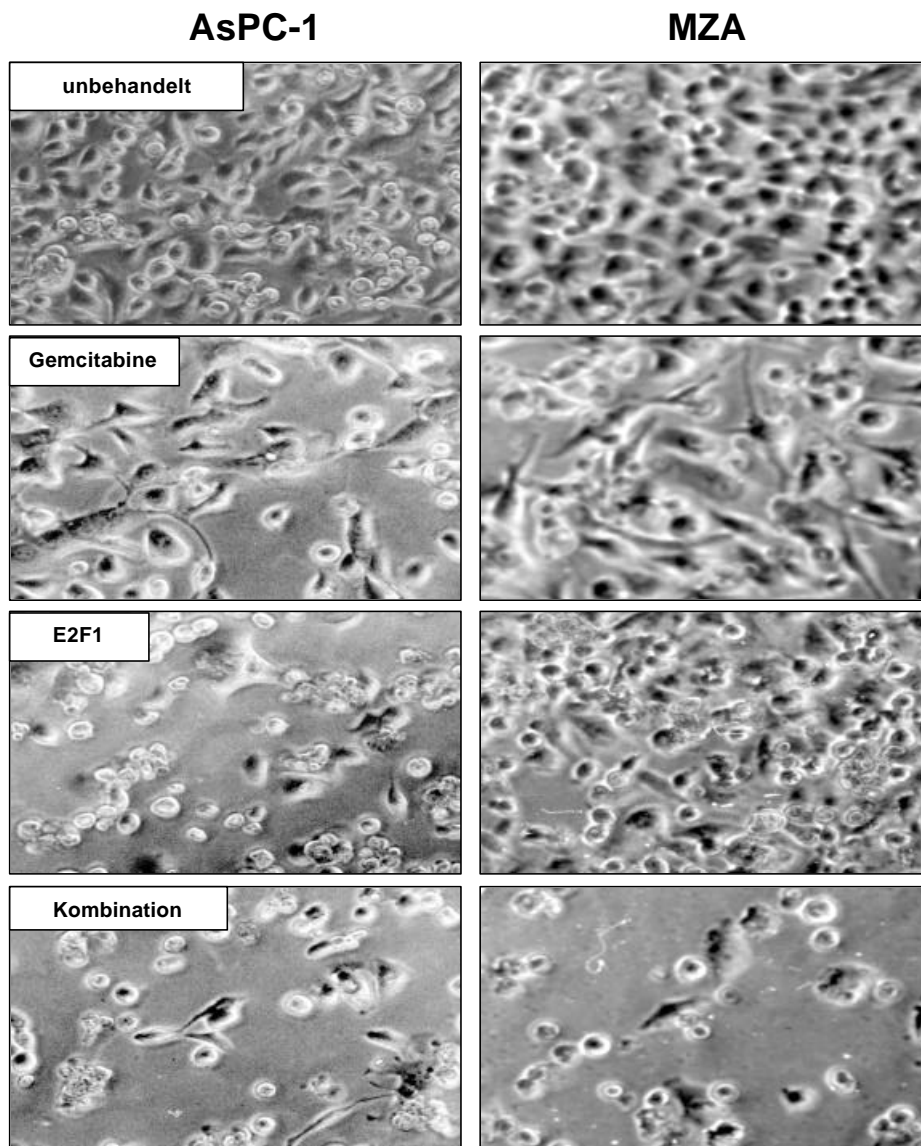


Abb. 3.2.2: Morphologische Veränderungen in Pankreastumorzellen, die durch AdER-E2F1, Gemcitabine oder die Kombination von beiden Behandlungen hervorgerufen wurden. Dargestellt sind Phasenkontrast-Mikroskopaufnahmen von AsPC-1 (links) und MZA Zellen (rechts) 48 h nach der Behandlung mit Gemcitabine, AdER-E2F1 in Anwesenheit von 4-OHT oder der Kombination von beiden im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Gemcitabine bei der Behandlung der Pankreastumorzelllinien untersucht. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die Zytotoxizität von Gemcitabine stark von der Menge des in die zelluläre DNA aufgenommenen Medikamentes abhängt, wobei die maximal erreichbare intrazelluläre Konzentration bei 20 μM liegt [209, 210]. Deshalb wurde Gemcitabine in den Experimenten mit einer klinisch relevanten Dosis von 10 μM eingesetzt. Dabei zeigten sich vergleichbare Zytotoxizitäts-Level mit geringen Unterschieden zwischen

den einzelnen Zelllinien (Abb. 3.2.2 und 3.2.3). Auch hier ergaben FACS-Analysen, dass ein Teil der durch Gemcitabine vermittelten Zytotoxizität auf Apoptose beruht (Abb. 3.2.4, II). Anschließend wurde die therapeutische Wirksamkeit von E2F1 in Kombination mit Gemcitabine untersucht. Hierbei zeigte sich in allen verwendeten Zelllinien ein starker Rückgang der Anzahl lebender Zellen (Abb. 3.2.3) und morphologische Veränderungen, die charakteristisch für apoptotische Zellen sind. Dies wurde für MZA und AsPC-1 Zellen mit Hilfe von Hoechst-33342 Färbung (Daten nicht gezeigt) und Phasenkontrast-Mikroskopieaufnahmen (Abb. 3.2.2) gezeigt. FACS-Analysen von allen verwendeten Zelllinien 48h nach Beginn der Kombinations-Therapie zeigten deutlich einen signifikanten Anstieg von sub-G1 Zellen (Abb. 3.2.4, V), kennzeichnend für Apoptose.

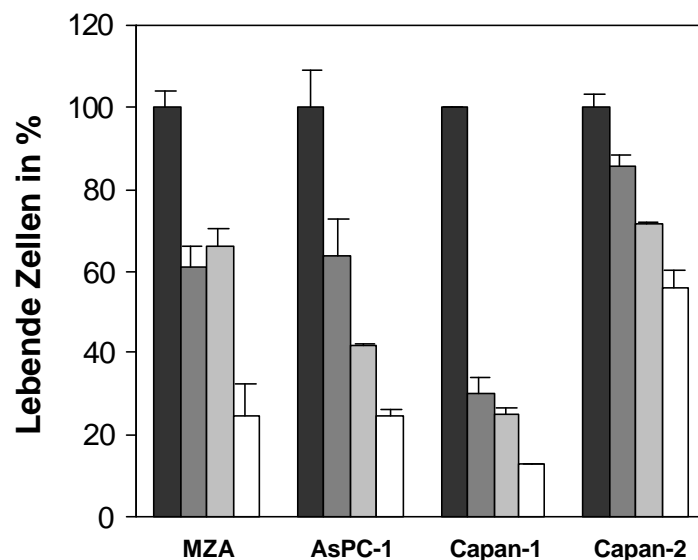


Abb. 3.2.3: Analyse der Lebensfähigkeit von humanen Pankreastumor-Zelllinien. Zellüberleben von MZA, AsPC-1, Capan-1 und Capan-2 Zellen 72 h nach Behandlung mit Gemcitabine (*dunkelgrauer Balken*), AdER-E2F1 in der Gegenwart von 4-OHT (*■*) und der Kombination von AdER-E2F1 plus Gemcitabine (*□*), mit Hilfe eines MTT-Assays gemessen. Das Zellüberleben von unbehandelten Zellen (*■*) wurde gleich 100% gesetzt. Die Anzahl der lebenden Zellen ist der Mittelwert von drei verschiedenen wells \pm Standardabweichung (*Fehlerbalken*). Die Experimente wurden für jede Zelllinie dreifach durchgeführt.

Obwohl E2F1 alleine in MZA und Capan-2 Zellen keine oder nur sehr geringe Wirksamkeit zeigte, erhöhte es eindeutig die Empfindlichkeit der Zellen für Gemcitabine-induzierte Apoptose, resultierend in 23% bzw. 38% apoptotischen Zellen (MZA bzw. Capan-2, Abb. 3.2.4, V). Die Kombinations-Therapie zeigte in allen untersuchten Zelllinien die größte Toxizität und den höchsten Anteil an apoptotischen Zellen (Abb. 3.2.3 und Abb. 3.2.4, V). Dagegen zeigte sich kein Anstieg in der sub-G1 Population bei den unbehandelten Kontrollen

(Abb. 3.2.3, I), und auch nicht bei den mit AdER-E2F1 in der Abwesenheit von 4-OHT infizierten Zellen (Abb. 3.2.4, III; hier exemplarisch nur für MZA und AsPC-1 gezeigt). Diese Daten weisen darauf hin, dass ein E2F1-vermitteltes Absterben von Pankreastumorzellen durch Gemcitabine-Behandlung wirkungsvoll gesteigert werden kann.

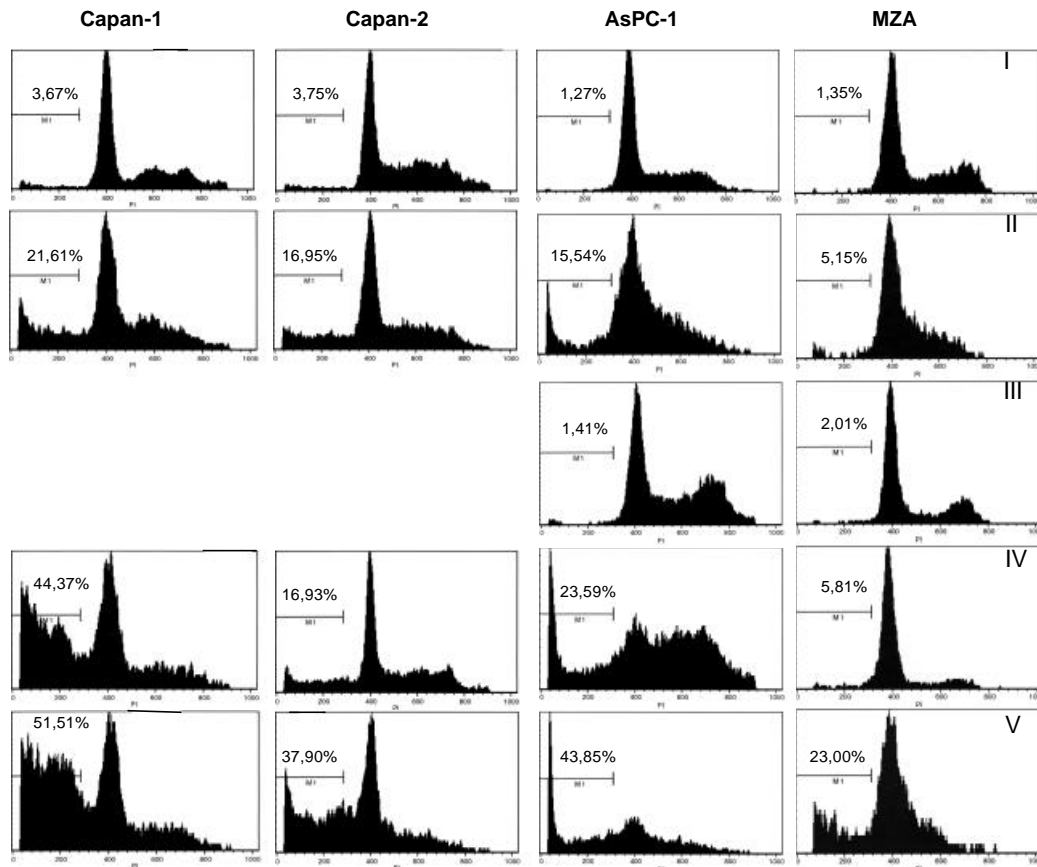


Abb. 3.2.4: Analyse der Apoptoserate von humanen Pankreastumor-Zelllinien. Durchflusszytometrie-DNA-Profile von MZA, AsPC-1, Capan-1 und Capan-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit mock (I), Gemcitabine (II), AdER-E2F1 in Abwesenheit (III) und in der Gegenwart von 4-OHT (IV) und der Kombination von AdER-E2F1 plus Gemcitabine (V). Die apoptotische Zellpopulation ist als M1 gekennzeichnet.

3.2.3 Untersuchung des Mechanismus der durch E2F1 und Gemcitabine vermittelten Apoptose

Ein Mechanismus der von E2F1 induzierten Apoptose beruht auf der Aktivierung des CDKN2A Transkripts p14ARF, was zu p53-abhängiger Apoptose führt [211]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die apoptotische Aktivität von E2F1 zusätzlich auf der Fähigkeit beruht, die Expression des p53-Familienmitgliedes p73 zu induzieren durch direkte Bindung an den TP73-Promotor [116].

Übereinstimmend mit der häufigen Inaktivierung von p53 beim Pankreaskarzinom, konnte in MZA Zellen kein Anstieg der p53-Proteinlevel nach E2F1-Expression beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass die Aktivierung des p53-Signalweges nicht an der E2F1-vermittelten Apoptose beteiligt ist, sowohl in MZA-Zellen als auch in p53-negativen AsPC-1 Zellen (Abb. 3.2.5). Dagegen korrelierte die apoptotische Aktivität von E2F1 direkt mit der Induktion von TP73 (Abb. 3.2.5). In den AsPC-1 Zellen war E2F1 allein in der Lage, die TP73-Expression und Apoptose zu induzieren. Im Gegensatz dazu wurde diese Wirkung in den MZA Zellen nur durch die Kombinations-Therapie erreicht. Das legt die Vermutung nahe, dass für eine effiziente Induktion von Apoptose die Aktivierung von TP73 benötigt wird. Es konnte nicht geklärt werden, warum TP73 in den MZA Zellen nicht von E2F1 allein induziert werden kann.

Weitere Untersuchungen zum Mechanismus stehen hier noch aus.

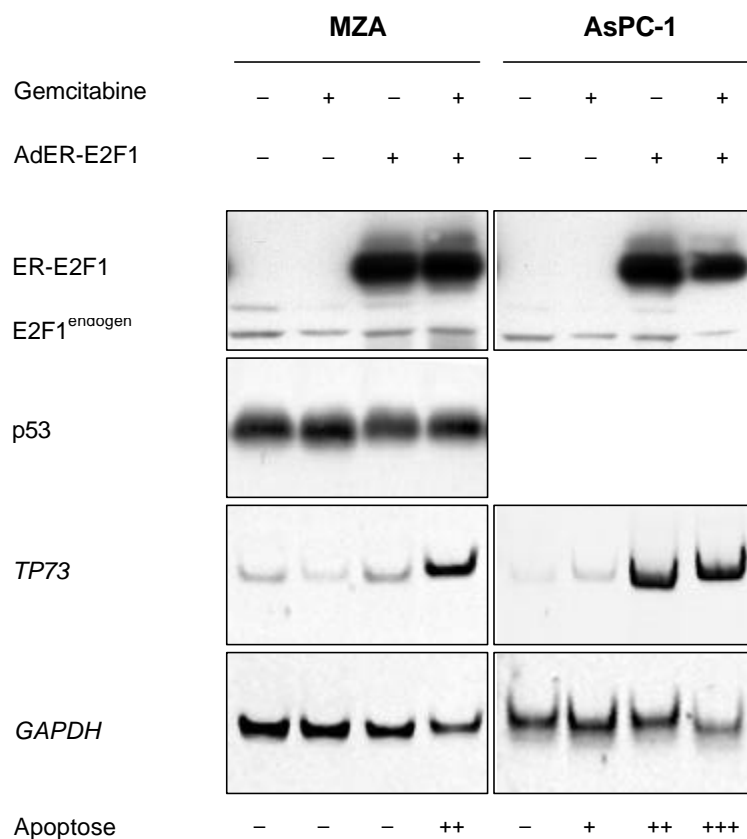


Abb. 3.2.5: Kombinations-Behandlung korreliert in MZA und AsPC-1 Zellen mit der TP73 Expression. Dargestellt sind Western-Blots von E2F1 und p53 und die RT-PCR-Analyse der TP73-Expression 48 h nach der Behandlung mit Gemcitabine, AdER-E2F1 oder der Kombination von beiden. Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Expression ist als Kontrolle für die RT-PCR dargestellt. Der Grad der Apoptose ist folgendermaßen gekennzeichnet: -: keine Apoptose; +: > 10%; ++: > 20%; +++: > 40% sub-G1 Population.

3.2.4 Die Wirksamkeit der E2F1/Gemcitabine-Kombinationstherapie *in vivo*

Aufbauend auf den erhaltenen *in vitro* Daten wurde anschließend die therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie in Mäusen analysiert. Aufgrund der Unhandlichkeit des ER-Systems bei *in vivo* Experimenten sollten diese mit einem E2F1-exprimierenden adenoviralen Drittgenerationsvektor, einem sogenannten "gutless"-Vektor, durchgeführt werden. Bei diesen Vektoren sind die adenoviralen Gensequenzen vollständig deletiert, so dass eine gegen den Vektor gerichtete Immunantwort verhindert werden sollte und die Transgen-Expression daher über einen langen Zeitraum erfolgt [191]. Dieser E2F1 exprimierende HD (helper dependent) Ad-vektor (HD-AdE2F1, siehe Abb. 3.2.7, hergestellt von B.M. Pützer) wurde zuerst *in vitro* auf seine E2F1-Expression getestet. Die nun folgenden Experimente wurden in MZA Zellen durchgeführt, da in diesen Zellen die

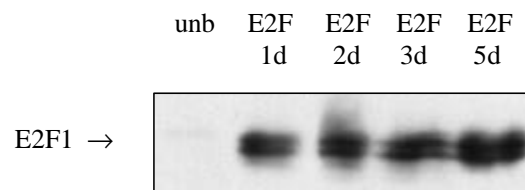


Abb. 3.2.6: Überprüfung der E2F1-Expression in MZA Zellen. Western-Blot von E2F1, wobei die Transgen-Expression vor und 1, 2, 3 und 5 Tage nach der Infektion bestimmt wurde.

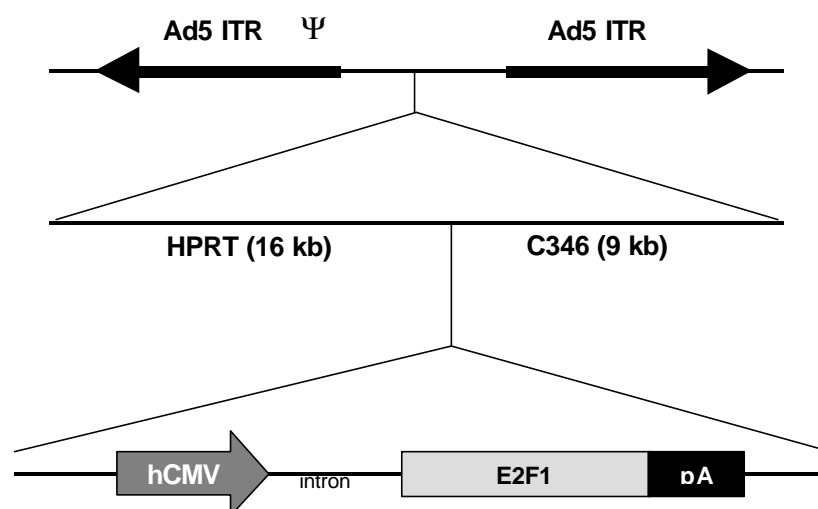


Abb. 3.2.7: Struktur von HD-AdE2F1. Die E2F1 Expressions-Kassette enthält das rabbit β -Globin Intron vor der E2F1 cDNA, die unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors steht und von dem BGH Poly (A) Signal beendet wird, wie unter "2. Material und Methoden" beschrieben.

Kombinationstherapie die stärksten Effekte verglichen mit den jeweiligen Einzeltherapien gezeigt hatte. Für die Vektor-Austestung wurden MZA Zellen mit HD-AdE2F1 infiziert, und die E2F1-Expression über einen Zeitraum von 5 Tagen kontrolliert. Dabei zeigte sich eine konstante Expression des Proteins in dem untersuchten Zeitraum (Abb. 3.2.6).

Etablierte subkutane MZA-Tumoren wurden mit dem E2F1-exprimierenden Ad-Vektor entweder allein oder in Kombination mit Gemcitabine (intraperitoneale Gemcitabine-Injektionen (60 mg/kg) über einen Zeitraum von 10 Tagen (am Tag 1, 4, 7 und 10)). Dabei wurden jeweils 3×10^{12} Partikel von HD-AdE2F1 injiziert. Die Tumoren wurden dann auf Rückbildung hin überwacht. Als Vergleich dienten Tumoren, die mit dem Kontrollvirus HD-AdGFPS behandelt worden waren.

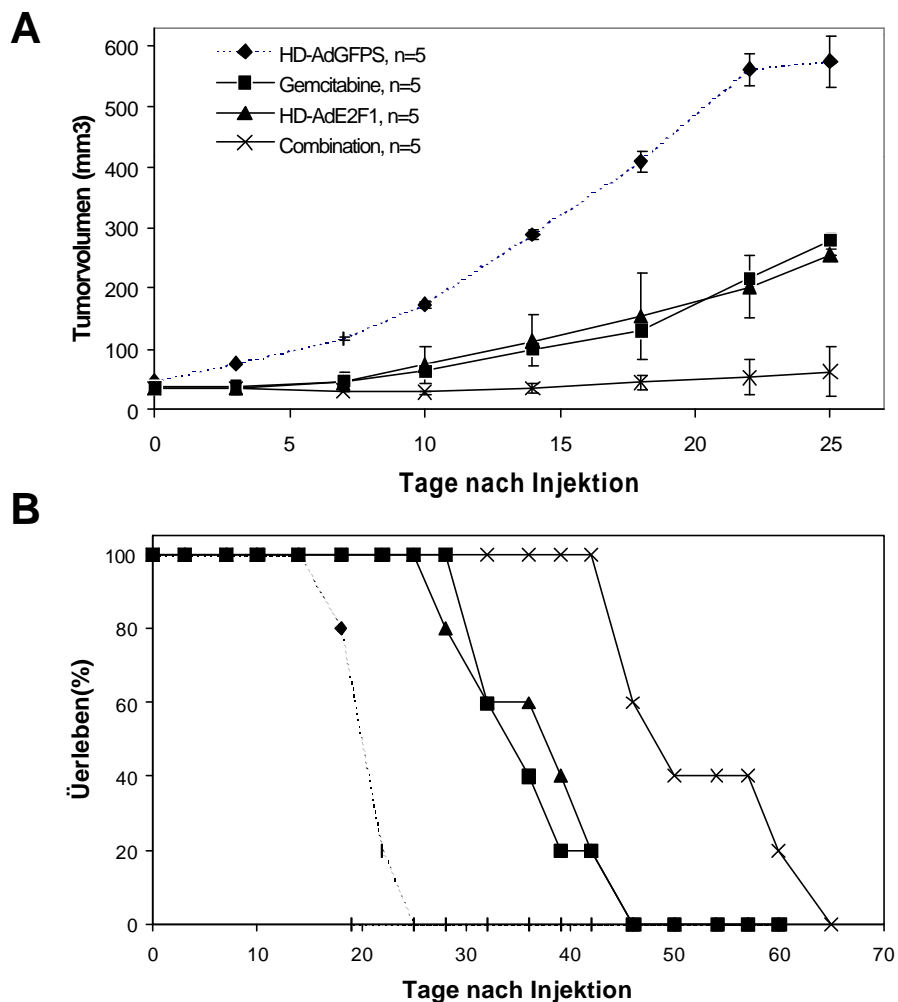


Abb. 3.2.8: Antitumorale Wirksamkeit der Kombinations-Behandlung mit HD-AdE2F1 und Gemcitabine bei etablierten Pankreastumoren. **A:** Das mittlere Tumolvolumen der Mäuse, alle 3-5 Tage gemessen. **B:** Langfristiges Überleben der Versuchstiere. ♦ HD-AdGFPS (n=5); Gemcitabine (n=5); HD-AdE2F1 (n=5); ◻ HD-AdE2F1 + Gemcitabine (n=5). Die Tumoren wurden entweder mit mehreren intraperitonealen Injektionen von Gemcitabine (60 mg/kg) über einen Zeitraum von 10 Tagen (am 1., 4., 7. und 10. Tag), mit einer direkten Injektion von HD-AdE2F1 (3×10^{12} Partikel), oder der Kombination von Gemcitabine und HD-AdE2F1 behandelt. HD-AdGFPS wurde als Kontrolle verwendet.

Sowohl die Behandlung mit Gemcitabine als auch die mit HD-AdE2F1 allein zeigten eine ähnliche antitumorale Wirksamkeit, wobei es in beiden Fällen zu einem verzögerten Tumorwachstum im Vergleich zu den Kontrollvirus behandelten Tieren kam. Allerdings konnten beide Behandlungsmethoden die Tumorprogression nicht verhindern (Abb. 3.2.8, A). Einen deutlichen Einfluss auf das Tumorwachstum zeigte nur die Kombinationstherapie von HD-AdE2F1 und Gemcitabine, die eine beträchtliche Verzögerung des Tumorwachstums über mehr als 25 Tage verursachte, verglichen mit Mäusen, die entweder nur mit Gemcitabine oder nur mit HD-AdE2F1 behandelt worden waren (Abb. 3.2.8, A). Daraus resultierte eine um 3 Wochen verlängerte Überlebenszeit (Abb. 3.2.8, B).

Diese Daten sprechen für die therapeutische Effizienz von E2F1 in Kombination mit Gemcitabine als vielversprechenden Ansatz bei der Behandlung von Pankreastumoren.

3.3 Immuntherapie beim Pankreaskarzinom

Es war bekannt, dass die Kombination von IL-12 und B7.1 bei Mäusen, die Tumoren eines sehr immunogenen murinen Brustadenokarzinoms trugen (Polyoma middle T transgenes Mausmodell, PyMT), sehr erfolgreich war [175]. Dabei genügte eine einzige intratumorale Injektion einer niedrigen Dosis eines Ad-Vektors, der sowohl IL-12 als auch B7.1 exprimiert (AdIL-12/B7.1), um eine komplette Tumorregression und eine protektive Immunität in der Mehrzahl der Versuchstiere zu erreichen, und dass schon bei relativ niedrigen Vektorkonzentrationen ($2,5 \times 10^7$ und 1×10^8 plaque-forming units, pfu) [175]. Um zu überprüfen, ob ein Adenovirus-vermittelter IL-12/B7.1 *in vivo* Gentransfer auch in Pankreastumoren, die meist weit weniger immunogen sind, wirksam ist, wurden nichtimmunogene Pan 02 Zellen für die Tumorinduktion verwendet. Pan 02 ist eine hochtumorigene, murine Pankreaskrebs-Zelllinie mit duktaler Morphologie, die aus mit 3-Methylcholantren (3-MCA) in weiblichen C57BL/6 Mäusen induzierten Tumoren gewonnen wurde. Diese Zelllinie führt nach subkutaner Inokulation zu schnell wachsenden Tumoren, die sehr resistent gegenüber allen Arten von Chemotherapeutika sind [202].

3.3.1 Quantifizierung von IL-12 und B7.1 in Pan 02 Pankreaskrebszellen

Pan 02 Zellen wurden *in vitro* mit AdIL-12/B7.1 und AdIL-12 (Adenovirus-Vektor, der nur IL-12 exprimiert) infiziert. Dabei wurden die Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, MOI) von 100 behandelt, d.h. es wurden 100 infektiöse Partikel pro Zelle eingesetzt, um zu garantieren, dass nahezu alle Zellen auf der Zellkulturplatte infiziert werden konnten. Wie in Abbildung 3.3.1 zu sehen ist, wurden 1 bis 5 Tage nach Infektion für beide Vektoren hohe Expressionslevel an murinem IL-12 im Überstand detektiert (15-17 $\mu\text{g/ml}$ mit AdIL-12/B7.1 und 7-19 $\mu\text{g/ml}$ mit AdIL-12).

In Abbildung 3.3.2 ist gezeigt, dass schon nach einem Tag ungefähr 99% der mit AdIL-12/B7.1 infizierten Pan 02 Zellen im Vergleich mit nicht infizierten Zellen, die nur eine sehr geringe Expression zeigten (4%), B7.1 positiv sind. Die gleichen Verhältnisse wurden 3 und 5 Tage nach der Infektion erhalten.

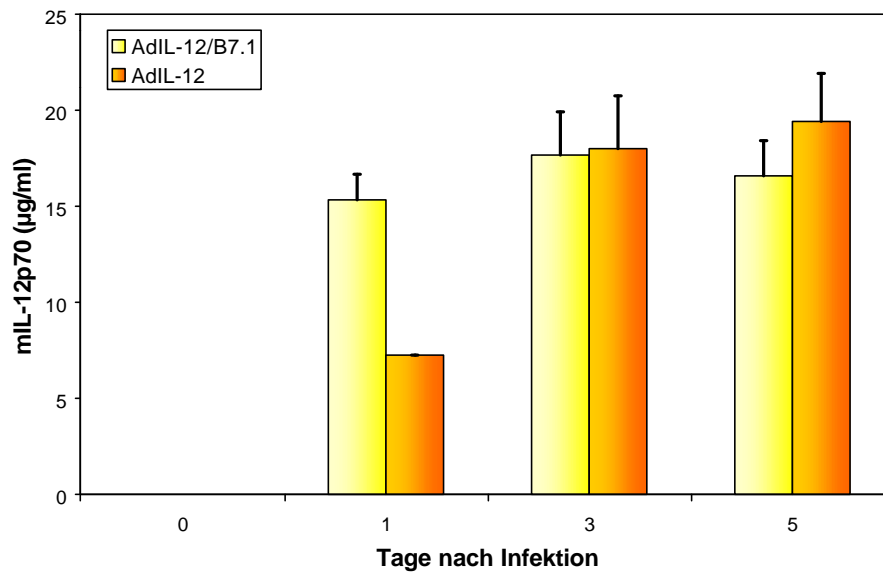


Abb. 3.3.1: IL-12 Expression in Pan 02 Pankreaskrebszellen. Die Transgen-Expression wurde vor und 1, 3 und 5 Tage nach der Infektion mit einer MOI von 100 gemessen. Die IL-12 Konzentration pro Milliliter Überstand wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt unter Verwendung eines anti-Maus IL-12p70 Antikörpers. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmungen analysiert. Die Standardabweichungen sind angegeben.

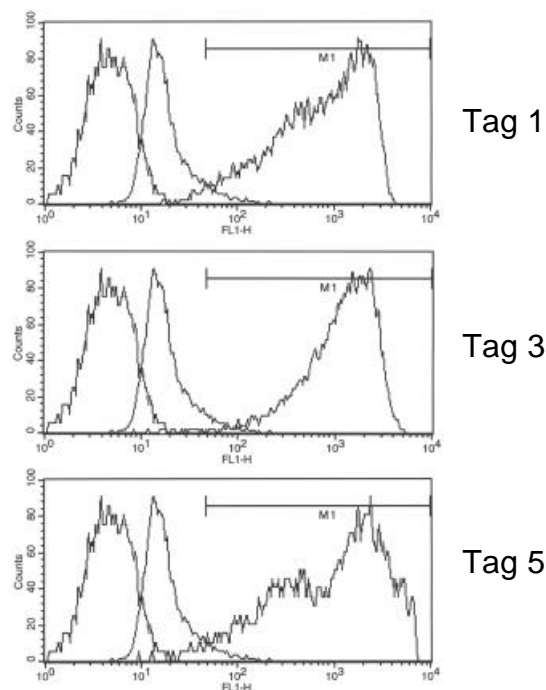


Abb. 3.3.2: B7.1 Expression in Pan 02 Pankreaskrebszellen. Die Transgen-Expression wurde vor und 1, 3 und 5 Tage nach der Infektion mit einer MOI von 100 gemessen. Um B7.1 zu detektieren, wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-Maus B7.1 Antikörper gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Die mittlere Kurve sind nicht infizierte Pan 02 Zellen. Im Vergleich mit der Negativkontrolle (nicht infizierte humane AsPC-1 Zellen, linke Kurve) zeigten nicht infizierte Pan 02 Zellen nur eine sehr geringe B7.1 Expression (4% nach 72h). Die Zellen, die positiv für B7.1 detektiert wurden, sind als M1 gekennzeichnet: 98,24% am Tag 1, 98,85% am Tag 3 und 97,27% am Tag 5.

3.3.2 Rückbildung von etablierten Pankreastumoren nach intratumoraler Injektion von AdIL-12/B7.1

Um die therapeutische Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 *in vivo* zu überprüfen, wurden etablierte Pankreastumoren zunächst mit $2,5 \times 10^7$ pfu, d.h. mit der gleichen Vektorkonzentration wie im immunogenen PyMT Tumormodell behandelt. Die Mäuse wurden nach einer einzelnen intratumoralen Injektion auf eine Tumorregression hin untersucht. Als Vergleich dienten Tumoren, die entweder eine Injektion mit AdIL-12 oder dem Kontrollvektor AdGFPS erhalten hatten.

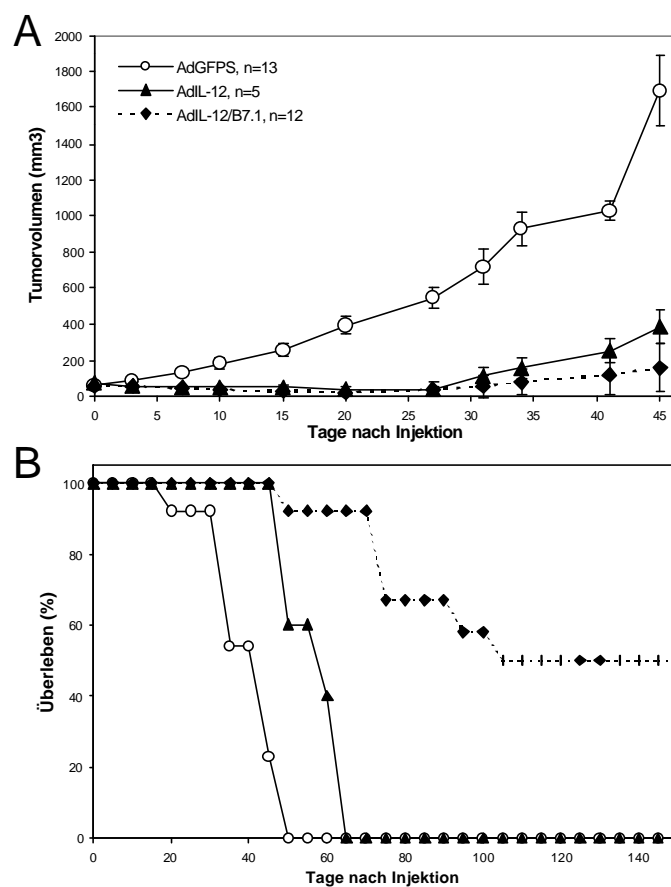


Abb. 3.3.3: Rückbildung von etablierten, nicht immunogenen Pankreastumoren durch eine einzelne intratumorale Injektion von AdIL-12/B7.1. In die Pan 02 Tumoren wurden jeweils $2,5 \times 10^7$ pfu von AdIL12/B7.1, AdIL-12 oder dem Kontrollvirus AdGFPS injiziert. (A) Das mittlere Tumolvolumen der Mäuse wurde alle 3-5 Tage gemessen. (B) Das Überleben der Mäuse nach einer Behandlung mit den in (A) gezeigten Viren.
 o AdGFPS (n=13); ▲ AdIL-12 (n=5); ◆ AdIL-12/B7.1 (n=12)

Schon bei dieser geringen Viruskonzentration zeigten sowohl AdIL-12/B7.1 als auch AdIL-12 eine deutliche Verringerung des mittleren Tumolvolumens von $55 \pm 4,5 \text{ mm}^3$ (AdIL12/B7.1) bzw. $71 \pm 1,7 \text{ mm}^3$ (AdIL-12) am Zeitpunkt der Injektion auf $23 \pm 18 \text{ mm}^3$

(AdIL-12/B7.1) bzw. $40,6 \pm 11,9 \text{ mm}^3$ (AdIL-12) am Tag 20 nach der Injektion (Abbildung 3.3.3 A). Daraus resultierte eine deutliche Wachstumsverzögerung (Abb. 3.3.3 A) und eine Verlängerung der Überlebenszeit (Abb. 3.3.3 B) im Vergleich zu den Kontrollvirus-injizierten Tieren. Im Gegensatz zu den mit AdIL-12 und AdGFPS behandelten Tieren zeigte sich nur bei den Mäusen, die eine AdIL-12/B7.1-Injektion erhalten hatten, eine komplette Tumorregression. Dies wurde bei 6 von 12 Mäusen (50%) der AdIL-12/B7.1 Gruppe beobachtet. Nur 1 von diesen 6 Tieren mit kompletter Tumorregression blieb auch nach einer erneuten Behandlung mit frischen Tumorzellen tumorfrei (17%).

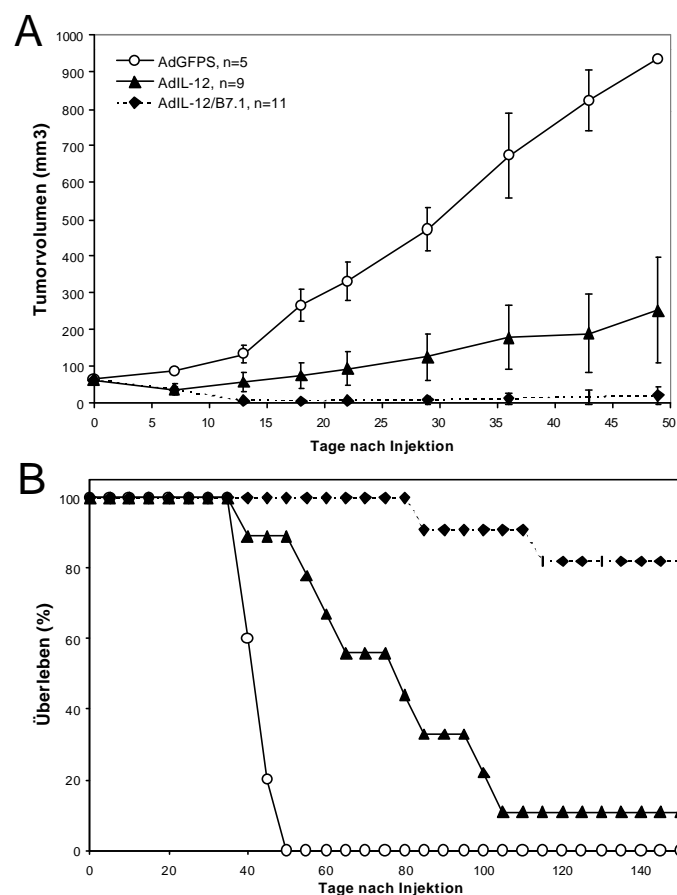


Abb. 3.3.4: Rückbildung von etablierten, nicht immunogenen Pancreastumoren durch eine einzelne intratumorale Injektion von AdIL-12/B7.1. In die Pan 02 Tumoren wurden jeweils 5×10^8 pfu von AdIL12/B7.1, AdIL-12 oder dem Kontrollvirus AdGFPS injiziert. (A) Das mittlere Tumolvolumen der Mäuse wurde alle 3-5 Tage gemessen. (B) Das Überleben der Mäuse nach einer Behandlung mit den in (A) gezeigten Viren.
 o AdGFPS (n=5); ▲ AdIL-12 (n=9); ◆ AdIL-12/B7.1 (n=11)

Um eine erhöhte Ansprechrate bei der Tumorbehandlung zu erreichen, wurde die Viruskonzentration auf 5×10^8 pfu erhöht. Dabei zeigte AdIL-12/B7.1 einen verbesserten Einfluss auf das mittlere Tumorzustand von $64,8 \pm 1,6 \text{ mm}^3$ am Tag der Injektion auf

8,6±10,2 mm³ am Tag 30 nach der Injektion. Im Vergleich zu AdIL-12, wo die Tumorgöße von 64,6±1,6 mm³ auf 37,9±13,2 mm³ am Tag 10 nach der Injektion verringert wurde, zeigte AdIL-12/B7.1 eine verlängerte Wachstumsverzögerung des Tumors über 50 Tage (Abb. 3.3.4 A).

Die Behandlung von Pankreastumoren mit der erhöhten Viruskonzentration von 5x10⁸ pfu zeigte zudem eine verbesserte Tumorregressionsrate von 80% (9 von 11 Tumoren wurden komplett zurückgebildet), wohingegen es nur bei einem von 9 der mit AdIL-12 behandelten Pan 02 Tumoren zu einer vollständigen Regression kam (Abb. 3.3.4 B). Nach einer erneuten Behandlung mit frischen Tumorzellen blieben 6 von den 9 Mäusen (67%), bei denen sich der Tumor nach einer AdIL-12/B7.1-Injektion komplett zurückgebildet hatte, auch dauerhaft tumorfrei, also deutlich mehr Tiere als mit der geringeren Viruskonzentration. Das deutet darauf hin, dass die Induktion einer dauerhaften Antitumor-Immunität in einem schwach immunogenen Tumormodell mit der verabreichten Dosis an IL-12 und B7.1 korreliert. Hingegen bildete sich bei dem durch eine AdIL-12-Injektion tumorfrei gewordenen Tier drei Wochen nach erneuter Tumorzellgabe ein Tumor. Hier kam es also zu keiner protektiven Immunität. Erwähnenswert ist, dass es im Gegensatz zu beschriebenen Experimenten [175, 212] auch bei der höheren Viruskonzentration zu keiner Toxizität mit AdIL-12 in den Mäusen kam.

Anhand dieser Daten kann man zu dem Schluss kommen, dass die IL-12 und B7.1 Produktion in den Pan 02 diese Zellen in eine immunogene Form umgewandelt hat, die geeignet war, die Tiere vor nachfolgenden Tumorbildungen zu schützen.

3.3.3 Immuneffektormechanismen bei der von IL-12 und B7.1 induzierten Immunantwort gegen nicht immunogene Pan 02 Tumoren

Der Mechanismus der von IL-12 und B7.1 vermittelten Tumor-Unterdrückung beinhaltet die Aktivierung von T-Zellen (sowohl CD4⁺- als auch von CD8⁺-T-Lymphozyten) und von NK-Zellen [182]. Um die Mechanismen aufzuklären, die an der Unterdrückung der nicht immunogenen Pankreastumoren durch den adenoviralen Transfer von IL-12 und B7.1 beteiligt waren, wurden nun semiquantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. Diese Analysen wurden mit Gesamt-RNA durchgeführt, die aus unbehandelten und mit Virus behandelten Tumorbiopsien gewonnen wurde. Repräsentative Daten aus einer von zwei unabhängigen Tumor-Serien sind in Abbildung 3.3.5 dargestellt.

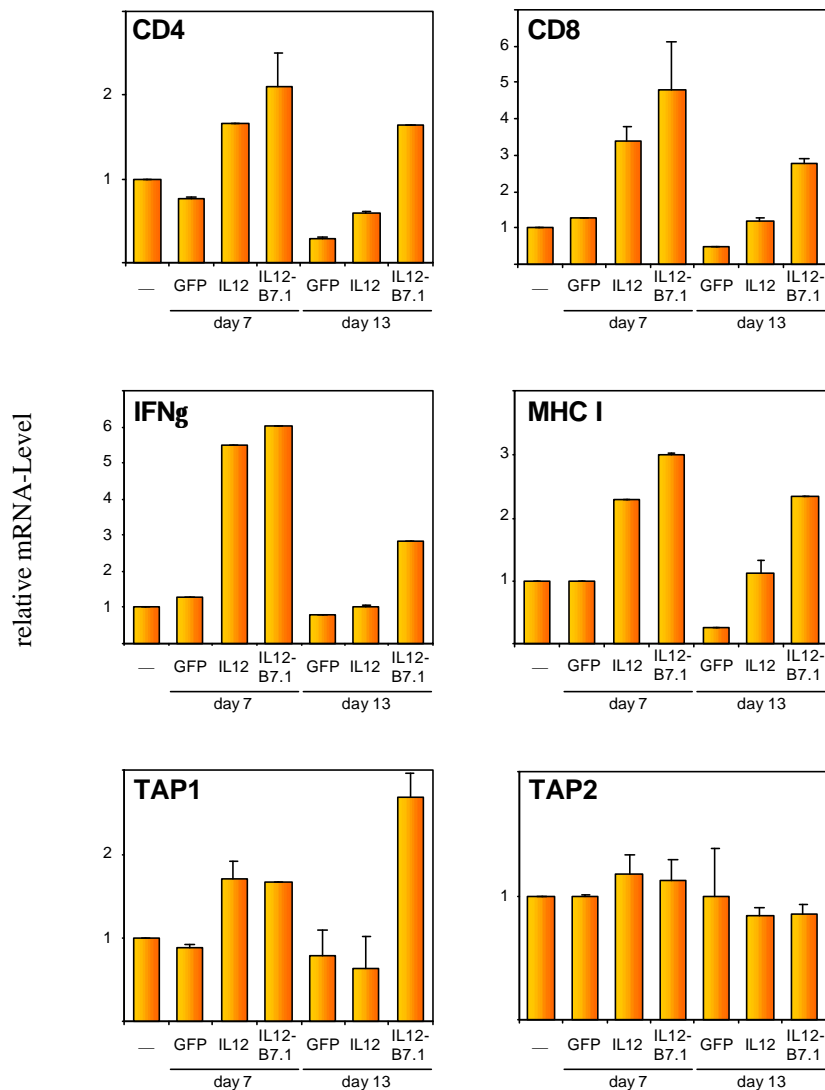


Abb. 3.3.5: Analyse der Immuneffektor-Mechanismen, die an der AdIL-12/B7.1-induzierten Tumor-Zerstörung beteiligt sind, mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR. Die RNA wurde aus unbehandelten und mit Virus behandelten Pan 02 Tumorbiopsie-Proben gewonnen. Die Tumorbiopsien wurden 7 und 13 Tage nach einer intratumoralen Injektion von AdGFPs (GFP), AdIL-12 (IL12) oder AdIL-12/B7.1 (IL12-B7.1) mit einer Viruskonzentration von 5×10^8 pfu entnommen. Die Expressions-Level wurden auf Gapd (murines Homolog von GAPDH)-Werte normalisiert. Die relativen mRNA-Level für die Cd4, Cd8, Ifng, H-2Kb, Abcb2 und Abcb3 Expression aus einer von zwei unabhängigen Tumor-Serien sind dargestellt. Der relative Transkript-Level der unbehandelten Tumorbiopsie wurde für jeden bestimmten Parameter gleich 1 gesetzt. Die Standardabweichung ist angegeben.

Im Vergleich mit den Leveln von T-Lymphozyten-spezifischen Transkripten in unbehandelten Pankreastumoren zeigte die RT-PCR einen signifikanten Anstieg von sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zell-Transkripten in mit AdIL-12/B7.1 behandelten Tumoren am 7.Tag, dem Zeitpunkt der beginnenden Tumorrückbildung.. Die gleichen Ergebnisse, wenn auch mit etwas geringeren Expressions-Werten, wurden am 7. Tag bei den mit AdIL-12

behandelten Tumoren erhalten (Abb. 3.3.5). Bei den T-Zellen wurden die höchsten Expressionslevel für Cd8 (murines Homolog von CD8) beobachtet, wobei es zu einem ungefähr 3-5-fachen Anstieg kam. Dagegen kam es nur zu einem 2-fachen Anstieg der Expressionslevel von Cd4 (murines Homolog zu CD4). Schon zu diesem frühen Zeitpunkt zeigte das Gewebe von mit AdIL-12/B7.1 und AdIL-12 behandelten Pan 02 Tumoren einen starken Anstieg von Ifng (murines Homolog von IFN- γ) um das 5- bis 6-fache des Wertes von unbehandelten Tumoren. Bei den mit AdIL-12 behandelten Tumoren sanken die Expressionswerte von Ifng, Cd4 und Cd8 nach 13 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau der unbehandelten Tumoren. Dagegen zeigten die AdIL-12/B7.1-injizierten Tumorproben auch am 13.Tag noch eine erhöhte Menge an Ifng und T-Zell Transkripten im Vergleich zum Ausgangsniveau. Festzuhalten ist, dass es bei den mit dem Kontrollvirus AdGFPS behandelten Tumoren zu keinerlei Anstieg in den Expressionsleveln kam, weder bei den Cd4⁺/Cd8⁺ T-Zellen noch bei Ifng (Abb. 3.3.5).

Aufgrund einer früheren Veröffentlichung ist bekannt, dass parentale Pan 02 Zellen nur geringe Mengen an MHC I exprimieren [213]. Wie in Abbildung 3.3.5 zu sehen ist, führte die Behandlung von Pan 02 Tumoren sowohl mit AdIL-12 als auch mit AdIL-12/B7.1 nach 7 Tagen zu einer Hochregulierung von MHC I, die jedoch mit AdIL-12/B7.1 höher war (3-fach im Vergleich zum unbehandelten Tumor) als mit AdIL-12 (nur 2-fach). Aber nur in mit AdIL-12/B7.1 behandelten Tumoren war dieser Anstieg in der MHC I Expression auch nach 13 Tagen noch vorhanden. Da gezeigt worden ist, dass sehr bösartige humane Karzinome in vielen Komponenten des Antigen-Präsentations-Signalweges einen Mangel aufweisen (dazu gehören TAP1 und TAP2 und die Proteasom-Untereinheiten LMP2 und LMP7) [214], wurde auch die Expression dieser Moleküle vor und nach der Tumorbehandlung überprüft. Sowohl in den mit AdIL-12 als auch in den mit AdIL-12/B7.1 behandelten Tumorbiopsie-Proben wurden nach 7 Tagen erhöhte Expressionswerte von Abcb2 (murines Homolog von TAP1) detektiert. Während nach Tumor-Behandlung mit AdIL-12 die Abcb2 Expressionswerte nach 13 Tagen wieder auf die Kontrollwerte von unbehandelten Tumoren zurückgingen, zeigten sich in den mit AdIL-12/B7.1 injizierten Tumoren zum gleichen Zeitpunkt sogar höhere Werte als nach einer Woche (3-facher Anstieg verglichen mit Kontrolltumoren). Jedoch zeigten sich weder mit AdIL-12 noch mit AdIL-12/B7.1 signifikante Veränderungen im Transkriptionslevel von Abcb3 (murines Homolog von TAP2, Abb. 3.3.5), Psmb9 (murines Homolog von LMP2) und Psmb8 (murines Homolog von LMP7, Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 in Nacktmäusen

Abschließend sollte noch die Funktion der nicht zu den T-Zellen gehörenden Immuneffektorzellen bei der Rückbildung von Pankreastumoren durch die Coexpression von IL-12 und B7.1 bestimmt werden. Dazu wurden Experimente in Nacktmäusen durchgeführt, bei denen die T-Zell Immunantwort deletiert ist.

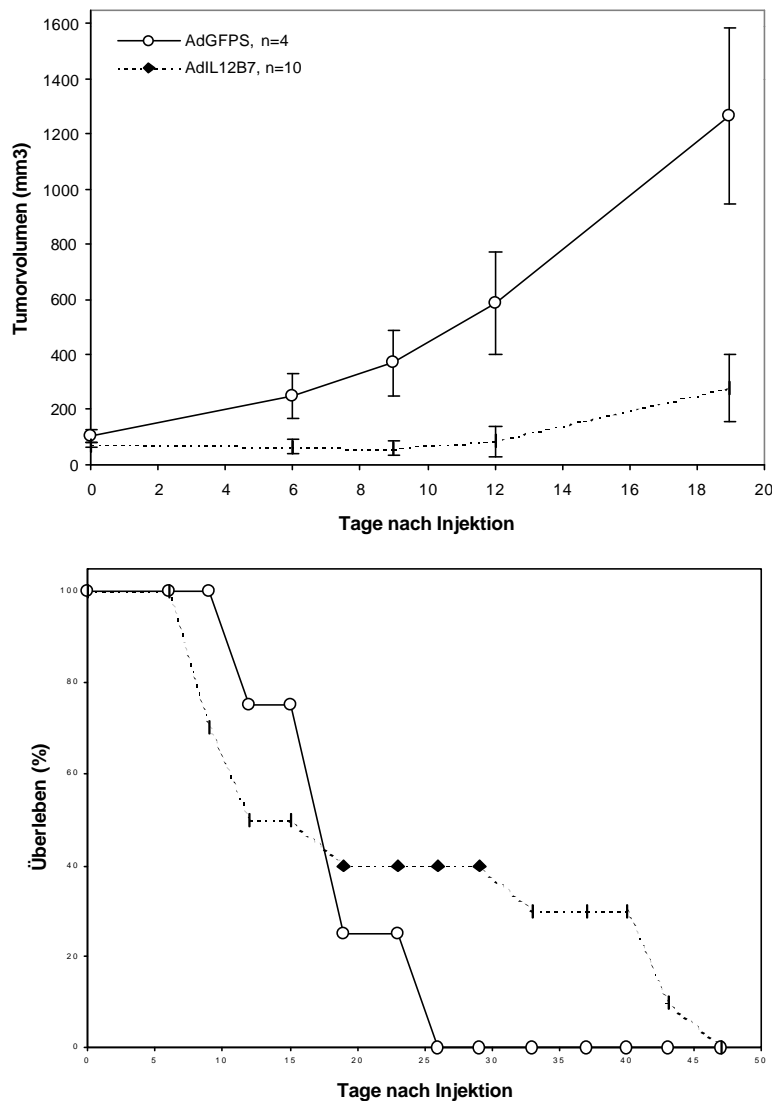


Abb. 3.3.6: Antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 in Nacktmäusen. In BALB/c Nacktmäusen wurden durch subkutane Injektion von 5×10^6 Pan 02 Zellen Tumoren etabliert. In diese Tumoren wurde eine Dosis von 5×10^7 pfu AdIL-12/B7.1 injiziert und das Tumorstadium wurde im Vergleich zu Versuchstieren bestimmt, deren Tumoren mit dem Kontrollvektor AdGFPS (gleiche Dosis) injiziert wurden. (A) Das Tumorstadium und (B) das prozentuale Überleben der Versuchstiere ist dargestellt.
○ AdGFPS (n=4); ◆ AdIL-12/B7.1 (n=10)

In etablierte Pan 02 Tumoren wurden direkt 5×10^7 pfu AdIL-12/B7.1 oder das Kontrollvirus AdGFPS injiziert und anschließend wurde die Tumorentwicklung überwacht (Abb. 3.3.6). Überraschenderweise zeigte sich im Nacktmaus-Modell bei dieser relativ geringen Viruskonzentration mit AdIL-12/B7.1 eine erhebliche Toxizität, die zu einem frühen Tod bei der Hälfte der Versuchstiere führte. Die überlebenden Tiere zeigten jedoch im Vergleich zu den mit dem Kontrollvirus behandelten Tieren eine deutliche Abnahme der Tumorgroße über einen Zeitraum von 10 Tagen (Abb. 3.3.6 A). Die Hemmung des Tumorwachstums war mit einem verlängerten Überleben der Tiere verbunden (Abb. 3.3.6 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Antitumor-Antwort gegen schwach immunogene Pan 02 Tumoren zum Teil T-Zell-unabhängig ist und wahrscheinlich von NK-Zellen vermittelt wird. Jedoch wurde im Nacktmaus-Modell keiner der Tumoren vollständig zurückgebildet, was darauf hindeutet, dass für eine verbesserte Immunogenität eine effiziente T-Zell-Antwort benötigt wird.

3.4 Immuntherapie bei nichttransplantierten hepatozellulären Karzinomen in Murmeltieren

Es konnte bereits in verschiedenen Maus-Tumormodellen gezeigt werden, dass durch den adenoviralen Gentransfer von IL-12 und B7.1 eine effiziente Tumorregression und teilweise auch eine systemische Immunität vermittelt wird [175,182, Kapitel 3.3]. Um festzustellen, ob AdIL-12/B7.1 auch für die Behandlung von nicht-transplantierten (primären) Tumoren verwendet werden kann, wurde das gut charakterisierte Modell der WHV (woodchuck hepatitis virus)-induzierten hepatozellulären Karzinome in Murmeltieren eingesetzt. Eine anhaltende WHV-Infektion führt bei Murmeltieren häufig zur Entstehung von hepatischen Tumoren [215]. Die WHV-induzierte Hepatokarzinogenese zeigt große Übereinstimmungen zu Hepadnavirus-induzierter Karzinogenese in Menschen [216,217].

3.4.1 Quantifizierung von IL-12 und B7.1 in Murmeltierzellen

Der Vektor wurde initial *in vitro* ausgetestet. Dazu wurden WH12/6 Zellen (Murmeltier-Leberzellen) mit AdIL-12/B7.1 infiziert. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen infiziert werden, wurde eine MOI von 10 eingesetzt. Zuerst wurde eine Infektion mit dem Kontrollvektor AdEGFP durchgeführt. Diese verlief erfolgreich, d.h. alle Zellen waren infiziert (Abb 3.4.1).

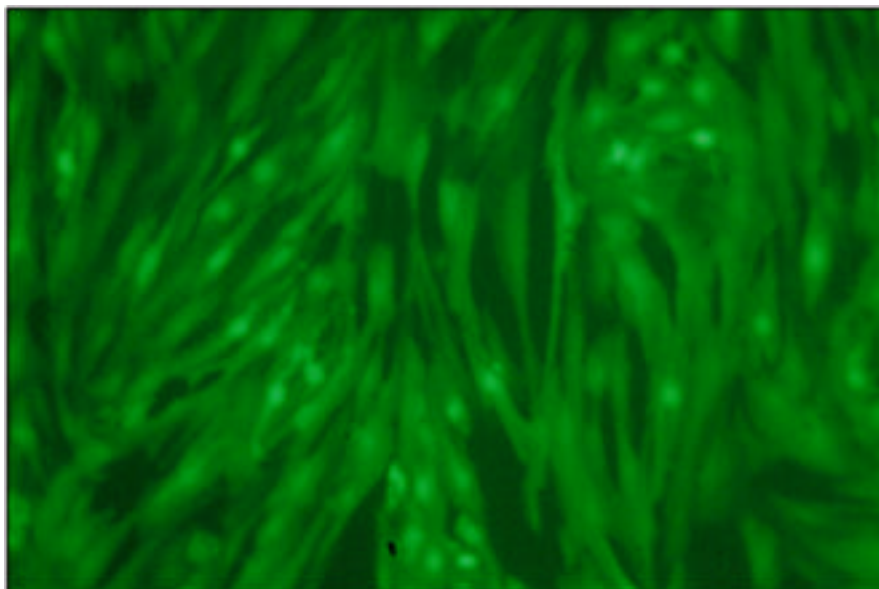


Abb. 3.4.1: WH12/6 Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit dem adenoviralen Kontrollvektor AdEGFP mit einer MOI von 10.

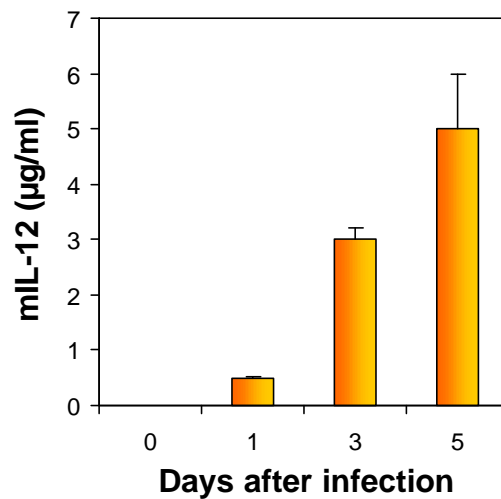


Abb. 3.4.2: Die Bestimmung der IL-12 Produktion *in vitro*. Expressionskinetik von murinem IL-12 in WH12/6 Zellen vor der Infektion und 1, 3 und 5 Tage nach der Infektion mit AdIL-12/B7.1 mit einer MOI von 10. Die murine IL-12 Konzentration pro Milliliter Überstand wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt unter Verwendung eines anti-Maus IL-12p70 Antikörpers. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmungen analysiert. Die Standardabweichungen sind angegeben.

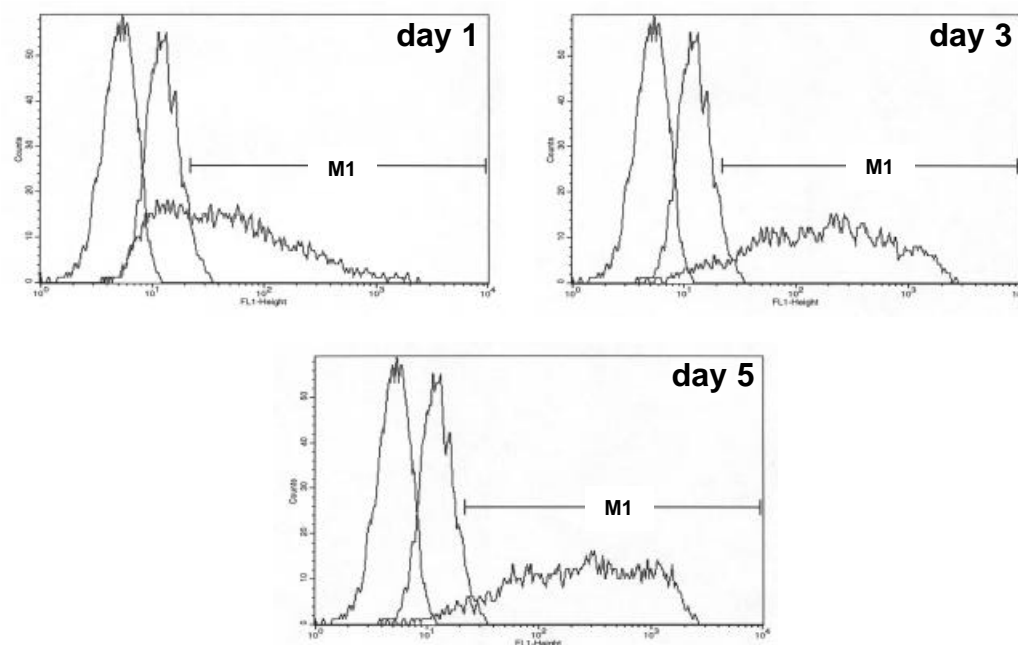


Abb. 3.4.3: B7.1 Expression in WH12/6 Marmeltier-Leberzellen. Die Transgen-Expression wurde vor und 1, 3 und 5 Tage nach der Infektion mit einer MOI von 10 gemessen. Um B7.1 zu detektieren, wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-Maus B7.1 Antikörper gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Die mittlere Kurve sind nicht infizierte WH12/6 Zellen. Im Vergleich mit der Negativkontrolle (nicht infizierte humane MRC-5 Fibroblasten, linke Kurve) zeigten nicht infizierte WH12/6 Zellen nur eine sehr geringe B7.1 Expression (4% nach 72h). B7.1-positive Zellen (rechte Kurve), als M1 gekennzeichnet, waren 65% aller Zellen am 1.Tag, 92% am 3.Tag und 95% am 5.Tag nach der Infektion.

Die Expression von murinem IL-12 wurde am 1., 3. und 5.Tag nach der Infektion mit AdIL-12/B7.1 bestimmt. In Abbildung 3.4.2 ist zu sehen, dass schon 24h nach der Infektion eine Expression von IL-12 detektierbar war, wenn auch relativ geringe Mengen. Die Menge an in den Überstand sezerniertem murinem IL-12 stieg bis auf ungefähr 5 µg/ml am 5.Tag an (Abb. 3.4.2).

In Abbildung 3.4.3 ist dargestellt, dass einen Tag nach der Infektion ungefähr zwei Drittel der mit AdIL-12/B7.1 infizierten WH12/6 Zellen im Vergleich mit nicht infizierten Zellen, die nur eine sehr geringe Expression zeigten (4%), B7.1 positiv sind. Die Menge an B7.1-positiven Zellen erhöhte sich bis auf 95% am 5.Tag nach der Infektion.

3.4.2 Antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 gegen nichttransplantierte, WHV-induzierte hepatozelluläre Karzinome

Nun wurden in vier Marmeltieren, die chronisch mit WHV infiziert waren, große Tumoren ausgesucht, und in diese wurde nach vorhergehender Laparotomie entweder AdIL-12/B7.1 oder der Kontrollvektor AdEGFP injiziert. Das absolute Volumen von sechs Tumorknoten, von denen drei mit AdIL-12/B7.1 und drei mit AdEGFP behandelt wurden, ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Messung erfolgte vor der Behandlung und 7-14 Tage danach. Als weitere Kontrolle wurde auch das Volumen von unbehandelten Tumoren am Tag der Injektion und 14 Tage später bestimmt (Tab. 1).

Tabelle 1: Tumolvolumen von etablierten primären hepatozellulären Karzinomen nach AdIL-12/B7.1 Behandlung

Tier*	Behandlung	Volumen vor der Behandlung, cm ³	Volumen nach der Behandlung, cm ³	Zeit, Tage*
3	AdEGFP	23,5	35,6	7
3	AdIL-12/B7.1	29,4	11,8	7
4	AdEGFP	2,8	7,45	10
4	AdIL-12/B7.1	37,8	6,8	10
1	AdEGFP	2,9	5,9	14
1	unbehandelt	5,9	10,6	14
2	AdIL-12/B7.1	3,6	0,25	14
2	unbehandelt	1,3	4,2	14

* in den Marmeltieren 3 und 4 wurde ein ausgewählter Tumor mit AdEGFP und ein anderer mit AdIL-12/B7.1 behandelt

* die Tumorgröße wurde 7, 10 und 14 Tage nach der Behandlung bestimmt

Über einen Zeitraum von zwei Wochen betrachtet zeigten Tumoren, die eine intratumorale Injektion mit AdIL-12/B7.1 bekommen hatten, im Mittel eine 80%-ige Reduktion ihres Volumens bezogen auf das Ausgangsvolumen. Dagegen zeigten unbehandelte und AdEGFP-injizierte Tumoren im gleichen Zeitraum eine ungefähr zweifache Zunahme ihres Volumens (Abb. 3.4.4).

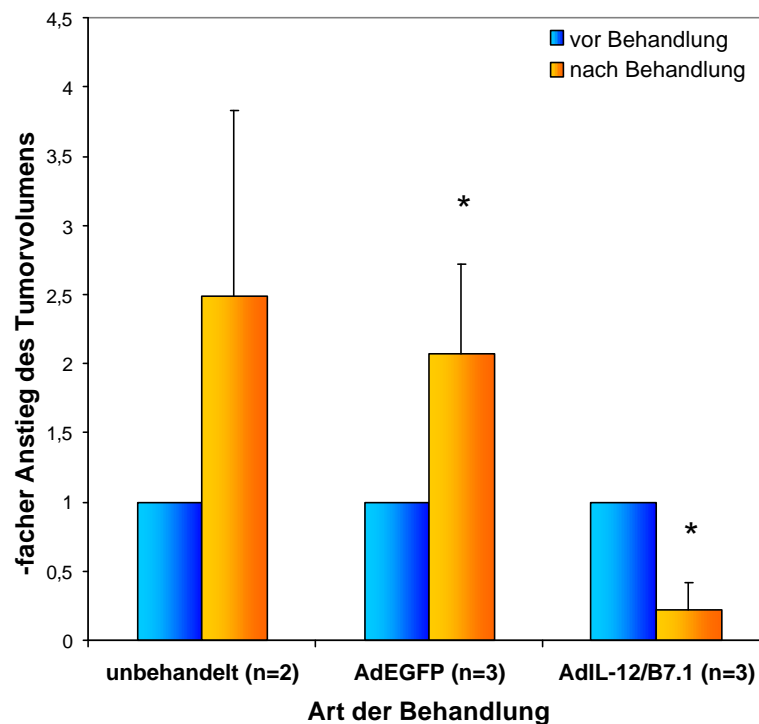


Abb. 3.4.4: Kurzzeitige antitumorale Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1 auf WHV-induzierte primäre Lebertumoren. In ausgewählte Tumorknötchen von 2-5 cm Durchmesser wurde intratumoral 1×10^9 pfu AdIL-12/B7.1 oder das Kontrollvirus AdEGFP injiziert. Die Tiere wurden innerhalb von 14 Tagen nach der Behandlung getötet und auf eine Tumoregression relativ zu unbehandelten Tumoren hin untersucht. Der durchschnittliche Anstieg des Tumorumens ist dargestellt (**orangefarbene Balken**). Das Tumorumen vor der Behandlung wurde gleich 1 gesetzt (**blaue Balken**). Die 95% Konfidenzintervalle (CIs) sind als **Fehlerbalken** angegeben. Die Differenz im relativen Anstieg der Größe der AdEGFP- gegenüber den AdIL-12/B7.1-behandelten Tumoren ist statistisch signifikant (*) mit $P=,006$: AdEGFP (2,1-fach [95% CI = 1,44-fach bis 2,76-fach]; $P=,084$) gegenüber AdIL-12/B7.1 (0,22-fach [95% CI = 0,03-fach bis 0,41-fach]; $P=,015$). Die absoluten Volumina jedes einzelnen injizierten Tumors sind in Tabelle 1 gezeigt.

In einem weiteren Tier wurde die Langzeitwirkung von AdIL-12/B7.1 untersucht. In Abbildung 3.4.5 sind repräsentative MRI (magnetic resonance imaging)-Aufnahmen eines Murmeltieres an drei verschiedenen Zeitpunkten (vor der Behandlung und 4 und 7 Wochen nach der Behandlung) dargestellt. Gezeigt wird die langfristige Antitumor-Antwort nach der direkten intratumoralen Injektion von 1×10^9 pfu AdIL-12/B7.1 in einen ausgewählten Lebertumorknoten unter MRI-Kontrolle. In diesem Experiment hatte die Behandlung mit AdIL-12/B7.1 eine deutliche Auswirkung auf das Tumorumwachstum über einen Zeitraum von 7

Wochen. Es kam zu einer ungefähr 95%-igen Reduktion der Tumorgöße ausgehend von 8,6 cm³ zum Injektionszeitpunkt auf 0,5 cm³ am Tag 50 nach der Behandlung (Abb. 3.4.5, I-III). Im Gegensatz dazu konnte jedoch kein Rückgang in der Tumorgöße der umliegenden, unbehandelten Tumoren beobachtet werden. Demnach können große, primäre Lebertumoren in einem klinisch relevanten Modell mit einer Injektion eines IL-12 und B7.1 coexprimierenden Ad-Vektors effizient behandelt werden.

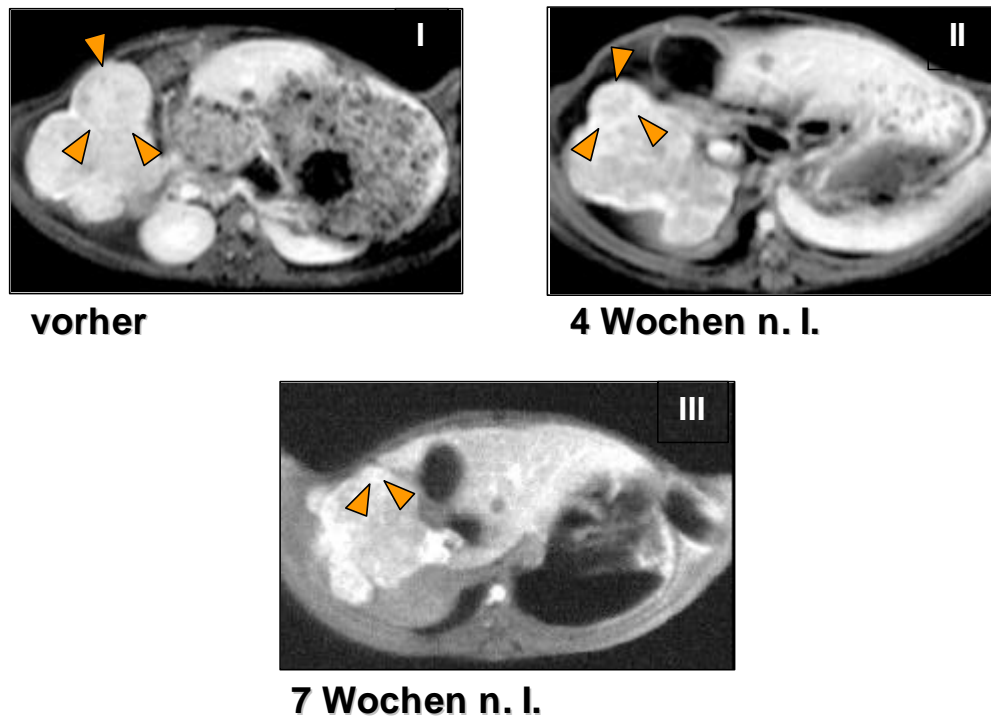


Abb. 3.4.5: Antitumorale Langzeit-Wirkung von AdIL-12/B7.1 auf WHV-induzierte primäre Lebertumoren. Die T1-gewichteten postkontrast Magnetresonananz-Bilder von einer repräsentativen Murmeltier-Leber zeigen neoplastische Tumorknoten. Der mit orangefarbenen Pfeilen gekennzeichnete Tumor erhielt eine direkte Injektion von 1×10^9 pfu von AdIL-12/B7.1 unter MRI-Anleitung. Der behandelte Tumor ist vor der Behandlung (I) und 4 (II) und 7 (III) Wochen nach der Virusinjektion gezeigt. Die Reduktion der Tumorgöße über 43% (4 Wochen nach der Injektion) auf 95% (7 Wochen nach der Injektion) sind in den Bildern II und III gezeigt. Das Wachstum der umliegenden unbehandelten Tumorknoten von vergleichbarer Größe blieb unverändert.

3.4.3 Immuneffektormechanismen bei der Regression von primären HCCs

Gentransfer-Studien in mehreren Mausmodellen hatten gezeigt, dass die durch die Expression von IL-12 und/oder B7.1 vermittelte Rückbildung von transplantierten Tumoren von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten und NK-Zellen abhängig ist [218-220]. Um die durch die Injektion von AdIL-12/B7.1 in etablierte nichttransplantierte Lebertumoren hervorgerufene Immunantwort zu analysieren, wurden anschließend Leber- und Tumor-Biopsieproben der

Murmeltiere 1-4 (siehe Tabelle 1) vor und nach der Behandlung untersucht (Abb. 3.4.6). Die histologischen Schnitte der HCCs zeigten die typischen Merkmale von neoplastischen hepatischen Zellen. Sie bildeten pseudotubuläre Strukturen mit auffälligen Veränderungen in der Kernmorphologie, gekennzeichnet durch kondensiertes Chromatin und Makronukleoli (Abb. 3.4.6, III). Im Gegensatz zu Tumoren, in die der Kontrollvektor AdEGFP injiziert worden war (Abb. 3.4.6, IV), zeigten nur die mit AdIL-12/B7.1 behandelten Tumoren Nekrose und massive entzündliche Infiltrationen (Abb. 3.4.6, V). Im nicht tumoralen Leber-Parenchym wurden typische morphologische Muster von chronischer Hepatitis nach persistenter WHV-Infektion gefunden. Diese waren gekennzeichnet durch leichte Fibrose und mononukleares Infiltrat von portalen und periportal Gebieten mit gelegentlicher Nekrose ([221] und Abb. 3.4.6, I). Jedoch konnten auch 10 Tage nach der intratumoralen Vektorapplikation keine Anzeichen von Adenovirus-induzierter hepatischer Toxizität in normalem Lebergewebe beobachtet werden (Abb. 3.4.6, II).

Die histologischen Befunde wurden durch RPAs (ribonuclease protection assays) von Leber- und Tumor-Biopsieproben der Murmeltiere 1-4 (siehe Tabelle 1) erweitert. Der RPA zeigte die Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in AdIL-12/B7.1-injizierte Tumoren 10 Tage nach der Behandlung, verglichen mit den Werten von T-Zell-spezifischen Transkripten in hepatischen Tumoren vor der Behandlung. Dabei zeigte sich bei den CD4⁺-Lymphozyten ein ungefähr siebenfacher Anstieg und bei den CD8⁺-Lymphozyten ein weitaus geringerer, aber signifikanter 2-facher Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Darüberhinaus zeigte AdIL-12/B7.1-injiziertes Gewebe einen 2-fachen Anstieg an IFN- γ , dem bestimmenden Faktor der IL-12-vermittelten Antitumor-Antwort. Daraus folgt, dass von einem Ad-Vektor exprimiertes murines IL-12 in Murmeltier-Lebertumoren funktionell aktiv ist. Im Gegensatz dazu war bei Kontrollvirus behandelten Tumoren weder für CD4⁺- noch für CD8⁺-T-Zellen oder für IFN- γ ein Anstieg nachweisbar.

Die RPA-Daten sind hier nicht gezeigt, da diese Versuche von Oliver Schildgen (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt wurden [eigene Publikationen, 1.).

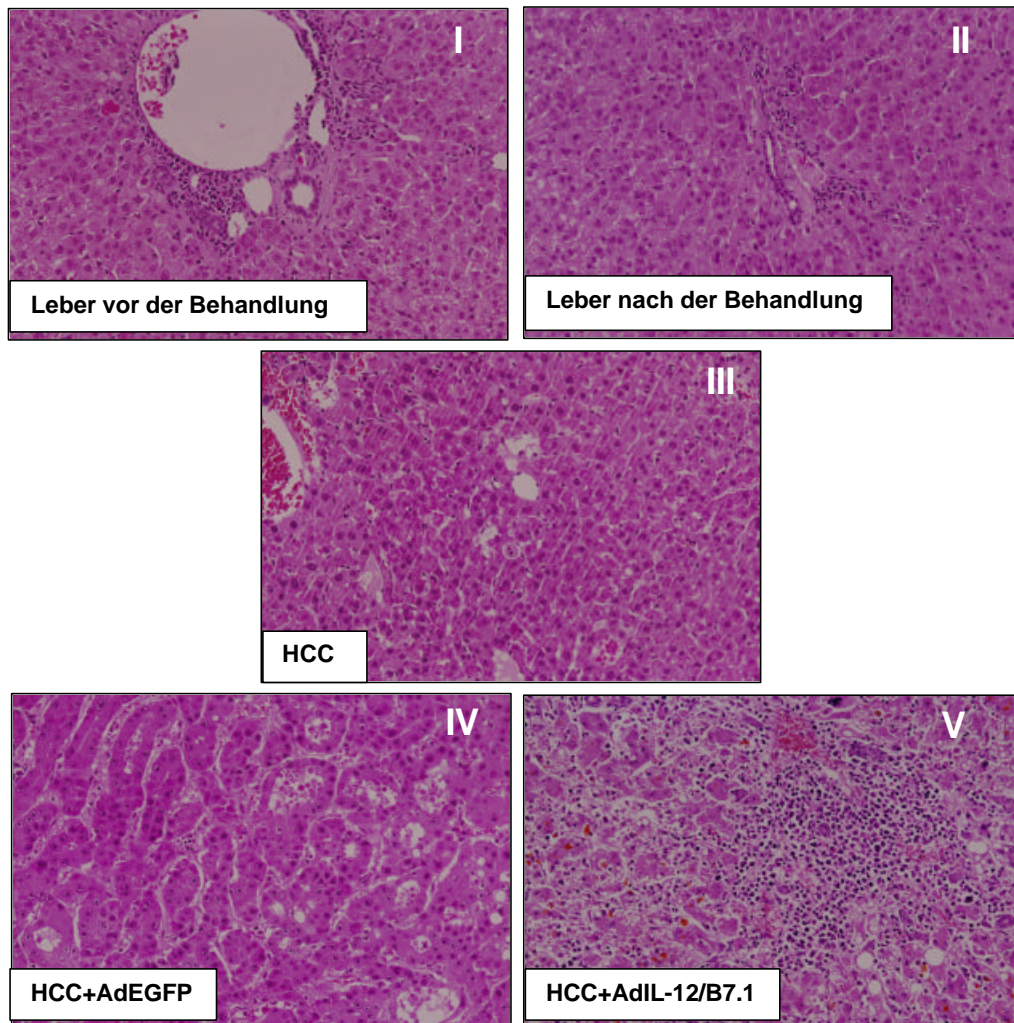


Abb. 3.4.6: Infiltration von Immuneffektorzellen in AdIL-12/B7.1-injizierten primären Lebertumoren. Repräsentative Leber- und Tumorschnitte von einem Murmeltier vor (I und III) und nach (II, IV und V) der Behandlung. Ein Tumorknoten erhielt eine Injektion von 1×10^9 pfu AdIL-12/B7.1, und ein anderer Tumorknoten wurde mit 1×10^9 pfu AdEGFP, dem Kontrollvektor, behandelt. Das Tier wurde 10 Tage später getötet und auf mit der Behandlung zusammenhängende morphologische Veränderungen hin untersucht. Leber-Parenchym von chronischer Hepatitis nach persistenter WHV-Infektion vor (I) und nach (II) der intratumoralen Injektion sind zu sehen. Es konnten keine morphologischen Anzeichen für eine Adenovirus-bezogene hepatische Schädigung entdeckt werden. Pseudotubuläre Strukturen von neoplastischen Hepatozyten eines unbehandelten hepatozellulären Karzinoms (HCC, III) und von mit AdEGFP (IV) und mit AdIL-12/B7.1 (V) behandelten HCCs sind dargestellt. In Abbildung V sind zahlreiche Breiche von Nekrose und massiver entzündlicher Infiltration zu sehen. (Hematoxylin-Eosin-Färbung)

4. Diskussion

4.1 Vergleich von p53- und p73-Gentherapie beim Pankreaskarzinom

Ein möglicher Ansatz bei der Behandlung von Krebszellen durch Gentherapie besteht darin, Apoptose-induzierende Tumorsuppressor-Gene in die Zellen einzubringen. Da das bekannteste Tumorsuppressor-Gen, Tp53, in über 50% aller humanen Pankreaskarzinome mutiert ist, wurde in diesem Teil der vorliegenden Dissertation eine Wiedereinbringung von Wildtyp-p53 in Pankreastumorzelllinien, die mutiertes p53 exprimieren oder p53-negativ sind, durchgeführt. Es konnte schon in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein Adenovirus-vermittelter Gentransfer von p53 in Pankreastumorzellen zu einer effektiven Apoptose-Induktion in diesen Zellen führt [37,222,223]. Aber eine Gentherapie mit p53 ist nicht immer erfolgreich, da viele Tumoren eine Resistenz gegenüber p53-vermittelter Apoptose-Induktion besitzen, wie auch schon für Pankreastumoren gezeigt werden konnte [222,224]. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Gentransfer eines weiteren p53-Familienmitgliedes, p73, in Pankreastumorzelllinien durchgeführt. Bei Überexpression hat p73 pro-apoptotische Wirkung und besitzt somit ebenfalls Tumorsuppressor-Eigenschaften bzw. ist antineoplastisch wirksam. Zudem kann p73 auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren [88].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Adenovirus-vermittelter Gentransfer von p53 und β -p73 zu Zytotoxizität und Apoptose-Induktion in Pankreastumorzelllinien führte. Die beobachteten Effekte waren dabei zelllinienabhängig, jedoch war β -p73 im Gegensatz zu p53 in allen Zelllinien therapeutisch wirksam. Diese Ergebnisse stimmen mit in anderen Tumormodellen gemachten Beobachtungen überein, wo gezeigt werden konnte, dass die Stärke der durch p53 vermittelten Apoptose meist geringer war als die Apoptose, die durch p73 vermittelt wird [101,225]. Zudem war auch in diesen Studien p73 in der Lage, in p53-resistenten Tumorzellen Apoptose zu induzieren [101,206,225]. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte α -p73 nur geringe Wirksamkeit in den Pankreastumorzelllinien. Dies bestätigt die bekannte Tatsache, dass β -p73 effektiver Apoptose induzieren kann als α -p73 [86,206]. Die β -p73 Gentransduktion zeigte also in den untersuchten Pankreastumorzelllinien die größte therapeutische Wirksamkeit.

Es war bekannt, dass AsPC-1 Zellen weitgehend resistent gegenüber p53-vermittelter Apoptose sind [226,227]. Der zugrundeliegende Mechanismus war jedoch bisher nicht bekannt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte bestätigt

werden, dass eine Wiedereinbringung von Wildtyp-p53 in p53-negative AsPC-1 Zellen nur zu einer sehr geringen Apoptose-Induktion führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass über einen längeren Zeitraum eine konstante Protein-Expression erfolgt und dass bekannte p53-Zielgene angeschaltet werden. Das p53 Protein war also funktionell aktiv. Übereinstimmend mit vorherigen Studien [99] konnte auch in AsPC-1 Zellen gezeigt werden, dass β -p73 ebenfalls die bekannten p53-Zielgene aktiviert, jedoch in unterschiedlichem Maße als p53. Bei der Aktivierung von Zellzyklus-relevanten Zielgenen zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede zwischen p53 und β -p73, wobei der bei den FACS-Analysen nach Infektion mit Adp53 beobachtete G1-Arrest möglicherweise auf die starke Aktivierung von p21 zurückzuführen ist. Dagegen wurden die pro-apoptotischen Zielgene von p53 nur schwach und in geringerem Maße als von β -p73 aktiviert. Dabei war ein deutlicher Unterschied in der Aktivierung von p53AIP1 nachweisbar. Dabei handelt es sich um ein wichtiges Apoptose-induzierendes Gen, das von β -p73 stark, von p53 jedoch nur sehr schwach aktiviert wird.

Um effektiv Apoptose induzieren zu können, muss das p53-Protein posttranslational modifiziert werden [74,75]. Dabei spielen vor allen Dingen Phosphorylierungen eine wichtige Rolle. Aus vorhergehenden Studien war bekannt, dass nach einer Infektion mit einem Wildtyp-p53 exprimierenden Adenovirus nicht die Proteinlevel entscheidend waren, sondern die Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung [228]. Auch bei hohen exogenen p53-Proteinleveln konnte in einigen Tumorzelllinien keine Apoptose induziert werden, und in diesen Zelllinien konnte keine p53-Phosphorylierung detektiert werden [228]. Die für eine effiziente Apoptose-Induktion wichtigste Phosphorylierung findet am Serin-Rest 46 (Ser-46) statt, da durch eine Mutation dieses Serin-Restes die Apoptose-induzierende Funktion von p53 stark beeinträchtigt wird [66,76]. Die Ser-46 Phosphorylierung von p53 ist verbunden mit der transkriptionellen Aktivierung von pro-apoptotischen Genen, von denen p53AIP1 das wichtigste ist [66]. Die Ser-46 Phosphorylierung konnte jedoch in den AsPC-1 Zellen nicht beobachtet werden, womit die fehlende Aktivierung von p53AIP1 und damit auch die fehlende Apoptose-Induktion durch Adp53 erklärt werden könnte. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die exogene Wildtyp-p53-Expression in H1299 Zellen eine starke Apoptose-Induktion hervorruft, und dass in diesen Zellen eine Phosphorylierung am Ser-46 beobachtet werden kann. Anhand dieser Daten ist die Resistenz von AsPC-1 Zellen gegenüber Adp53-induzierter Apoptose zumindest teilweise auf eine fehlende Phosphorylierung von p53 am Ser-46 und damit einhergehend eine fehlende p53AIP1-Aktivierung zurückzuführen.

Die Regulierung der Ser-46 Phosphorylierung könnte entscheidend sein, um festzulegen, ob sich aus der Aktivierung von p53 eine Apoptose-Induktion ergibt. Bekannt ist, dass nach einer Adenovirus-vermittelten Überexpression von exogenem Wildtyp-p53 die Ser46 Phosphorylierung von p53 und nachfolgend auch eine Apoptose-Induktion durch HIPK2 vermittelt wird [77]. Daher könnte die fehlende Ser-46 Phosphorylierung in AsPC-1 Zellen durch eine mangelhafte HIPK2-Expression oder durch Deregulierung des zu einer p53-Phosphorylierung führenden Signalweges hervorgerufen werden [228]. Für p73 konnte zwar auch schon eine Interaktion mit HIPK2 nachgewiesen werden [229], aber für eine selektive Aktivierung der Transkription von pro-apoptischen Zielgenen, darunter auch p53AIP1, muss p73 acetyliert und nicht phosphoryliert werden [230]. Daher wäre p73 von einer möglicherweise in AsPC-1 Zellen vorliegenden anomalen Regulierung des Phosphorylierungs-Signalweges weniger betroffen. Dieser Unterschied in der Aktivierung von p53 und p73 könnte erklären, warum β -p73 im Gegensatz zu p53 in AsPC-1 Zellen effektiv Apoptose induzieren kann. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema stehen jedoch noch aus.

Als Fazit kann man festhalten, dass eine p73 Gentherapie eine mögliche Alternative zu einer p53 Gentherapie darstellt. Die Hälfte der verwendeten Pankreastumorzelllinien zeigte eine weitgehende Resistenz gegenüber p53-vermittelter Apoptose, wohingegen ein p73 Gentransfer in allen Zelllinien eine therapeutische Wirksamkeit zeigte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch adenoviralen Gentransfer vermittelte Überexpression von β -p73 in humanen Pankreastumorzellen die Resistenzmechanismen gegen eine Adp53 Gentherapie umgehen kann. Ein adenoviraler Vektor, der β -p73 exprimiert, könnte daher einen erfolgversprechenden Ansatz für die wirksame gentherapeutische Behandlung von Pankreastumoren darstellen.

4.2 E2F1-Gentherapie beim Pankreaskarzinom

In einer Reihe von Krebsarten konnte gezeigt werden, dass eine Kombinations-Chemotherapie wirksamer war als eine Monotherapie. Jedoch sind die gegenwärtig für die Behandlung von Pankreasadenokarzinomen verfügbaren Kombinationstherapien nur wenig wirksamer als die Monotherapien und daher nicht sehr effektiv [29,30].

In letzter Zeit gewinnt die Kombination von Chemo- und Gentherapie immer mehr Bedeutung als Alternative zu konventionellen Chemotherapie-Kombinationen [231,232]. Der zugrundeliegende Gedanke ist, dass die Tumorzellen durch die Überexpression eines pro-

apoptotischen Proteins sensibilisiert werden, und dass nachfolgend geringere Dosen des Chemotherapeutikums benötigt werden könnten, wodurch die systemische Toxizität verringert werden würde. Die vorliegende Arbeit beweist, dass die Transduktion des E2F1-Gens merklich die Zellsensitivität für Gemcitabine in Pankreaskarzinomzellen steigert, woraus ein synergistischer Effekt bei der Induktion von Apoptose resultiert. Zudem bewirkte Gemcitabine zusammen mit Ad-E2F1 eine Verbesserung der antitumoralen Wirksamkeit in einem *in vivo* Nacktmausmodell.

Gemcitabine (2',2'-Difluorodesoxycytidin) ist ein Nukleosid-Analogon von Cytidin, das sowohl als Einzelwirkstoff als auch in Kombination mit anderen Medikamenten gegen eine Reihe von humanen Tumoren wirksam ist [29,233-235]. Obwohl es zurzeit die Therapie der Wahl bei Pankreasmalignomen darstellt, ist seine Ansprechrate relativ gering, d.h. viele Tumoren zeigen eine Resistenz gegenüber diesem Chemotherapeutikum [17,28]. Die antitumorale Wirkung von Gemcitabine beruht zumindest zum Teil auf der Aktivierung von apoptotischen Signalwegen [236]. Umgekehrt wird die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika unter anderem auf Veränderungen in Apoptose-fördernden Mechanismen zurückgeführt [237]. Auch für Gemcitabine konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von pro-apoptotischen oder die Inhibierung von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern in Pankreastumorzellen diese für eine durch Gemcitabine induzierte Apoptose sensibilisiert [238-240].

Eine Reihe von Studien haben angedeutet, dass eine Deregulierung von E2F1 die Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zur Folge hat [107]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht genau bekannt, jedoch gibt es mehrere Vermutungen. Zunächst einmal kann E2F1 als Tumorsuppressor wirken aufgrund seiner Fähigkeit, Apoptose zu induzieren [108,112,113]. Zudem kann E2F1 durch die Inhibierung von anti-apoptotischen Signalwegen Zelltod verstärken [120]. Auf diese Weise kann eine deregulierte E2F1-Expression Zellen sensibilisieren gegenüber einer durch verschiedene Agenzien vermittelten Apoptose-Induktion [120].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein adenovirales Vektorsystem dazu verwendet, um eine E2F1-Überexpression in mehreren unterschiedlichen humanen Pankreastumorzelllinien hervorzurufen. Dabei zeigte sich, dass die Fähigkeit von E2F1, Apoptose zu induzieren, stark von der verwendeten Zelllinie abhängig war. Eine Korrelation zwischen dem p53-Status der Zellen und der Wirksamkeit von E2F1 bestand dabei aber nicht, da keine Zelllinie funktionelles p53 exprimiert. Trotzdem konnte E2F1 zumindest in der Hälfte der untersuchten Zelllinien effektiv Apoptose induzieren, womit gezeigt werden konnte, dass E2F1 auch in

Pankreastumorzelllinien unabhängig von p53 Zelltod einleiten kann. Der von E2F1 eingeleitete Apoptose-Signalweg scheint dabei über das p53-Familienmitglied p73 zu laufen, da nach E2F1-Überexpression eine Aktivierung der p73-Expression mit einer Apoptose-Induktion korrelierte. Diese Beobachtung stimmt mit unseren Untersuchungen überein, die gezeigt haben, dass eine durch E2F1 vermittelte p53-unabhängige Apoptose-Induktion über p73 verlaufen kann [116].

Die untersuchten Pankreastumorzelllinien zeigten unterschiedliche Ansprechraten gegenüber dem verwendeten Chemotherapeutikum Gemcitabine, jedoch kam es bei keiner Zelllinie zu einem massiven Absterben der Zellen. Diese weitgehende Resistenz gegenüber den eingesetzten, klinisch relevanten Dosen von Gemcitabine spiegelt die in der Klinik gemachten Beobachtungen wider, dass humane Pankreaskarzinome häufig chemoresistent sind. Dagegen war die Kombinationstherapie von E2F1 und Gemcitabine bei jeder der untersuchten Zelllinien sehr wirksam. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen gezeigt werden konnte, dass ein E2F1-Gentransfer Tumorzellen für die nachfolgende Behandlung mit Chemotherapeutika sensibilisieren und eine effektivere Apoptose-Induktion hervorrufen kann [241-243]. Dabei wurde auch die in dieser Arbeit verwendete Kombination von E2F1-Überexpression und Gemcitabine für die Behandlung von Pankreaskarzinomen erfolgreich eingesetzt [242]. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der p73-Expression mit einer effektiven Apoptose-Induktion korreliert. Während in AsPC-1 Zellen die E2F1-Überexpression ausreichend war, um eine p73-Expression und eine Apoptose-Induktion zu induzieren, wurde dieser Effekt in MZA Zellen nur durch die Kombinationstherapie erreicht. Das deutet darauf hin, dass die Aktivierung von p73 für eine effiziente Induktion von Apoptose benötigt wird. Momentan ist noch unklar, warum in den MZA Zellen E2F1 allein nicht in der Lage war, p73 zu induzieren. Da die E2F1-Proteinlevel durch die Gemcitabine-Behandlung nicht beeinflusst werden, könnte die fehlende p73-Aktivierung durch eine Inhibierung von E2F1 verursacht worden sein. Dies könnte z.B. durch hohe Level von p14ARF bedingt sein, für das nachgewiesen wurde, dass es die E2F1 Transaktivierung inhibiert [244]. Da die Aktivierung von p73 durch E2F1 durch direkte Promotor-Bindung erfolgt [116], besteht auch die Möglichkeit, dass in MZA Zellen die Bindung von E2F1 an den p73-Promotor verhindert wird und Gemcitabine in der Lage ist, diese Promotor-Blockade wieder aufzuheben. Weitere Untersuchungen stehen hierzu aber noch aus.

Zusammengefasst deuten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass die durch adenoviralen Gentransfer vermittelte Überexpression von E2F1 in humanen Pankreastumorzellen signifikant die Zellempfindlichkeit für Gemcitabine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhöht. Die Kombinationstherapie war in jeder der verwendeten Zelllinien und auch im Mausmodell effektiver als die jeweilige Behandlung mit E2F1 oder Gemcitabine allein. Mit der Kombinationstherapie konnte ein synergistischer Effekt bei der Induktion von Apoptose beobachtet werden. Die kombinierte Chemo- und Gentherapie von Gemcitabine und einem adenoviralen Vektor, der E2F1 exprimiert, stellt einen vielversprechenden Ansatz für die wirksame Behandlung von fortgeschrittenen Pankreastumoren dar. Jedoch könnte ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen die Effektivität dieser Kombinationstherapie verstärken.

4.3 Erfolgreiche Immuntherapie beim Pankreaskarzinom

In den letzten Jahren konnten bedeutende Fortschritte in der viralen Vektortechnologie erzielt werden, einschließlich Verbesserungen bei adenoviralen Vektoren. Trotzdem ist es mit keinem der gegenwärtig verfügbaren Gentransfer-Systeme möglich, eine Transduktion jeder einzelnen Tumorzelle *in vivo* zu erreichen. Aus diesem Grund erfordert eine erfolgversprechende Krebs-Gentherapie Strategien, die auch eine Eliminierung von Tumorzellen, die das therapeutische Gen nicht exprimieren, ermöglichen.

Eine Reihe von Studien, die genetisch veränderte Tumorzellen als Impfstoffe verwendeten, hat gezeigt, dass die Transduktion von murinen Tumorzellen mit IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF in einer erhöhten systemischen Immunität in Mäusen resultiert [245]. Zudem wurden in der Klinik schon intensive Studien durchgeführt unter Verwendung von bestrahlten autologen oder allogenen Krebszellen, die manipuliert worden waren, um GM-CSF [246-250], IFN- γ [251,252] oder IL-12 [253] abzusondern. Dabei wurde gezeigt, dass wiederholte Impfungen in einigen Patienten zur Aktivierung einer Antitumor-Immunantwort und einem verbesserten Überleben führten. Eine andere Strategie basiert auf der Stimulation einer systemischen antitumoralen Immunität durch den direkten intratumoralen Transfer von immunmodulierenden Genen. Von den verschiedenen verwendeten Zytokinen hat IL-12 aufgrund seiner antitumoralen Eigenschaften eine besondere Beachtung gefunden. Für IL-12 konnte in einer Reihe von Maus-Tumormodellen gezeigt werden, dass es eine durch T-Zellen vermittelte spezifische und dauerhafte antitumorale Immunität hervorruft [254-256]. Außerdem ist bekannt, dass IL-12 mit dem costimulatorischen Molekül B7.1 synergistisch

zusammenwirkt bei der Induktion einer lokalen antitumoralen Antwort und der Inhibierung von Tumor-Metastasen [176,179,182]. Mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Ad-Vektor, der IL-12 und B7.1 coexprimiert, konnte in einem hoch-immunogenen Brustadenokarzinom-Modell in Mäusen schon eine starke antitumorale Wirksamkeit gezeigt werden [175].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein adenoviraler Vektor, der für IL-12 und B7.1 codiert (AdIL-12/B7.1), dazu verwendet, diese Zytokine direkt in etablierte, nicht-immunogene duktale Pankreastumoren zu transferieren. Die dadurch vermittelte antitumorale Wirksamkeit wurde mit der eines Ad-Vektors verglichen, der nur IL-12 exprimiert (AdIL-12). Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass nur die transiente lokale Coexpression von sowohl IL-12 als auch B7.1 zu einer vollständigen Regression eines großen Teils der Tumoren führt, und dass diese Regression mit der verwendeten Vektordosis korreliert. Darüber hinaus führte die Behandlung mit einer erhöhten Anzahl von AdIL-12/B7.1-Viruspartikeln (5×10^8 pfu) zu einer deutlich verbesserten Wiedererkennung durch das Immunsystem, wodurch ein Schutz vor parentalen Tumorzellen in der Mehrheit der behandelten Tiere (~70%) erreicht wurde. Ein kürzlich erschienener Bericht deutete an, dass die Gegenwart von B7.1 die Wirksamkeit von IL-12 reduziert, *in vivo* eine protektive antitumorale Immunität bei Leberzellkarzinomen hervorrufen zu können [218]. Jedoch konnte im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit nur in Mäusen, die mit der Kombination von IL-12 und B7.1 geheilt wurden, ein Schutz vor der Behandlung mit frischen Tumorzellen erreicht werden, nicht aber durch die Behandlung mit AdIL-12. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass die Wirksamkeit von IL-12 in einem schwach immunogenen Tumormodell, das nur eine mangelhafte endogene B7.1-Expression zeigt, durch eine B7.1 Costimulation signifikant erhöht werden kann.

Das anfängliche Versagen des Immunsystems bei der Erkennung und Eliminierung von proliferierenden Tumorzellen im Wirt ist größtenteils nicht auf einen Mangel an Tumor-assoziierten Antigenen zurückzuführen, die auch in Pankreastumoren vorhanden sind [257]. Vielmehr resultiert dieses Versagen aus einer Fehlfunktion im Ablauf der Antigen-Präsentation für das Immunsystem [258]. In der vorliegenden Arbeit wurde die beobachtete Immunantwort gegen Pan02 Tumoren sowohl von AdIL-12/B7.1 als auch von AdIL-12 offensichtlich durch die Hochregulierung von hauptsächlich $CD8^+$ -Lymphozyten und zu einem geringeren Anteil auch von $CD4^+$ -Lymphozyten vermittelt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den aus einer Reihe von anderen Tumormodellen erhaltenen Daten einer IL-12-induzierten antitumoralen Immunität, wobei die Bedeutung von T-Helferzellen zwischen den einzelnen Modellen variiert [212,259]. Übereinstimmend mit den

Beobachtungen in einem wenig immunogenen SCK Mammakarzinom-Modell, bei dem B7.1-exprimierende Tumorzellen in Kombination mit rekombinantem IL-12 eingesetzt wurden [260], ist die antitumorale Immunantwort von IL-12 und B7.1 in Pan02 Tumoren mit einer starken Induktion von IFN- γ verbunden. Jedoch waren die Werte von T-Lymphozyten und IFN- γ in AdIL-12/B7.1-injizierten Tumoren auch zwei Wochen nach der Behandlung noch erhöht, wohingegen die mit AdIL-12 behandelten Tumoren zu diesem Zeitpunkt keine erhöhten Werte mehr zeigten. Das deutet auf eine verlängerte Immunantwort hin, was erklären könnte, warum in dem in dieser Arbeit untersuchten Tumormodell IL-12 gemeinsam mit B7.1 effektiver in der Induktion einer kompletten Tumorregression und einer langfristigen protektiven antitumoralen Immunität ist als IL-12 allein. Zusätzlich zeigten die durchgeführten Experimente, dass die Immunantwort gegen Pan02 Tumoren teilweise auch von NK-Zellen abhängig ist, da eine signifikante Tumorstillstand-Verzögerung in Nacktmäusen, denen eine T-Zell-Antwort fehlt, beobachtet werden konnte. Neben der bekannten Tatsache, dass IL-12 NK-Zellen aktivieren kann, die dann wiederum die Bildung von CTLs fördern [261], werden die erhaltenen Ergebnisse durch frühere Veröffentlichungen unterstützt, die darauf hindeuten, dass B7.1 als Auslöser für murine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität wirkt und das Tumorstillstand in einem wenig immunogenen murinen Lungenkarzinom-Modell inhibieren kann [167,168]. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Stärke der B7.1-induzierten NK-Antwort das durch MHC Klasse I-Moleküle (MHC I) vermittelte negative Signal überwinden kann [262]. Durch die Aktivierung von NK-Zellen, die anschließend Tumorzellen lysieren, konnte B7.1 die Verfügbarkeit von Tumor-Antigenen für die Aufnahme durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) steigern [169].

Die Funktion von CTLs und NK-Effektorzellen wird durch MHC I kontrolliert. Für murine Pan02 duktales Pankreasadenokarzinome ist jedoch bekannt, dass sie nur niedrige Level an MHC I exprimieren [213]. Dieser Mangel an MHC I könnte auch zu der gesteigerten Tumorigenität und der verringerten Immunogenität von solchen Tumoren wie zum Beispiel humanem Pankreaskrebs beitragen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die Zufuhr von immunmodulatorischen Molekülen zu einer Hochregulierung der MHC I-Expression in zurückgehenden Tumoren als Teil der antitumoralen Immunantwort führt, was höchstwahrscheinlich auf die durch IL-12 und/oder B7.1 stimulierte IFN- γ -Produktion zurückzuführen ist. Dabei vermittelt B7.1 für T-Zellen nicht nur eine direkte Antigen-Präsentation durch Tumorzellen, sondern auch durch professionelle APCs [263]. Die Möglichkeit, dass die örtlich begrenzte Coexpression von IL-12 und B7.1 die Tumor-

Antigen-Präsentation nachweislich verbessern könnte, steht im Einklang mit einer früheren Studie, bei der gezeigt werden konnte, dass eine IL-2 Expression alleine nicht ausreichend war (IL-4 und IL-6 waren etwas wirksamer), einen systemischen Schutz gegen B16 Melanomzellen in C57BL/6 Mäusen aufzubauen [245]. Um die Art der Immunantwort gegen nicht-immunogene Tumoren zu verstehen, wurden des weiteren die Auswirkungen auf verschiedene Komponenten des Antigen-Präsentations-Signalweges untersucht, für die gezeigt worden war, dass sie in hoch malignen humanen Karzinomen häufig fehlerhaft sind [214]. Hierbei zeigten RT-PCR-Analysen eine deutliche Induktion der Abcb2 (Transporter for antigen presentation 1, TAP 1)-Expression durch beide therapeutischen Vektoren, wobei dieser Anstieg auch wieder nur in Tumoren, die mit AdIL-12/B7.1 behandelt worden waren, über einen längeren Zeitraum erhalten blieb. Dagegen zeigte keine der anderen Proteasom-Komponenten einen Expressions-Anstieg. Der TAP-Komplex steht in engem Zusammenhang mit der Tumorigenität mehrerer Krebsarten [262]. In Korrelation mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Wiedereinführung von TAP1 alleine ausreichend ist, um die virale Antigen-Präsentation in SCLCs (small cell lung carcinomas) *in vitro* wiederherzustellen. Alimonti *et al.* [264] konnten kürzlich zeigen, dass ein TAP1-Gentransfer in SCLCs eine allgemeines Verfahren zur Steigerung der Immunantwort gegen Tumoren darstellt, unabhängig vom antigenen Komplement des Tumors oder der MHC Haplotypen des Wirtes. Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten kann man zu dem Schluss kommen, dass die Hochregulierung des Antigen-Präsentations-Mechanismus in nicht-immunogenen Tumorzellen, in denen IL-12 und B7.1 coexprimiert wurden, verantwortlich ist für die starke Immunantwort gegen Pankreastumorzellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Arbeit die Verwendung von AdIL-12/B7.1 in der Tumorthherapie unterstützt, da sich der Vektor als extrem wirksam sogar bei der Behandlung von nicht-immunogenen Tumoren zeigte, zu denen ja auch zum Beispiel humane duktale Pankreaskarzinome zählen.

4.4 Erfolgreiche Immuntherapie bei WHV-induzierten HCCs in Murmeltieren

Zuvor konnte schon gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion eines Adenovirus, der IL-12 und B7.1 coexprimiert, sehr wirksam war bei der Behandlung von transplantierten PyMT-induzierten Tumoren [175] und von transplantierten Pankreastumoren [Kapitel 3.3]. Um festzustellen, ob dieses Virus auch gegen primäre Tumoren wirksam ist, wurde das gut charakterisierte Modell von WHV-induzierten hepatozellulären Karzinomen (HCCs) in

Murmeltieren verwendet. Dieses Modell ist klinisch von großer Bedeutung, da WHV eines der effizientesten Hepatokarzinogene in Murmeltieren darstellt [265]. Zudem zeigt die WHV-induzierte Hepatokarzinogenese große Übereinstimmungen mit Hepadnavirus-induzierter Karzinogenese in Menschen [216,217].

Da die zuvor erhaltenen Daten implizierten, dass die mit AdIL-12/B7.1 behandelten murinen Tumoren innerhalb von ungefähr zwei Wochen wirksam zurückgebildet werden, wurde die Immunantwort gegen nicht-transplantierte Murmeltier-Lebertumoren zunächst schon kurz nach der mittels Laparotomie erfolgten Injektion von AdIL-12/B7.1 analysiert. Im Einklang mit den schon vorher erhaltenen Daten [175,Kapitel 3.3] war auch im Murmeltier-Modell ein großer Teil der Tumormasse bereits nach 14 Tagen zurückgebildet. Das legt den Schluss nahe, dass AdIL-12/B7.1 einen ähnlichen Effekt auf das Wachstum von transplantierten und nicht-transplantierten Tumoren zu diesem frühen Zeitpunkt der Behandlung hat. Um die negativen und stressvollen Effekte eines chirurgischen Eingriffs zu vermeiden, wurden anschließend unter MRI-Anleitung große Tumorknoten lokalisiert und einer davon ausgewählt, in den der Vektor direkt injiziert wurde. Die MRI-gestützte Überwachung des ausgewählten Tumors zeigte eine langfristige Tumorrogression, die in einer nahezu vollständigen Eliminierung des Tumors resultierte. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Tumorrückgangs zwischen dem unter MRI-Kontrolle nur an einer Stelle behandelten Tumor und den während der Laparotomie multilokulär injizierten Tumoren.

In Mausmodellen konnte die intratumorale Injektion eines adenoviralen Vektors, der für IL-12 und/oder B7.1 codiert, eine systemische Immunität stimulieren, die auch gegen distale Tumoren wirksam war [157,175,266]. Im Murmeltier-Modell konnte jedoch kein deutlicher systemischer Effekt beobachtet werden, was dadurch erklärt werden kann, dass die verschiedenen Tumorknoten sich möglicherweise in ihrer Immunogenität unterscheiden, da sie nicht gleichen, d.h. klonalen Ursprungs sind, und daher unter Umständen unterschiedliche Tumorantigene exprimieren. Ein Effekt auf umliegende Tumoren könnte möglicherweise nur dann erhalten werden, wenn vaskuläre Anastomosen es dem Virus ermöglichen, sich zwischen den Tumoren zu verteilen. Daher kann in diesem Modell ein Mangel an Anastomosen zwischen dem Tumor und dem normalen Lebergewebe an der fehlenden systemischen Antwort beteiligt sein. Zudem waren im Mausmodell höhere Dosen der Zytokin-Vektoren effizienter bei der Inhibierung des Tumorwachstums als niedrige Dosen [175,267,268]. Wenn man das Körpergewicht eines Murmeltieres und die Tumorgöße von 2 bis 5 cm in Betracht zieht, dann ist die bei den Murmeltieren verwendete Virusdosis von

1×10^9 pfu recht gering im Vergleich zu den in Mäusen benutzten Dosen. Daher kann es durchaus möglich sein, dass AdIL-12/B7.1 in höheren Dosen auch in primären Tumoren eine systemische Immunität hervorruft.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rückbildung von WHV-induzierten primären Lebertumoren in Murmeltieren mit einer massiven intratumoralen Lymphozyten-Infiltration verbunden ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die intratumorale adenovirale IL-12 und B7.1 Expression in primären HCCs zu erhöhten intratumoralen Werten von IFN- γ führt. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus einer Reihe von Tumormodellen überein, die darauf hinweisen, dass die antitumorale Aktivität von IL-12 von IFN- γ abhängig ist [137,149,150]. Aus kürzlich gemachten Beobachtungen geht hervor, dass in Leberzellen von Tieren, die chronisch mit WHV infiziert sind, die Expression von MHC I-Molekülen verändert ist [269], und dass auf neoplastischen Zellen von HCC-Knoten diese Expression häufig reduziert ist [270]. Somit könnte diese Reduktion an MHC-Molekülen die Empfänglichkeit von WHV-infizierten Hepatozyten für Virus-spezifische T-Zellen vermindern, wodurch die infizierten Hepatozyten dem antiviralen immunologischen Überwachungssystem entgehen. Das gegenwärtige Modell unterstreicht die Funktion von IFN- γ bei der Regulierung der Peptid-Prozessierung und der Stimulation von Genen, die an der Antigen-Präsentation durch MHC I-Moleküle beteiligt sind [271]. Folglich könnte im Murmeltier-Modell die Aktivierung von MHC I-assoziierten Genen durch eine lokale Induktion von IFN- γ durch tumor-infiltrierende T-Lymphozyten ein möglicher Mechanismus für die effiziente Tumorrückbildung nach der IL-12/B7.1-Immuntherapie sein.

Jedoch weichen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von den Beobachtungen ab, die in etablierten, nicht-transplantierten 3-MC-induzierten Maus-Tumoren nach einem IL-7/B7.1 Gentransfer gemacht wurden [177]. In dem Modell beruht die fehlende Tumorregression auf dem Unvermögen von T-Zellen, nicht-transplantierte Tumoren zu infiltrieren. Diese Diskrepanz dürfte eher auf einen Unterschied in der T-Zell-Infiltration von Virus-induzierten gegenüber Karzinogen-induzierten Tumoren zurückzuführen sein als auf einen generellen Unterschied zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Tumoren.

Die im Murmeltier-Modell erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Adenovirusvektor-vermittelte Immuntherapie nicht auf artifizielle Maustumor-Modelle beschränkt ist und einen leistungsfähigen Ansatz für die *in vivo* Behandlung von großen, klinisch relevanten primären Tumoren darstellt. Dabei spiegelt das verwendete Modell der Hepadnavirus-induzierten Karzinogenese das reale Szenario von hepatozellulären Karzinomen in Menschen wider. Die direkte Vektor-Injektion in ausgewählte Tumorknoten

unter MRI-Kontrolle scheint eine nur gering toxische und gut durchführbare Methode zu sein, um virale Vektoren in klinischen Studien beim Menschen einzusetzen. Jedoch unterstreichen die Daten auch die Notwendigkeit, die genauen Mechanismen zu evaluieren, die an einem erfolgreichen intratumoralen Eindringen von Immuneffektorzellen beteiligt sind. Dies ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Zytokin-Behandlung in natürlich gewachsenen Tumoren.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurden Adenoviren als Vektoren für den Transfer und die nachfolgende Expression therapeutischer Gene in Tumorzellen verwendet, da sie das derzeit effizienteste Gentransfersystem im Vergleich zu anderen viralen und nicht-viralen Vektoren darstellen [195]. Mit Hilfe dieser Strategie ist es jedoch derzeit nicht möglich, die vollständige Transduktion aller Tumorzellen *in vivo* zu erreichen. Die unvollständige Transduktionseffizienz stellt eine bedeutende Limitierung aller gegenwärtig verfügbaren Systeme dar.

Dieses Problem kann beim Transfer Apoptose-induzierender Gene nur umgangen werden, wenn durch das therapeutische Gen ein sogenannter „Bystander Effekt“ hervorgerufen wird. Dieser ist definiert durch die Fähigkeit einer transduzierten Zelle, umliegende nicht-transduzierte Zellen zu töten [272,273]. Dieser Effekt kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden, z.B. durch die Inhibierung von Angiogenese oder durch den Transfer toxischer Substanzen mittels Zell-Zell-Kontakten, sogenannter „gap junctions“ [81,274]. Für p53 konnte ein solcher „Bystander Effekt“ schon gezeigt werden, allerdings war dieser Effekt nicht sehr stark und auch nicht in allen verwendeten Tumormodellen zu beobachten [81,275]. Für E2F1 dagegen konnte ein therapeutischer Effekt auf umliegende nicht-transduzierte Zellen bisher weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden. Beim Transfer von immunstimulierenden Genen wird ein therapeutischer Effekt auf Zellen, die das transfizierte Gen nicht exprimieren, dadurch erreicht, dass es durch die Aktivierung des Immunsystems zu einer Bekämpfung des gesamten Tumors kommt.

Auch bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass eine vollständige Rückbildung von Tumoren bisher nur durch den Gentransfer von immunstimulierenden Genen zu erreichen war. Daher scheint diese Art der Gentherapie Vorteile gegenüber der Behandlung mit Apoptose-induzierenden Genen zu besitzen und somit eher für eine Anwendung in klinischen Studien an Menschen geeignet zu sein. Weitere Studien, möglichst in primären Tumoren wie im Rahmen dieser Arbeit beim Murmeltier schon durchgeführt, stehen allerdings noch aus.

5. Zusammenfassung

Bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms gibt es gegenwärtig in der Klinik keine kurative Therapie. Die zurzeit verfügbaren Behandlungsmethoden sind nur palliativ wirksam, und die Fünfjahresüberlebensrate ist die niedrigste von allen humanen Neoplasien. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Wirksamkeit alternativer Behandlung durch adenoviralen Gentransfer von Apoptose-induzierenden und immun-stimulierenden Genen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

Zuerst wurde untersucht, ob der bekannteste Tumorsuppressor, p53, einen therapeutischen Effekt bei der Behandlung von Pankreastumorzellen *in vitro* erzielen kann. Die Wirksamkeit von p53 wurde mit der von p73, einem weiteren p53-Familienmitglied, verglichen, da p73 ebenfalls antitumoral wirksam ist und auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren kann, und somit eventuell bestehende p53-Resistenzen umgehen kann. Es zeigte sich, dass p53 zwar im überwiegenden Teil der untersuchten Zelllinien wirksam war, in seiner Wirkung jedoch von β -p73, der am stärksten Apoptose induzierenden p73-Isoform, bei weitem übertroffen wurde. Denn β -p73 war auch in AsPC-1 Zellen, die gegenüber p53-vermittelter Apoptose resistent waren, in der Lage, effektiv Apoptose zu induzieren. Bei der Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen zeigte sich, dass der deutlichste Unterschied zwischen p53 und β -p73 in der nur durch β -p73 erfolgten Aktivierung des pro-apoptotischen Zielgens p53AIP1 bestand. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die für eine Aktivierung von p53AIP1 notwendige Phosphorylierung von p53 am Serin-Rest 46 in den AsPC-1 Zellen nicht stattfindet.

Ein anderes Apoptose-induzierendes Protein, der Transkriptionsfaktor E2F1, wurde ebenso wie das in der Klinik verwendete Chemotherapeutikum Gemcitabine auf seine Wirksamkeit in den Pankreastumorzellen hin getestet. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit E2F1 in Kombination mit Gemcitabine in allen Fällen wirksamer war als die jeweilige Monotherapie. Die Überexpression von E2F1 sensibilisierte die Tumorzellen deutlich gegenüber dem verwendeten Chemotherapeutikum. Dabei korrelierte die hervorgerufene Apoptose-Induktion mit der Aktivierung von p73. Die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse konnten zudem *in vivo* bestätigt werden. Hier bewirkte Gemcitabine zusammen mit einem E2F1 exprimierendem Ad-Vektor eine Verbesserung der antitumoralen Wirksamkeit in einem Nacktmausmodell. Allerdings konnte keine vollständige Tumorregression erreicht werden.

Für die beim Pankreaskarzinom ebenfalls durchgeführte Immuntherapie wurde ein Ad-Vektor verwendet, der das Zytokin IL-12 und den Costimulator B7.1 gemeinsam exprimiert. Dieser wurde in etablierte Pankreastumoren injiziert, wodurch es mit der höchsten Vektordosis in über 80% der Tiere zu einer kompletten Tumorrückbildung kam. Zudem kam es in ungefähr zwei Drittel dieser geheilten Tiere zur Bildung einer protektiven Immunität gegenüber parentalen Tumorzellen. Die beobachtete Immunantwort beruhte dabei sowohl auf der Hochregulierung von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten als auch auf der Induktion von IFN- γ . Zudem wurde in Nacktmausexperimenten nachgewiesen, dass auch NK-Zellen an der Immunantwort beteiligt sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es in den Tumoren zu einer Hochregulierung des Antigen-Präsentations-Mechanismus kam. Der bei diesen Versuchen als Vergleich eingesetzte AdIL-12-Vektor, der nur IL-12 exprimiert, erzielte nicht annähernd die therapeutische Wirksamkeit von AdIL-12/B7.1. Das deutet darauf hin, dass nur die Coexpression von IL-12 und B7.1, wie bereits in anderen Tumormodellen gezeigt, eine effektive Immunantwort induzieren kann.

Abschließend wurde im Murmeltiermodell gezeigt, dass AdIL-12/B7.1 auch in klinisch relevanten primären hepatozellulären Karzinomen einen deutlichen therapeutischen Effekt hat. Ein unter MRI-Kontrolle injizierter großer Tumor konnte dabei innerhalb von 7 Wochen fast komplett zurückgebildet werden. Wie im Mausmodell, so war auch bei den primären Lebertumoren die Tumorrückbildung mit einer starken intratumoralen Lymphozyten-Infiltration und erhöhten IFN- γ -Werten verbunden. Die Daten unterstützen daher die Anwendung der Ad-Vektor-vermittelten Immuntherapie für die *in vivo* Behandlung von primären Tumoren.

6. Literaturverzeichnis

- [1] American Cancer Society
Cancer facts and figures
American Cancer Society, Atlanta, Georgia, USA (2002)
- [2] Murr, M.M.; Sarr, M.G.; Oishi, A.J.; van Heerden, J.A.
Pancreatic cancer
Cancer J. Clin. 44 (1994), 304-318
- [3] Chowdury, P.; Rayford, P.L.
Smoking and pancreatic disorders
Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 12 (2000), 869-877
- [4] Sener, S.F.; Fremgen, A.; Menck, H.R.; Winchester, D.P.
Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100.313 patients diagnosed from 1985 to 1995, using the National Cancer Database
J. Am. Coll. Surg. 189 (1999), 1-7
- [5] Rosewicz, S.; Wiedenmann, B.
Pancreatic carcinoma
Lancet 349 (1997), 485-489
- [6] Gold, E.B.; Goldin, S.B.
Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer
Surg. Oncol. Clin. N. Am. 7 (1998), 67-91
- [7] Silverman, D.T.
Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews
Teratog. Carcinog. Mutagen. 21 (2001), 7-25
- [8] Duell, E.J.; Holly, E.A.; Bracci, P.M.; Liu, M.; Wiencke, J.K.; Kelsey, K.T.
A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk
J. Natl. Cancer Inst. 94 (2002), 297-306
- [9] Hahn, S.A.; Schmiegel, W.H.
Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia
Digestion 59 (1998), 493-501
- [10] Kern, S.E.
Advances from genetic clues in pancreatic cancer
Curr. Opin. Oncol. 10 (1998), 74-80
- [11] Lionetto, R.; Pugliese, V.; Bruzzi, P.; Rosso, R.
No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer
Eur. J. Cancer 31 (1995), 882-887
- [12] Rozenblum, E.; Schutte, M.; Goggins, M.; Hahn, S.A.; Panzer, S.; Zahurak, M.; Goodman, S.N.; Sohn, T.A.; Hruban, R.H.; Yeo, C.J.; Kern, S.E.
Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma
Cancer Res. 57 (1997), 1731-1734
- [13] Clark, J.W.; Glicksman, A.S.; Wanebo, H.J.
Systemic and adjuvant therapy of patients with pancreatic carcinoma
Cancer Suppl. 78 (1996), 688-693

- [14] Glimelius, B.
Chemotherapy in the treatment of cancer of the pancreas
J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 5 (1998), 235-241
- [15] Klinkenbijn, J.H.; Jeekel, J.; Sahnoud, T.; van Pel, R.; Couvreur, M.L.; Veenhof, C.H.; Arnaud, J.P.; Gonzalez, D.G.; de Wit, L.T.; Hennipman, A.; Wils, J.
Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group
Ann. Surg. 230 (1999), 776-784
- [16] Matsuno, S.; Egawa, S.; Arai, K.
Trends in treatment of pancreatic cancer
J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 8 (2001), 544-548
- [17] Burris, H.A.; Moore, M.J.; Andersen, J.; Green, M.R.; Rothenberg, M.L.; Modiano, M.R.; Cripps, M.C.; Portenoy, R.K.; Storniolo, A.M.; Tarassoff, P.; Nelson, R.; Dorr, F.A.; Stephens, C.D.; Von Hoff, D.D.
Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial
J. Clin. Oncol. 15 (1997), 2403-2413
- [18] Wiernik, P.H.
Current Status of and Future Prospects for the Medical Management of Adenocarcinoma of the Exocrine Pancreas
J. Clin. Gastroenterol. 30 (2000), 357-363
- [19] Ahlgren, J.D.
Chemotherapy for pancreatic carcinoma
Cancer 78 (1996), 653-663
- [20] Cullinan, S.A.; Moertel, C.G.; Fleming, T.R.; Rubin, J.R.; Krook, J.E.; Everson, L.K.; Windschitl, H.E.; Twito, D.I.; Marschke, R.F.; Foley, J.F.
A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma: fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin and mitomycin
J. Am. Med. Ass. 253 (1985), 2061-2070
- [21] Cullinan, S.A.; Moertel, C.G.; Wieand, H.S.; Schutt, A.J.; Krook, J.E.; Foley, J.F.; Norris, B.D.; Kardinal, C.G.; Tschetter, L.K.; Barlow, J.F.
A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma. Evaluation of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin and cisplatin
Cancer 65 (1990), 2207-2212
- [22] Rougier, P.; Ducreux, M.; Douillard, J.Y.; Seitz, J.F.; Bugat, R.; Bosset, J.F.
Efficacy of 5-FU + cisplatin (FUP) compared to bolus 5-FU (FU) in advanced pancreatic carcinoma (APC): A randomized trial from the French Anticancer Centers Digestive Group (FNLCCDG)
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 18 (1999), abstract 1050
- [23] Safran, H.; Akerman, P.; Cioffi, W.; Gaissert, H.; Joseph, P.; King, T.; Hesketh, P.J.; Wanebo, H.
Paclitaxel and concurrent radiation therapy for locally advanced adenocarcinomas of the pancreas, stomach, and gastroesophageal junction
Semin. Radiat. Oncol. 9 (1999), 53-57
- [24] Rougier, P.
Docetaxel delivers new management opportunities for gastrointestinal carcinomas
Anticancer Drugs 4 (1995), 25-29
- [25] Mok, T.S.; Leung, T.W.
Changes in chemotherapy for pancreatic cancer
Honk Kong Med. J. 5 (1999), 367-374

- [26] Rothenberg, M.L.; Moore, M.; Cripps, M.C.; Andersen, J.S.; Portenoy, R.K.; Burris, H.A.; Green, M.R.; Tarassoff, P.G.; Brown, T.D.; Casper, E.S.; Storniolo, A.M.; Von Hoff, D.D.
A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer
Ann. Oncol. 7 (1996), 347-353
- [27] Casper, E.S.; Green, M.R.; Kelsen, D.P.; Heelan, R.T.; Brown, T.D.; Flombaum, C.D.; Trochanowski, B.; Tarassoff, P.G.
Phase II trial of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas
Invest. New Drugs 12 (1994), 29-34
- [28] Carmichael, J.; Fink, U.; Russell, R.C.; Spittle, M.F.; Harris, A.L.; Spiessi, G.; Blatter, J.
Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer
Br. J. Cancer 73 (1996), 101-105
- [29] Oettle, H.; Arnold, D.; Hempel, C.; Riess, H.
The role of gemcitabine alone and in combination in the treatment of pancreatic cancer
Anti-Cancer Drugs 11 (2000), 771-786
- [30] Heinemann, V.
Gemcitabine: Progress in the Treatment of Pancreatic Cancer
Oncology 60 (2001), 8-18
- [31] Chang, K.J.; Nguyen, P.T.; Thompson, J.A.; Kurosaki, T.T.; Casey, L.R.; Leung, E.C.; Granger, G.A.
Phase I clinical trial of allogeneic mixed lymphocyte culture (cytoimplant) delivered by endoscopic ultrasound-guided fine-needle injection in patients with advanced pancreatic carcinoma
Cancer 88 (2000), 1325-1335
- [32] Sporn, J.R.; Buzaid, A.C.; Slater, D.; Cohen, N.; Greenberg, B.R.
Treatment of advanced pancreatic adenocarcinoma with 5-FU, leucovorin, interferon-alpha-2b, and cisplatin
Am. J. Clin. Oncol. 20 (1997), 81-83
- [33] Nukui, Y.; Picozzi, V.J.; Traverso, L.W.
Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy improves survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma
Am. J. Surg. 179 (2000), 367-371
- [34] Scheithauer, W.; Kornek, G.V.; Raderer, M.; Hejna, M.; Valencak, J.; Miholic, J.; Kovats, E.; Lang, F.; Funovics, J.; Bareck, E.; Depisch, D.
Phase II trial of gemcitabine, epirubicin and granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma
Br. J. Cancer 80 (1999), 1797-1802
- [35] Löhr, M.; Hoffmeyer, A.; Kröger, J.; Freund, M.; Hain, J.; Holle, A.; Karle, P.; Knofel, W.T.; Liebe, S.; Müller, P.; Nizze, H.; Renner, M.; Saller, R.M.; Wagner, T.; Hauenstein, K.; Gunzburg, W.H.; Salmons, B.
Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma
Lancet 357 (2001), 1591-1592
- [36] Motoi, F.; Sunamura, M.; Ding, L.; Duda, D.G.; Yoshida, Y.; Zhang, W.; Matsuno, S.; Hamada, H.
Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus
Hum. Gene Ther. 11 (2000), 223-235
- [37] Bouvet, M.; Bold, R.J.; Lee, J.; Evans, D.B.; Abbruzzese, J.L.; Chiao, P.J.; McConkey, D.J.; Chandra, J.; Chada, S.; Fang, B.; Roth, J.A.
Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer
Ann. Surg. Oncol. 5 (1998), 681-688

- [38] Hwang, R.F.; Gordon, E.M.; Anderson, W.F.; Parekh, D.
Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene
Surgery 124 (1998), 143-150
- [39] Mulvihill, S.; Warren, R.; Venook, A.; Adler, A.; Randlev, B.; Heise, C.; Kirn, D.
Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial
Gene Ther. 8 (2001), 308-315
- [40] Wang, X.
The expanding role of mitochondria in apoptosis
Genes Dev. 15 (2001), 2922-2933
- [41] Schmitz, I.; Kirchhoff, S.; Krammer, P.H.
Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways
Int. J. Biochem. Cell Biol. 32 (2000), 1123-1136
- [42] Rathmell, J.C.; Thompson, C.B.
The central effectors of cell death in the immune system
Annu. Rev. Immunol. 17 (1999), 781-828
- [43] Green, D.R.
Apoptotic pathways: the roads to ruin
Cell 94 (1998), 695-698
- [44] Hanahan, D.; Weinberg, R.A.
The hallmarks of cancer
Cell 100 (2000), 57-70
- [45] Johnstone, R.W.; Ruefli, A.A.; Lowe, S.W.
Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy
Cell 108 (2002), 153-164
- [46] Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C.
p53 mutations in human cancers
Science 253 (1991), 49-53
- [47] Hollstein, M.; Shomer, B.; Greenblatt, M.; Soussi, T.; Hovig, E.; Montesano, R.; Harris, C.C.
Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation
Nucl. Acids Res. 24 (1996), 141-146
- [48] Lowe, S.W.; Lin, A.W.
Apoptosis in cancer
Carcinogenesis 21 (2000), 485-495
- [49] Donehower, L.A.; Harvey, M.; Slagle, B.L.; McArthur, M.J.; Montgomery, C.A.; Butel, J.S.; Bradley, A.
Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors
Nature 356 (1992), 215-221
- [50] Attardi, L.D.; Jacks, D.
The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models
Cell. Mol. Life Sci. 55 (1999), 48-63
- [51] Ryan, K.M.; Phillips, A.C.; Vousden, K.H.
Regulation and function of p53 tumor suppressor protein
Curr. Opin. Cell Biol. 13 (2001), 332-337

- [52] Wu, Y.; Mehew, J.W.; Heckman, C.A.; Arcinas, M.; Boxer, L.M.
Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells
Oncogene 20 (2001), 240-251
- [53] Lozano, G.; Elledge, S.J.
p53 sends nucleotides to repair DNA
Nature 404 (2000), 24-25
- [54] Levine, A.J.
p53, the cellular gatekeeper for growth and division
Cell 88 (1997), 323-331
- [55] Oren, M.
Regulation of the p53 tumor suppressor protein
J. Biol. Chem. 274 (1999), 36031-36034
- [56] El-Deiry, W.S.; Tokino, T.; Velculescu, V.E.; Levy, D.B.; Parsons, R.; Trent, J.M.; Lin, D.; Mercer, W.E.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression
Cell 75 (1993), 817-825
- [57] Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M.
Mdm2 promotes the rapid degradation of p53
Nature 387 (1997), 296-299
- [58] Kubbutat, M.H.; Jones, S.N.; Vousden, K.H.
Regulation of p53 stability by mdm2
Nature 387 (1997), 299-303
- [59] Michael, D.; Oren, M.
The p53 and mdm2 families in cancer
Curr. Opin. Gen. Dev. 12 (2002), 53-59
- [60] Nakano, K.; Vousden, K.H.
PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53
Mol. Cell 7 (2001), 683-694
- [61] Hoffman, W.H.; Biade, S.; Zilfou, J.T.; Chen, J.; Murphy, M.
Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53
J. Biol. Chem. 277 (2002), 3247-3257
- [62] Miyashita, T.; Reed, J.C.
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene
Cell 80 (1995), 293-299
- [63] Moroni, M.C.; Hickman, E.S.; Denchi, E.L.; Caprara, G.; Colli, E.; Cecconi, F.; Muller, H.; Helin, K.
Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53
Nat. Cell Biol. 3 (2001), 552-558
- [64] Lin, Y.; Ma, W.; Benchimol, S.
Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis
Nat. Gen. 26 (2000), 124-127
- [65] Okamura, S.; Arakawa, H.; Tanaka, T.; Nakanishi, H.; Ng, C.C.; Taya, Y.; Monden, M.; Nakamura, Y.
p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis
Mol. Cell 8 (2001), 85-94
- [66] Oda, K.; Arakawa, H.; Tanaka, T.; Matsuda, K.; Tanikawa, C.; Mori, T.; Nishimori, H.; Tamai, K.; Tokino, T.; Nakamura, Y.; Taya, Y.

- p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53
Cell 102 (2000), 849-862
- [67] Johnson, T.M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Lowenstein, R.A.; Finkel, T.
Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 11848-11852
- [68] Muller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M.; Friedman, S.L.; Galle, P.R.; Stremmel, W.; Oren, M.; Krammer, P.H.
p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs
J. Exp. Med. 188 (1998), 2033-2045
- [69] Guan, B.; Yue, P.; Clayman, G.L.; Sun, S.Y.
Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene
J. Cell Physiol. 188 (2001), 98-105
- [70] Wu, G.S.; Burns, T.F.; McDonald, E.R. 3rd; Jiang, W.; Meng, R.; Krantz, I.D.; Kao, G.; Gan, D.D.; Zhou, J.Y.; Muschel, R.; Hamilton, S.R.; Spinner, N.B.; Markowitz, S.; Wu, G.; el-Deiry, W.S.
KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene
Nat. Gen. 17 (1997), 141-143
- [71] Caelles, C.; Helmborg, A.; Karin, M.
p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes
Nature 370 (1994), 220-223
- [72] Soengas, M.S.; Alarcon, R.M.; Yoshida, H.; Giaccia, A.J.; Hakem, R.; Mak, T.W.; Lowe, S.W.
Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition
Science 284 (1999), 156-159
- [73] Bennett, M.; Macdonald, K.; Chan, S.W.; Luzio, J.P.; Simari, R.; Weissberg, P.
Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis
Science 282 (1998), 290-293
- [74] Giaccia, A.J.; Kastan, M.B.
The complexity of modulation: emerging patterns from divergent signals
Genes Dev. 12 (1998), 2973-2983
- [75] Vousden, K.H.; Lu, X.
Live or let die: the cell's response to p53
Nat. Rev. Cancer 2 (2002), 594-604
- [76] Bulavin, D.V.; Saito, S.; Hollander, M.C.; Sakaguchi, K.; Anderson, C.W.; Appella, E.; Fornace, A.J., Jr
Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation
EMBO J. 18 (1999), 6845-6854
- [77] D'Orazi, G.; Cecchinelli, B.; Bruno, T.; Manni, I.; Higashimoto, Y.; Saito, S.; Gostissa, M.; Coen, S.; Marchetti, A.; Del Sal, G.; Piaggio, G.; Fanciulli, M.; Appella, E.; Soddu, S.
Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis
Nat. Cell Biol. 4 (2002), 11-19
- [78] Hofmann, T.G.; Moller, A.; Sirma, H.; Zentgraf, H.; Taya, Y.; Droge, W.; Will, H.; Schmitz, M.L.
Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2
Nat. Cell Biol. 4 (2002), 1-10
- [79] Saito, S.; Goodarzi, A.A.; Higashimoto, Y.; Noda, Y.; Lees-Miller, S.P.; Appella, E.; Anderson, C.W.
ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including serine 46, in response to ionizing radiation
J. Biol. Chem. 277 (2002), 12491-12494

- [80] Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.
Achilles' heel of cancer?
Nature 412 (2001), 865-866
- [81] Rizk, N.P.; Chang, M.Y.; El Kouri, C.; Seth, P.; Kaiser, L.R.; Albelda, S.M.; Amin, K.M.
The evaluation of adenoviral p53-mediated bystander effect in gene therapy of cancer
Cancer Gene Ther. 6 (1999), 291-301
- [82] Igney, F.H.; Krammer, P.H.
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis
Nat. Rev. Cancer 2 (2002), 277-288
- [83] Gomez-Manzano, C.; Fueyo, J.; Kyritsis, A.P.; McDonnell, T.J.; Steck, P.A.; Levin, V.A.; Yung, W.K.
Characterization of p53 and p21 functional interactions in glioma cells en route to apoptosis
J. Natl. Cancer Inst. 89 (1997), 1036-1044
- [84] Samuels-Lev, Y.; O'Connor, D.J.; Bergamaschi, D.; Trigiante, G.; Hsieh, J.K.; Zhong, S.; Campargue, I.; Naumovski, L.; Crook, T.; Lu, X.
ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53
Mol. Cell 8 (2001), 781-794
- [85] Kaghad, M.; Bonnet, H.; Yang, A.; Creancier, L.; Biscan, J.C.; Valent, A.; Minty, A.; Chalon, P.; Lelias, J.M.; Dumont, X.; Ferrara, P.; McKeon, F.; Caput, D.
Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers
Cell 90 (1997), 809-819
- [86] Irwin, M.S.; Kaelin, W.G.
p53 family update: p73 and p63 develop their own identities
Cell Growth Diff. 12 (2001), 337-349
- [87] Levrero, M.; De Laurenzi, V.; Costanzo, A.; Gong, J.; Wang, J.Y.; Melino, G.
The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions
J. Cell Sci. 113 (2000), 1661-1670
- [88] Melino, G.; De Laurenzi, V.; Vousden, K.H.
p73: friend or foe in tumorigenesis
Nat. Rev. Cancer 2 (2002), 1-11
- [89] Stiewe, T.; Pützer, B.M.
p73 in apoptosis
Apoptosis 6 (2001), 447-452
- [90] Stiewe, T.; Pützer, B.M.
Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene?
Cell Death Diff. 9 (2002), 237-245
- [91] Grob, T.J.; Novak, U.; Maisse, C.; Barcaroli, D.; Luthi, A.U.; Pirnia, F.; Hugli, B.; Graber, H.U.; De Laurenzi, V.; Fey, M.F.; Melino, G.; Tobler, A.
Human $\Delta Np73$ regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53
Cell Death Diff. 8 (2001), 1213-1223
- [92] Gong, J.G.; Costanzo, A.; Yang, H.Q.; Melino, G.; Kaelin, W.G. Jr; Levrero, M.; Wang, J.Y.
The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage
Nature 399 (1999), 806-809
- [93] Agami, R.; Blandino, G.; Oren, M.; Shaul, Y.
Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis
Nature 399 (1999), 809-813

- [94] Yuan, Z.M.; Shioya, H.; Ishiko, T.; Sun, X.; Gu, J.; Huang, Y.Y.; Lu, H.; Kharbanda, S.; Weichselbaum, R.; Kufe, D.
p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage
Nature 399 (1999), 814-817
- [95] Chen, X.; Zheng, Y.; Zhu, J.; Jiang, J.; Wang, J.
p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73
Oncogene 20 (2001), 769-774
- [96] De Laurenzi, V.; Costanzo, A.; Barcaroli, D.; Terrinoni, A.; Falco, M.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Levrero, M.; Melino, G.
Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity
J. Exp. Med. 188 (1998), 1763-1768
- [97] Ueda, Y.; Hijikata, M.; Takagi, S.; Chiba, T.; Shimotohno, K.
Transcriptional activities of p73 splicing variants are regulated by inter-variant association
Biochem. J. 356 (2001), 859-866
- [98] Jost, C.A.; Marin, M.C.; Kaelin, W.G., Jr.
p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis
Nature 389 (1997), 191-194
- [99] Zhu, J.; Jiang, J.; Zhou, W.; Chen, X.
The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes
Cancer Res. 58 (1998), 5061-5065
- [100] Lee, C.W.; La Thangue, N.B.
Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73
Oncogene 18 (1999), 4171-4181
- [101] Shinoura, N.; Muramatsu, Y.; Asai, A.; Han, S.; Horii, A.; Kirino, T.; Hamada, H.
Degree of apoptosis induced by adenovirus-mediated transduction of p53 or p73alpha depends on the p53 status of glioma cells
Cancer Letters 160 (2000), 67-73
- [102] Furukawa, Y.; Terui, Y.; Sakoe, K.; Ohta, M.; Saito, M.
The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of cdc2 mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells
J. Biol. Chem. 269 (1994), 26249-26258
- [103] La Thangue, N.B.
E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control
Biochem. Soc. Trans. 24 (1996), 54-59
- [104] Slansky, J.E.; Farnham, P.J.
Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 208 (1996), 1-30
- [105] Harbour, J.W.; Dean, D.C.
The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms
Genes Dev. 14 (2000), 2393-2409
- [106] Sherr, C.J.
Cancer cell cycles
Science 274 (1996), 1672-1677
- [107] Phillips, A.C.; Vousden, K.H.
E2F-1 induced apoptosis
Apoptosis 6 (2001), 173-182

- [108] Kowalik, T.F.; DeGregori, J.; Schwarz, J.K.; Nevins, J.R.
E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis
J. Virol. 69 (1995), 2491-2500
- [109] Kaelin, W.G. Jr; Krek, W.; Sellers, W.R.; DeCaprio, J.A.; Ajchenbaum, F.; Fuchs, C.S.; Chittenden, T.; Li, Y.; Farnham, P.J.; Blanar, M.A.; Livingston, D.M.; Flemington, E.K.
Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties
Cell 70 (1992), 351-364
- [110] Hollingsworth, R.E. Jr; Chen, P.L.; Lee, W.H.
Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein
Curr. Opin. Cell. Biol. 5 (1993), 194-200
- [111] Moberg, K.; Starz, M.A.; Lees, J.A.
E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry
Mol. Cell. Biol. 16 (1996), 1436-1449
- [112] Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E.; Dyson, N.J.
Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1
Cell 85 (1996), 537-548
- [113] Wu, X.; Levine, A.J.
p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3602-3606
- [114] Fueyo, J.; Gomez-Manzano, C.; Yung, W.K.; Liu, T.J.; Alemany, R.; McDonnell, T.J.; Shi, X.; Rao, J.S.; Levin, V.A.; Kyritsis, A.P.
Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth in vitro and in vivo
Nat. Med. 4 (1998), 685-690
- [115] Zhu, J.W.; DeRyckere, D.; Li, F.X.; Wan, Y.Y.; DeGregori, J.
A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection
Cell Growth Diff. 10 (1999), 829-838
- [116] Stiewe, T.; Pützer, B.M.
Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis
Nat. Gen. 26 (2000), 464-469
- [117] Moroni, M.C.; Hickman, E.S.; Denchi, E.L.; Caprara, G.; Colli, E.; Cecconi, F.; Muller, H.; Helin, K.
Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53
Nat. Cell Biol. 3 (2001), 552-558
- [118] Furukawa, Y.; Nishimura, N.; Furukawa, Y.; Satoh, M.; Endo, H.; Iwase, S.; Yamada, H.; Matsuda, M.; Kano, Y.; Nakamura, M.
Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis
J. Biol. Chem. (2002), epub ahead of print
- [119] Hsieh, J.K.; Fredersdorf, S.; Kouzarides, T.; Martin, K.; Lu, X.
E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction
Genes Dev. 11 (1997), 1840-1852
- [120] Phillips, A.C.; Ernst, M.K.; Bates, S.; Rice, N.R.; Vousden, K.H.
E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways
Mol. Cell 4 (1999), 771-781
- [121] Tanaka, H.; Matsumura, I.; Ezoe, S.; Satoh, Y.; Sakamaki, T.; Albanese, C.; Machii, T.; Pestell, R.G.; Kanakura, Y.
E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination

- Mol. Cell* **9** (2002), 1017-1029
- [122] Croxton, R.; Ma, Y.; Song, L.; Haura, E.B.; Cress, W.D.
Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1
Oncogene **21** (2002), 1359-1369
- [123] Gilboa, E.
How tumors escape immune destruction and what we can do about it
Cancer Immunol. Immunother. **48** (1999), 382-385
- [124] Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Cabrera, T.; Perez-Villar, J.J.; Lopez-Botet, M.; Duggan-Keen, M.; Stern, P.L.
Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours
Immunol. Today **18** (1997), 89-95
- [125] Parmiani, G.; Colombo, M.P.; Melani, C.; Arienti, F.
Cytokine gene transduction in the immunotherapy of cancer
Adv. Pharmacol. **40** (1997), 259-307
- [126] Kawakami, Y.; Nishimura, M.I.; Restifo, N.P.; Topalian, S.L.; O'Neil, B.H.; Shilyansky, J.; Yannelli, J.R.; Rosenberg, S.A.
T-cell recognition of human melanoma antigens
J. Immunother. **14** (1993), 88-93
- [127] Browning, M.J.; Bodmer, W.F.
MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance
Curr. Opin. Immunol. **4** (1992), 613-618
- [128] Fearon, E.R.; Pardoll, D.; Itaya, T.; Golumbek, P.; Levitsky, H.I.; Simons, J.W.; Karasuyama, H.; Vogelstein, B.; Frost, P.
Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of antitumor response
Cell **60** (1990), 397-403
- [129] Gansbacher, B.; Zier, K.; Daniels, B.; Cronin, K.; Bannerji, R.; Gilboa, E.
Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity
J. Exp. Med. **172** (1990), 1217-1224
- [130] Colombo, M.P.; Parmiani, G.
Tumor-cell-targeted cytokine gene therapy
Immunol. Today **12** (1991), 249-250
- [131] Esandi, M.C.; van Someren, G.D.; Bout, A.; Mulder, A.H.; van Bekkum, D.W.; Valerio, D.; Noteboom, J.L.
IL-1/IL-3 gene therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC) in rats using "cracked" adenoproducer cells
Gene Ther. **5** (1998), 778-788
- [132] Addison, C.L.; Braciak, T.; Ralston, R.; Muller, W.J.; Gauldie, J.; Graham, F.L.
Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-2 induces regression and immunity in murine breast cancer model
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** (1995), 8522-8526
- [133] Chiang, C.S.; Hong, J.H.; Wu, Y.C.; McBride, W.H.; Dougherty, G.H.
Combining radiation therapy with interleukin-3 gene immunotherapy
Cancer Gene Ther. **7** (2000), 1172-1178
- [134] Addison, C.A.; Gauldie, J.; Muller, W.J.; Graham, F.L.
An adenovirus vector expressing interleukin-4 modulates tumorigenicity and induces regression in a murine breast cancer model

- Int. J. Oncol.* 7 (1995), 1253-1260
- [135] Mullen, C.A.; Coale, M.M.; Levy, A.T.; Stetler-Stevenson, W.G.; Liotta, L.A.; Brandt, S.; Blaese, R.M. Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibited reduced tumorigenicity, increased immunogenicity, and decreased metastatic potential
Cancer Res. 52 (1992), 6020-6024
- [136] Sharma, S.; Wang, J.; Huang, M.; Paul, R.W.; Lee, P.; McBride, W.H.; Economou, J.S.; Roth, M.D.; Kiertscher, S.M.; Dubinett, S.M.
Interleukin-7 gene transfer in non-small-cell lung cancer decreases tumor proliferation, modifies cell surface molecule expression, and enhances antitumor reactivity
Cancer Gene Ther. 6 (1999), 302-313
- [137] Bramson, J.; Hitt, M.; Addison, C.L.; Muller, W.J.; Gauldie, J.; Graham, F.L.
Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12
Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1995-2002
- [138] Tasaki, K.; Yoshida, Y.; Maeda, T.; Miyauchi, M.; Kawamura, K.; Takenaga, K.; Yamamoto, H.; Kouzu, T.; Asano, T.; Ochiai, T.; Sakiyama, S.; Tagawa, M.
Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type 1 helper T cells
Cancer Gene Ther. 7 (2000), 247-254
- [139] Marr, R.A.; Hitt, M.; Muller, W.J.; Gauldie, J.; Graham, F.L.
Tumour therapy in mice using adenovirus vectors expressing human TNFa
Int. J. Oncol. 12 (1998), 509-515
- [140] Cao, G.; Su, J.; Lu, W.; Zhang, F.; Zhao, G.; Marteralli, D.; Dong, Z.
Adenovirus-mediated interferon-beta gene therapy suppresses growth and metastasis of human prostate cancer in nude mice
Cancer Gene Ther. 8 (2001), 497-505
- [141] Fujii, S.; Huang, S.; Fong, T.C.; Ando, D.; Burrows, F.; Jolly, D.J.; Nemunaitis, J.; Hoon, D.S.
Induction of melanoma-associated antigen systemic immunity upon intratumoral delivery of interferon-gamma retroviral vector in melanoma patients
Cancer Gene Ther. 7 (2000), 1220-1230
- [142] Hock, H.; Dorsch, M.; Kunzendorf, U.; Qin, Z.; Diamantstein, T.; Blankenstein, T.
Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 2774-2778
- [143] Brunda, M.J.; Luistro, L.; Warriar, R.R.; Wright, R.B.; Hubbard, B.R.; Murphy, M.; Wolf, S.F.; Gately, M.K.
Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors
J. Exp. Med. 178 (1993), 1223-1230
- [144] Tahara, H.; Zeh, H.J.; Storkus, W.J.; Pappo, I.; Watkins, S.C.; Gubler, U.; Wolf, S.F.; Robbins, P.D.; Lotze, M.T.
Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma *in vivo*
Cancer Res. 54 (1994), 182-189
- [145] Rakhmilevich, A.L.; Turner, J.; Ford, M.J.; McCabe, D.; Sun, W.H.; Sondel, P.M.; Grota, K.; Yang, N.S.
Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic tumors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 6291-6296

- [146] Wolf, S.F.; Temple, P.A.; Kobayashi, M.; Young, D.; Dicig, M.; Lowe, L.; Dzialo, R.; Fitz, L.; Ferenz, C.; Hewick, R.M.
Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells
J. Immunol. 146 (1991), 3074-3081
- [147] Trinchieri, G.
Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity
Annu. Rev. Immunol. 13 (1995), 251-276
- [148] Trinchieri, G.
Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity
Adv. Immunol. 70 (1998), 83-243
- [149] Zitvogel, L.; Tahara, H.; Robbins, P.D.; Storkus, W.J.; Clarke, M.R.; Nalesnik, M.A.; Lotze, M.T.
Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts
J. Immunol. 155 (1995), 1393-1403
- [150] Tannenbaum, C.S.; Wicker, N.; Armstrong, D.; Tubbs, R.; Finke, J.; Bukowski, R.; Hamilton, T.A.
Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12
J. Immunol. 156 (1996), 693-699
- [151] Tahara, H.; Lotze, M.T.
Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer
Gene Ther. 2 (1995), 96-106
- [152] Scott, P.
IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity
Science 260 (1993), 496-497
- [153] Voest, E.E.; Kenyon, B.; O'Reilly, M.S.; Truitt, G.; D'Amato, R.; Folkman, J.
Interleukin-12 inhibits angiogenesis *in vivo*
J. Natl. Cancer Inst. 87 (1995), 581-588
- [154] Sgadari, C.; Angiolillo, A.L.; Tosato, G.
Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10
Blood 87 (1996), 3877-3882
- [155] Mackensen, A.; Lindemann, A.; Mertelsmann, R.
Immunostimulatory cytokines in somatic cells and gene therapy of cancer
Cytokine Growth Factor Rev. 8 (1997), 119-128
- [156] Melero, I.; Mazzolini, G.; Narvaiza, I.; Qian, C.; Chen, L.; Prieto, J.
IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies
Trends Immunol. 22 (2001), 113-115
- [157] Kuiper, M.; Sanches, R.; Bignon, Y.J.; Farzaneh, F.
B7.1 and cytokines. Synergy in cancer gene therapy
Adv. Exp. Med. Biol. 465 (2000), 381-390
- [158] Mortarini, R.; Borri, A.; Tragni, G.; Bersani, I.; Vegetti, C.; Bajetta, E.; Pilotti, S.; Cerundolo, V.; Anichini, A.
Peripheral burst of tumor-specific T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8⁺ T cells in melanoma patients receiving interleukin 12
Cancer Res. 60 (2000), 3559-3568
- [159] Galea-Lauri, J.; Farzaneh, F.; Gäken, J.

- Novel costimulators in the immune gene therapy of cancer
Cancer Gene Ther. 3 (1996), 202-213
- [160] Galea-Lauri, J.; Darling, D.; Kuiper, M.; Gäken, J.; Souberbielle, B.; Farzaneh, F.
Expression of a variant CD28 on a sub-population of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells
J. Immunol. 160 (1998),
- [161] Azuma, M.; Cayabyab, M.; Buck, D.; Phillips, J.H.; Lanier, L.L.
Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line
J. Immunol. 149 (1992), 1115-1123
- [162] Pardoll, D.M.
Cancer vaccines
Nat. Med. Vac. Suppl. 4 (1998), 525-531
- [163] Judge, T.A.; Tang, A.; Spain, L.M.; Deans-Gratiot, J.; Sayegh, M.H.; Turka, L.A.
The in vivo mechanism of action of CTLA4Ig
J. Immunol. 156 (1996), 2294-2299
- [164] Sharpe, A.H.; Freeman, G.J.
The B7-CD28 superfamily
Nat. Rev. Immunol. 2 (2002), 116-126
- [165] Shawler, D.L.; Fakhrai, H.; Van Beveren, C.; Mercola, D.; Gold, D.P.; Bartholomew, R.M.; Royston, I.; Sobol, R.E.
Gene therapy approaches to enhance antitumor immunity
Adv. Pharmacol. 40 (1997), 309-337
- [166] Chen, L.; McGowan, P.; Ashe, S.; Johnston, J.; Li, Y.; Hellström, I.; Hellström, K.E.
Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity
J. Exp. Med. 179 (1994), 523-532
- [167] Yeh, K.Y.; Pulaski, B.A.; Woods, M.L.; McAdam, A.J.; Gaspari, A.A.; Frelinger, J.G.; Lord, E.M.
B7-1 enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity and inhibits tumor growth of a poorly immunogenic murine carcinoma
Cell. Immunol. 165 (1995), 217-224
- [168] Chambers, B.J.; Salcedo, M.; Ljunggren, H.G.
Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1)
Immunity 5 (1996), 311-317
- [169] Wu, T.C.; Huang, A.Y.; Jaffee, E.M.; Levitsky, H.I.; Pardoll, D.M.
A reassessment of the role of B7-1 expression in tumor rejection
J. Exp. Med. 182 (1995), 1415-1421
- [170] McAdam, A.; Schweitzer, A.; Sharpe, A.H.
The role of B7 costimulation in activation and differentiation of CD4 and CD8 T cells
Immunol. Rev. 165 (1998), 231-247
- [171] Matulonis, U.; Dosiou, C.; Freeman, G.; Lamont, C.; Mauch, P.; Nadler, L.M.; Griffin, J.D.
B7.1 is superior to B7.2 costimulation in the induction and maintenance of T-cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7.1 and B7.2 are functionally distinct
J. Immunol. 156 (1996), 1126-1131
- [172] Gajewski, T.F.; Fallarino, F.; Uyttenhove, C.; Boon, T.
Tumor rejection requires a CTLA4 ligand provided by the host or expressed on the tumor: superiority of B7-1 over B7-2 for active tumor immunization
J. Immunol. 156 (1996), 2909-2917

- [173] Emtage, P.C.; Wan, Y.; Muller, W.; Graham, F.L.; Gauldie, J.
Enhanced interleukin-2 gene transfer immunotherapy of breast cancer by coexpression of B7-1 and B7-2
J. Interferon Cytokine Res. 18 (1998), 927-937
- [174] Prabhu Das, M.R.; Zamvill, S.S.; Borriello, F.; Weiner, H.L.; Sharpe, A.H.; Kuchroo, V.K.
Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation
Eur. J. Immunol. 25 (1995), 207
- [175] Pützer, B.M.; Hitt, M.; Muller, W.J.; Emtage, P.; Gauldie, J.; Graham, F.L.
Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 10889-10894
- [176] Chong, H.; Todryk, S.; Hutchinson, G.; Hart, I.R.; Vile, R.G.
Tumour cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity
Gene Ther. 5 (1998), 223-232
- [177] Willimsky, G.; Blankenstein, T.
Interleukin-7/B7.1-encoding adenoviruses induce rejection of transplanted but not non-transplanted tumors
Cancer Res. 60 (2000), 685-692
- [178] Emtage, P.C.; Wan, Y.; Bramson, J.L.; Graham, F.L.; Gauldie, J.
A double recombinant adenovirus expressing the costimulatory molecule B7-1 (murine) and human IL-2 induces complete tumor regression in a murine breast adenocarcinoma model
J. Immunol. 160 (1998), 2531-2538
- [179] Nishimura, T.; Watanabe, K.; Yahata, T.; Uede, T.; Saiki, I.; Herrmann, S.H.; Kobayashi, M.; Habu, S.
The application of IL-12 to cytokine therapy and gene therapy for tumors
Ann. N. Y. Acad. Sci. 795 (1996), 375-378
- [180] Kato, K.; Okumura, K.; Yagita, H.
Immunoregulation by B7 and IL-12 gene transfer
Leukemia 11 (1997), 572-576
- [181] Chen, P.W.; Geer, D.C.; Podack, E.R.; Ksander, B.R.
Tumor cells transfected with B7-1 and interleukin-12 cDNA induce protective immunity
Ann. N. Y. Acad. Sci. 795 (1996), 325-327
- [182] Zitvogel, L.; Robbins, P.D.; Storkus, W.J.; Clarke, M.R.; Maeurer, M.J.; Campbell, R.L.; Davis, C.G.; Tahara, H.; Schreiber, R.D.; Lotze M.T.
Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors
Eur. J. Immunol. 6 (1996), 1335-1341
- [183] Pizzoferrato, E.; Chu, N.R.; Hawley, T.S.; Lieu, F.H.L.; Barber, B.H.; Hawley, R.G.; Watts, T.H.; Berinstein, N.L.
Enhanced immunogenicity of B cell lymphoma genetically engineered to express both B7.1 and interleukin-12
Hum. Gene Ther. 8 (1997), 2217-2228
- [184] Roy-Chowdhury, J.; Horwitz, M.S.
Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors
Mol. Ther. 5 (2002), 340-344
- [185] Hitt, M.; Bett, A.J.; Addison, C.L.; Prevec, L.; Graham, F.L.

- Techniques for human adenovirus vector construction and characterization
Methods Mol. Gen. 7 (1995), 13-30
- [186] Brody, S.L.; Crystal, R.G.
Adenovirus-mediated in vivo gene transfer
Ann. N. Y. Acad. Sci. 716 (1994), 90-101
- [187] Bramson, J.L.; Graham, F.L.; Gauldie, J.
The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer *in vivo*
Curr. Opin. Biotechn. 6 (1995), 590-595
- [188] Yang, Y.; Nunes, F.A.; Berencsi, K.; Furth, E.E.; Gonczol, E.; Wilson, J.M.
Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 4407-4411
- [189] Wilmott, R.W.; Amin, R.S.; Perez, C.R.; Wert, S.E.M.; Keller, G.; Boivin, G.P.; Hirsch, R.; De Inocencio, J.; Lu, P.; Reising, S.F.; Yei, S.; Whitsett, J.A.; Trapnell, B.C.
Safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lungs of nonhuman primates
Hum. Gene Ther. 7 (1996), 301-318
- [190] Toloza, E.M.; Hunt, K.; Swisher, S.; McBride, W.; Lau, R.; Pang, S.; Rhoades, K.; Drake, T.; Belldegrun, A.; Glaspy, J.; Economou, J.S.
In vivo cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector
Cancer Gene Ther. 3 (1996), 11-17
- [191] Parks, R.J.; Chen, L.; Anton, M.; Sankar, U.; Rudnicki, M.A.; Graham, F.L.
A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 13565-13570
- [192] Chen, L.; Anton, M.; Graham, F.L.
Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre
Som. Cell Mol. Genet. 22 (1996), 477-488
- [193] Anton, M.; Graham, F.L.
Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression
J. Virol. 69 (1995), 4600-4606
- [194] Maione, D.; Della Rocca, C.; Giannetti, P.; D'Arrigo, R.; Liberatoscioli, L.; Franlin, L.L.; Sandig, V.; Ciliberto, G.; La Monica, N.; Savino, R.
An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 5986-5991
- [195] Hitt, M.; Addison, C.L.; Graham, F.L.
Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells
Adv. Pharmacol. 40 (1997), 137-206
- [196] van den Hoff, M.J.; Moorman, A.F.; Lamers, W.H.
Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival
Nucleic Acids Res. 20 (1992), 2902
- [197] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.
Molecular Cloning, A laboratory manual.
2. Ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- [198] Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986

- Biotechnology* 24 (1992), 17-27
- [199] D'Aquila, R.T.; Bechtel, L.J.; Videler, J.A.; Eron, J.J.; Gorczyca, P.; Kaplan, J.C.
Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating
Nucleic Acids Res. 19 (1991), 3749
- [200] Bradford, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254
- [201] He, T.C.; Zhou, S.; da Costa, L.T.; Yu, J.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.
A simplified system for generating recombinant adenoviruses
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 2509-2514
- [202] Corbett, T.H.; Roberts, B.J.; Leopold, W.R.; Peckham, J.C.; Wilkoff, L.J.; Griswold, D.P.; Schabel, F.M.
Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice
Cancer Res. 44 (1984), 717-726
- [203] Roemer, K.; Friedmann, T.
Mechanisms of action of the p53 tumor suppressor and prospects for cancer gene therapy by reconstitution of p53 function
Ann. N.Y. Acad. Sci. 716 (1994), 265-280
- [204] Polyak, K.; Waldman, T.; He, T.C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.
Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest
Genes Dev. 10 (1996), 1945-1952
- [205] Berrozpe, G.; Schaeffer, J.; Peinado, M.A.; Real, F.X.; Perucho, M.
Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer
Int. J. Cancer 58 (1994), 185-191
- [206] Sasaki, Y.; Morimoto, I.; Ishida, S.; Yamashita, T.; Imai, K.; Tokino, T.
Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer
Gene Ther. 8 (2001), 1401-1408
- [207] Pützer, B.M.; Stiewe, T.; Crespo, F.; Esche, H.
Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy
Gene Ther. 7 (2000), 1317-1325
- [208] Pellegata, N.S.; Sessa, F.; Renault, B.; Bonato, M.; Leone, B.E.; Solcia, E.; Ranzani, G.N.
K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions
Cancer Res. 54 (1994), 1556-1560
- [209] Lund, B.; Kristjansen, P.E.; Hansen, H.H.
Clinical and preclinical activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine)
Cancer Treat. Rev. 19 (1993), 45-55
- [210] Schy, W.E.; Hertel, L.W.; Kroin, J.S.; Bloom, L.B.; Goodman, M.F.; Richardson, F.C.
Effect of a template-located 2',2'-difluorodeoxycytidine on the kinetics and fidelity of base insertion by Klenow (3'-->5'exonuclease-) fragment
Cancer Res. 53 (1993), 4582-4587
- [211] Bates, S.; Phillips, A.C.; Clark, P.A.; Stott, F.; Peters, G.; Ludwig, R.L.; Vousden, K.H.
p14ARF links the tumour suppressors RB and p53
Nature 395 (1998), 124-125

- [212] Emtage, P.C.; Wan, Y.; Hitt, M.; Graham, F.L.; Muller, W.J.; Zlotnik, A.; Gaudie, J.
Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models
Hum. Gene Ther. 10 (1999), 697-709
- [213] Clary, B.M.; Coveney, E.C.; Philip, R.; Blazer, D.G. 3rd; Morse, M.; Gilboa, E.; Lysterly, H.K.
Inhibition of established pancreatic cancers following specific active immunotherapy with interleukin-2 gene-transduced tumor cells
Cancer Gene Ther. 4 (1997), 97-104
- [214] Gabathuler, R.; Reid, G.; Kolaitis, G.; Driscoll, J.; Jefferies, W.A.
Comparison of cell lines deficient in antigen presentation reveals a functional role for TAP-1 alone in antigen processing
J. Exp. Med. 180 (1994), 1415-1425
- [215] Gerin, J.L.; Cote, P.J.; Korba, B.E.; Miller, R.H.; Purcell, R.H.; Tennant, B.C.
Hepatitis B virus and liver cancer: the woodchuck as an experimental model of hepadnavirus-induced liver cancer
In: Hollinger, F.B.; Lemon, S.M.; Margolis, H.; editors. Viral hepatitis and liver disease. Baltimore (MD): Williams & Wilkins (1991), 556-559
- [216] Roggendorf, M.; Tolle, K.
The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man
Intervirology 38 (1995), 100-112
- [217] Ponzetto, A.; Forzani, B.
Animal models of hepatocellular carcinoma: hepadnavirus-induced liver cancer in woodchucks
Ital. J. Gastroenterol. 23 (1991), 491-493
- [218] Sun, Y.; Qian, C.; Peng, D.; Prieto, J.
Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 plus interleukin 12 changes immunoeffector mechanisms and suppresses helper T cell type 1 cytokine production induced by interleukin 12 alone
Hum. Gene Ther. 11 (2000), 127-138
- [219] Qin, Z.; Richter, G.; Schuler, T.; Ibe, S.; Cao, X.; Blankenstein, T.
B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity
Nat. Med. 4 (1998), 627-630
- [220] Horiguchi, S.; Petersson, M.; Nakazawa, T.; Kanda, M.; Zea, A.H.; Ochoa, A.C.; Kiessling, R.
Primary chemically induced tumors induce profound immunosuppression concomitant with apoptosis and alterations in signal transduction in T cells and NK cells
Cancer Res. 59 (1999), 2950-2956
- [221] Frommel, D.; Crevat, D.; Vitvitsky, L.; Pichoud, C.; Hantz, O.; Chevalier, M.; Grimaud, J.A.; Lindberg, J.; Trepo, C.G.
Immunopathologic aspects of woodchuck hepatitis
Am. J. Pathol. 115 (1984), 125-134
- [222] Cascallo, M.; Mercade, E.; Capella, G.; Lluís, F.; Fillat, C.; Gomez-Foix, A.M.; Mazo, A.
Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wild-type p53 expression in pancreatic tumor cells
Cancer Gene Ther. 6 (1999), 428-436
- [223] Ghaneh, P.; Greenhalf, W.; Humphreys, M.; Wilson, D.; Zumstein, L.; Lemoine, N.R.; Neoptolemos, J.P.
Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression in vitro and in vivo
Gene Ther. 8 (2001), 199-208
- [224] Cascallo, M.; Calbo, J.; Gelpi, J.L.; Mazo, A.

- Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer
Cancer Gene Ther. 7 (2000), 545-556
- [225] Ishida, S.; Yamashita, T.; Nakaya, U.; Tokino, T.
Adenovirus-mediated transfer of p53-related genes induces apoptosis of human cancer cells
Jpn. J. Cancer Res. 91 (2000), 174-180
- [226] Kimura, M.; Tagawa, M.; Takenaga, K.; Yamaguchi, T.; Saisho, H.; Nakagawara, A.; Sakiyama, S.
Inability to induce the alteration of tumorigenicity and chemosensitivity of p53-null human pancreatic carcinoma cells after the transduction of wild-type p53 gene
Anticancer Res. 17 (1997), 879-883
- [227] Kusumoto, M.; Ogawa, T.; Mizumoto, K.; Ueno, H.; Niiyama, H.; Sato, N.; Nakamura, M.; Tanaka, M.
Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells
Clin. Cancer Res. 5 (1999), 2140-2147
- [228] Shono, T.; Tofilon, P.J.; Schaefer, T.S.; Parikh, D.; Liu, T.J.; Lang, F.F.
Apoptosis induced by adenovirus-mediated p53 gene transfer in human glioma correlates with site-specific phosphorylation
Cancer Res. 62 (2002), 1069-1076
- [229] Kim, E.J.; Park, J.S.; Um, S.J.
Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family in vivo
J. Biol. Chem. 277 (2002), 32020-32028
- [230] Costanzo, A.; Merlo, P.; Pediconi, N.; Fulco, M.; Sartorelli, V.; Cole, P.A.; Fontemaggi, G.; Fanciulli, M.; Schiltz, L.; Blandino, G.; Balsano, C.; Levrero, M.
DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes
Mol. Cell 9 (2002), 175-186
- [231] Cheon, J.; Ko, S.C.; Gardner, T.A.; Shirakawa, T.; Gotoh, A.; Kao, C.; Chung, L.W.
Chemogene therapy: osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model
Cancer Gene Ther. 4 (1997), 359-365
- [232] Nemunaitis, J.; Swisher, S.G.; Timmons, T.; Connors, D.; Mack, M.; Doerksen, L.; Weill, D.; Wait, J.; Lawrence, D.D.; Kemp, B.L.; Fossella, F.; Glisson, B.S.; Hong, W.K.; Khuri, F.R.; Kurie, J.M.; Lee, J.J.; Lee, J.S.; Nguyen, D.M.; Nesbitt, J.C.; Perez-Soler, R.; Pisters, K.M.; Putnam, J.B.; Richli, W.R.; Shin, D.M.; Walsh, G.L.; Merritt, J.; Roth, J.
Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer
J. Clin. Oncol. 18 (2000), 609-622
- [233] Manegold, C.; Zatloukal, P.; Krejcy, K.; Blatter, J.
Gemcitabine in non-small cell lung cancer (NSCLC)
Invest. New Drugs 18 (2000), 29-42
- [234] Orlando, M.; Mandachain, M.
Gemcitabine in ovarian cancer
Semin. Oncol. 28 (2001), 62-69
- [235] von der Maase, H.
Gemcitabine-containing regimens in bladder cancer: a new standard of care
Semin. Oncol. 28 (2001), 1-3
- [236] Storniolo, A.M.; Allerheiligen, S.R.; Pearce, H.L.
Preclinical, pharmacologic, and phase I studies of gemcitabine

- Semin. Oncol.* 24 (1997), S7-2-S7-7
- [237] Reed, J.C.; Miyashita, T.; Takayama, S.; Wang, H.G.; Sato, T.; Krajewski, S.; Aime-Sempe, C.; Bodrug, S.; Kitada, S.; Hanada, M.
Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy
J. Cell. Biochem. 60 (1996), 23-32
- [238] Xu, Z.; Friess, H.; Büchler, M.W.; Solioz, M.
Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents
Cancer Chemother. Pharmacol. 49 (2002), 504-510
- [239] Xu, Z.; Friess, H.; Solioz, M.; Aebi, S.; Korc, M.; Kleeff, J.; Buchler, M.W.
Bcl-x(L) antisense oligonucleotides induce apoptosis and increase sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine
Int. J. Cancer 94 (2001), 268-274
- [240] Shi, X.; Liu, S.; Kleeff, J.; Friess, H.; Buchler, M.W.
Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes
Oncology 62 (2002), 354-362
- [241] Dong, Y.B.; Yang, H.L.; Elliot, M.J.; McMasters, K.M.
Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors
Cancer Res. 62 (2002), 1776-1783
- [242] Plath, T.; Peters, M.; Detjen, K.; Welzel, M.; von Marschall, Z.; Radke, C.; Wiedenmann, B.; Rosewicz, S.
Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis
J. Natl. Cancer Inst. 94 (2002), 129-142
- [243] Elliot, M.J.; Farmer, M.R.; Atienza, C.; Stilwell, A.; Dong, Y.B.; Yang, H.L.; Wong, S.L.; McMasters, K.M.
E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells
Tumor Biol. 23 (2002), 76-86
- [244] Eymin, B.; Karayan, L.; Seite, P.; Brambilla, C.; Larsen, C.J.; Gazzeri, S.
Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity
Oncogene 10 (2001), 1033-1041
- [245] Dranoff, G.; Jaffee, E.; Lazenby, A.; Golumbek, P.; Levitsky, H.; Brose, K.; Jackson, V.; Hamada, H.; Pardoll, D.; Mulligan, R.C.
Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 3539-3543
- [246] Simons, J.W.; Mikhak, B.
Ex-vivo gene therapy using cytokine-transduced tumor vaccines: molecular and clinical pharmacology
Semin. Oncol. 25 (1998), 661-676
- [247] Jaffee, E.M.; Abrams, R.; Cameron, J.; Donehower, R.; Duerr, M.; Gossett, J.; Greten, T.F.; Grochow, L.; Hruban, R.; Kern, S.; Lillemoe, K.D.; O'Reilly, S.; Pardoll, D.; Pitt, H.A.; Sauter, P.; Weber, C.; Yeo, C.
A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma
Hum. Gene Ther. 9 (1998), 1951-1971

- [248] Simons, J.W.; Mikhak, B.; Chang, J.F.; DeMarzo, A.M.; Carducci, M.A.; Lim, M.; Weber, C.E.; Baccala, A.A.; Goemann, M.A.; Clift, S.M.; Ando, D.G.; Levitsky, H.I.; Cohen, L.K.; Sanda, M.G.; Mulligan, R.C.; Partin, A.W.; Carter, H.B.; Piantadosi, S.; Marshall, F.F.; Nelson, W.G.
Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer
Cancer Res. 59 (1999), 5160-5168
- [249] Chang, A.E.; Li, Q.; Bishop, D.K.; Normolle, D.P.; Redman, B.D.; Nickoloff, B.J.
Immunogenetic therapy of human melanoma utilizing autologous tumor cells transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Hum. Gene Ther. 11 (2000), 839-850
- [250] Kusumoto, M.; Umeda, S.; Ikubo, A.; Aoki, Y.; Tawfik, O.; Oben, R.; Williamson, S.; Jewell, W.; Suzuki, T.
Phase I clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene
Cancer Immunol. Immunother. 50 (2001), 373-381
- [251] Nemunaitis, J.; Bohart, C.; Fong, T.; Meyer, W.; Edelman, G.; Paulson, R.S.; Orr, D.; Jain, V.; O'Brien, J.; Kuhn, J.; Kowal, K.J.; Burkeholder, S.; Bruce, J.; Ognoskie, N.; Wynne, D.; Martineau, D.; Ando, D.
Phase I trial of retroviral vector-mediated interferon (IFN)-gamma gene transfer into autologous tumor cells in patients with metastatic melanoma
Cancer Gene Ther. 5 (1998), 292-300
- [252] Nemunaitis, J.; Fong, T.; Robbins, J.M.; Edelman, G.; Edwards, W.; Paulson, R.S.; Bruce, J.; Ognoskie, N.; Wynne, D.; Pike, M.; Kowal, K.; Merritt, J.; Ando, D.
Phase I trial of interferon-gamma (IFN-gamma) retroviral vector administered intratumorally to patients with metastatic melanoma
Cancer Gene Ther. 6 (1999), 322-330
- [253] Kang, W.K.; Park, C.; Yoon, H.L.; Kim, W.S.; Yoon, S.S.; Lee, M.H.; Park, K.; Kim, K.; Jeong, H.S.; Kim, J.A.; Nam, S.J.; Yang, J.H.; Son, Y.I.; Baek, C.H.; Han, J.; Ree, H.J.; Lee, E.S.; Kim, S.H.; Kim, D.W.; Ahn, Y.C.; Huh, S.J.; Choe, Y.H.; Lee, J.H.; Park, M.H.; Kong, G.S.; Park, E.Y.; Kang, Y.K.; Bang, Y.J.; Paik, N.S.; Lee, S.N.; Kim, S.H.; Kim, S.; Robbins, P.D.; Tahara, H.; Lotze, M.T.; Park, C.H.
Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study
Hum. Gene Ther. 12 (2001), 671-684
- [254] Tahara, T.; Zitvogel, L.; Storkus, W.J.; Robbins, P.D.; Lotze, M.T.
Murine models of cancer cytokine gene therapy using interleukin-12
Ann. N. Y. Acad. Sci. 795 (1996), 275-283
- [255] Sumimoto, H.; Tani, K.; Nakazaki, Y.; Tanabe, T.; Hibino, H.; Wu, M.S.; Izawa, K.; Hamada, H.; Asano, S.
Superiority of interleukin-12-transduced murine lung cancer cells to GM-CSF or B7-1 (CD80) transfectants for therapeutic antitumor immunity in syngeneic immunocompetent mice
Cancer Gene Ther. 5 (1998), 29-37
- [256] Nandakumar, K.S.; Lakshmi Rao, K.; Pardhasaradhi, B.V.; Khar, A.
Upregulation of antitumor immunity by IL-12 gene-transfected AK-5 tumor cells *in vivo*
Cytokines Cell. Mol. Ther. 5 (1999), 7-14
- [257] Finn, O.J.
Tumor-rejection antigens recognized by T lymphocytes
Curr. Opin. Immunol. 5 (1993), 701-708
- [258] Boon, T.; Cerottini, J.C.; Van den Eynde, B.; van der Bruggen, P.; Van Pel, A.

- Tumor antigens recognized by T lymphocytes
Annu. Rev. Immunol. 12 (1994), 337-365
- [259] Mazzolini, G.; Qian, C.; Narvaiza, I.; Barajas, M.; Borrás-Cuesta, F.; Xie, X.; Duarte, M.; Melero, I.; Prieto, J.
Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level
Hum. Gene Ther. 11 (2000), 113-125
- [260] Coughlin, C.M.; Wsocka, M.; Kurzawa, H.L.; Lee, W.M.; Trinchieri, G.; Eck, S.L.
B7-1 and interleukin 12 synergistically induce effective antitumor immunity
Cancer Res. 55 (1995), 4980-4987
- [261] Kos, F.J.; Engleman, E.G.
Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs
Immunol. Today 17 (1996), 174-176
- [262] Seliger, B.; Maeurer, M.J.; Ferrone, S.
TAP off-tumors on
Immunol. Today 18 (1997), 292-299
- [263] Cayeux, S.; Richter, G.; Becker, C.; Beck, C.; Aicher, A.; Pezzutto, A.; Dorken, B.; Blankenstein, T.
Lack of correlation between rejection of tumor cells co-expressing interleukin-2 and B7.1 and vaccine efficiency
Eur. J. Immunol. 27 (1997), 1657-1662
- [264] Alimonti, J.; Zhang, Q.J.; Gabathuler, R.; Reid, G.; Chen, S.S.; Jefferies, W.A.
TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells *in vivo*
Nat. Biotechnol. 18 (2000), 515-520
- [265] Buendia, M.A.
Mammalian hepatitis B viruses and primary liver cancer
Semin. Cancer Biol. 3 (1992), 309-320
- [266] Addison, C.L.; Bramson, J.L.; Hitt, M.M.; Muller, W.J.; Gauldie, J.; Graham, F.L.
Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors
Gene Ther. 5 (1998), 1400-1409
- [267] Drozdziak, M.; Qian, C.; Xie, X.; Peng, D.; Bilbao, R.; Mazzolini, G.; Prieto, J.
Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma
J. Hepatol. 32 (2000), 279-286
- [268] Noguchi, Y.; Richards, E.C.; Chen, Y.T.; Old, L.J.
Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 2219-2223
- [269] Michalak, T.I.; Hodgson, P.D.; Churchill, N.D.
Posttranscriptional inhibition of class I major histocompatibility complex presentation on hepatocytes and lymphoid cells in chronic woodchuck hepatitis virus infection
J. Virol. 74 (2000), 4483-4494
- [270] Roggendorf, M.
unveröffentlichte Daten
- [271] Fruh, K.; Yang, Y.
Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma
Curr. Opin. Immunol. 11 (1999), 76-81

- [272] Culver, K.W.; Ram, Z.; Wallbridge, S.; Ishii, H.; Oldfield, E.H.; Blaese, R.M.
In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors
Science 256 (1992), 1550-1552
- [273] Freeman, S.M.; Abboud, C.N.; Whartenby, K.A.; Packman, C.H.; Koeplin, D.S.; Moolten, F.L.; Abraham, G.N.
The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified
Cancer Res. 53 (1993), 5274-5283
- [274] Dilber, M.S.; Abedi, M.R.; Christensson, B.; Bjorkstrand, B.; Kidder, G.M.; Naus, C.C.; Gahrton, G.; Smith, C.I.
Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo
Cancer Res. 57 (1997), 1523-1528
- [275] Nishizaki, M.; Fujiwara, T.; Tanida, T.; Hizuta, A.; Nishimori, H.; Tokino, T.; Nakamura, Y.; Bouvet, M.; Roth, J.A.; Tanaka, N.
Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect
Clin. Cancer Res. 5 (1999), 1015-1023

Danksagung

Herrn Prof. Esche danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können, sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr.Dr. Pützer möchte ich dafür danken, dass sie mir das interessante Thema überlassen hat, immer am Fortgang meines Projektes interessiert war und es mit ihrem fachkundigen Rat in die richtige Richtung gelenkt hat. Auch Dr. Thorsten Stiewe bin ich für viele wichtige Hinweise und Anregungen sehr dankbar.

Bei unseren TA's Gabi Hessler, Carmen Theseling, Sonja Zimmermann, Achim Sternberg, Melanie Kroll und Bärbel Pollmeier möchte ich mich sehr herzlich für ihre Unterstützung bedanken, wobei ein besonderer Dank an Melanie Kroll, Gabi Hessler und Carmen Theseling geht, die mich, wenn es nötig war, immer unterstützt haben und für die gute Laune zuständig waren.

Ein grosses Dankeschön geht an die ganze Arbeitsgruppe. Dabei möchte ich mich nicht nur bei den gegenwärtigen Kollegen Miriam Böckmann, Matthias Drosten, Jens Stanelle und Sebastian Tuve, sondern auch bei den "Ehemaligen" Susanne Rega, Felipe Crespo, Michael Lowak, Andreas Tullipan und DaeIn Chang für die gute Stimmung in Raum 37, die moralische Unterstützung und die anregenden Gespräche bedanken.

Silvia Davies danke ich für die Unterstützung in allen administrativen Bereichen. Bei Klaus Lennartz möchte ich mich für die große Hilfe bei den FACS-Analysen und die interessanten Gespräche bedanken.

Der benachbarten Arbeitsgruppe des IMB und besonders unseren Gangnachbarn, der AG III des Instituts für Zellbiologie, gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit.

Mein letzter, aber dafür wichtigster und herzlichster Dank, gehört Simone Menges, meinen Freunden, meinen Eltern, Frau Mechthild Rödicke und Herr Joachim Rödicke, und meinem Bruder, Jens Rödicke und Familie, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation immer unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit sind in die folgenden Publikationen eingegangen:

- 1.) **BM Pützer, T Stiewe, F Rödicker, O Schildgen, S Rühm, O Dirsch, M Fiedler, U Damen, B Tennant, C Scherer, FL Graham, M Roggendorf (2001):** Large nontransplanted hepatocellular carcinoma in woodchucks: Treatment with adenovirus-mediated delivery of interleukin-12/B7.1 genes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 472-479.
- 2.) **F Rödicker, T Stiewe, S Zimmermann, BM Pützer (2001):** Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction. *Cancer Res.*, 61: 7052-7055.
- 3.) **BM Pützer, F Rödicker, MM Hitt, T Stiewe, H Esche (2002):** Improved Treatment of Pancreatic Cancer by IL-12 and B7.1 Costimulation: Antitumor Efficacy and Immunoregulation in a Nonimmunogenic Tumor Model. *Mol. Ther.*, 5: 405-412

Lebenslauf

Persönliche Daten: Name: Florian Rödicker
Geburtstag/-ort: 21. September 1970 in Wolfenbüttel
Familienstand: ledig
Adresse: Goerdtsstraße 32, 44803 Bochum
Telefon: 0234/9789221

Schulbildung: 08.77 - 07.80 Grundschule Ölper in Braunschweig
08.80 - 07.81 Grundschule Diesterwegstraße in Braunschweig
08.81 - 07.83 Orientierungsstufe Diesterwegstraße in Braunschweig
08.83 - 05.90 Gymnasium Martino-Katharineum in Braunschweig
Abschluß: Abitur (Note 2,4)

Bundeswehr: 07.90 - 06.91 Grundwehrdienst

Studium: 10.91 - 02.99 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum (RUB)
Vertiefungsfach: Biochemie
05.98 - 02.99 Diplomarbeit: "Untersuchungen zur *in vitro* Transkription eines *S. pombe* 7SL-RNA-Gens" am Institut für Biochemie der RUB
Abschluß: Diplom-Chemiker; Abschlußtermin: Februar 1999
Diplomnote: "gut"

Berufserfahrung: 03.99-05.99 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum

Promotion: seit 06.99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie des Uniklinikums Essen in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. B.M. Pützer

Essen, den 25.09.02 Florian Rödicker

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Gentherapie beim Pankreaskarzinom durch adenoviralen Transfer apoptose-induzierender und immunmodulierender Gene" zugeordnet ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Florian Rödicker befürworte.

Essen, den 25.09.02

Prof. Dr. H. Esche

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 25.09.02

Florian Rödicker

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 25.09.02

Florian Rödicker