

Aus der Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock:

**Virale und gentherapeutische Ansätze zur Chemosensibilisierung und Immunpotenzierung des experimentellen Pankreaskarzinoms**

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae habilitatus (Dr. med. habil.)**

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

**Dr. med. Sven Eisold, geboren am 11.04.1965 in Großröhsdorf aus Rostock**

Rostock, am 17. Juli 2007

*Diese Arbeit ist meinem väterlichen Freund Herrn Alfred Warner gewidmet, der das Tor zur Medizin für mich weit öffnete, stets an mich glaubte, mir wohlwollend mit seiner Erfahrung bei allen wichtigen Entscheidungen zur Seite stand und ohne den das bisher Erreichte nicht möglich gewesen wäre.*

# **I. Allgemeine Angaben**

## **1. Antragsteller:**

Eisold, Sven, Dr. med., geboren 11.04.1965, aus Großröhrsdorf

## **2. Projekttitlel**

Virale und gentherapeutische Ansätze zur Chemosensibilisierung und Immunpotenzierung des experimentellen Pankreaskarzinoms

## **3. Institution**

Klinik und Poliklinik für Chirurgie  
Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantations-  
Chirurgie, Universität Rostock, Medizinische Fakultät  
Schillingallee 35  
D-18055 Rostock

Telefon: 0381-494-6228

Fax: 0381-494 -6002

E-Mail-Adresse: [sven.eisold@med.uni-rostock.de](mailto:sven.eisold@med.uni-rostock.de)

## **4. Privatanschrift**

Graureiherweg 3  
D-18059 Rostock

Telefon: 0381/ 440 30 35

E-Mail-Adresse: [sven1104@yahoo.de](mailto:sven1104@yahoo.de)

## II. Inhaltsverzeichnis

<b>I. ALLGEMEINE ANGABEN.....</b>	<b>3</b>
1. Antragsteller:.....	3
2. Projekttitle .....	3
3. Institution.....	3
4. Privatanschrift.....	3
<b>II. INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>III. ANGABEN ZUM FORSCHUNGSTHEMA .....</b>	<b>6</b>
1. Zusammenfassung .....	6
2. Überblick der Publikationen zum Thema des Antragstellers.....	8
3. Einleitung.....	12
3.1 Pankreaskarzinom .....	12
3.2 Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2) .....	16
3.3 Adenovirale Gentherapie .....	18
3.4 Immuntherapie.....	21
4. Methodischer Überblick .....	25
4.1 Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2) .....	25
4.2 Adenovirale Vektorsysteme.....	26
4.3 Tiermodell.....	28
5. Ziele der Arbeit.....	29

<b>6. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
6.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen und Reduktion chemotherapie- assoziiierter Nebenwirkungen .....	31
6.2 Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch AAV-2 in einem syngenem Rattenmodell des Pankreaskarzinoms .....	33
6.3 Die adenovirale p53 vermittelte 5FU-Chemosensibilierung ist abhängig vom p53 Status der Pankreaskarzinomzellen.....	35
6.4 Adenoviraler Cytosine Deaminase (CD) Pro-Drug Gentransfer ist ineffizient zur Auslösung einer signifikanten antitumoralen Immunantwort.....	37
<b>7. Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
7.1 Steigerung der lokalen Wirksamkeit zytotoxischer Substanzen und Reduktion der therapie-assoziierten Nebenwirkungen.....	40
7.2 Aktivierung des Immunsystems und Steigerung der Tumorimmunogenität.....	49
<b>8. Verzeichnis der zitierten Literatur</b> .....	<b>60</b>
<b>IV. ANLAGEN</b> .....	<b>68</b>
<b>1. Publikationen, Vorträge und Preise des Antragstellers</b> .....	<b>68</b>
1.1 Originalpublikationen .....	68
1.2 Buchbeiträge .....	70
1.3 Patentschrift .....	71
1.4 Vorträge .....	71
1.5 Poster .....	72
1.6 Preise und Auszeichnungen.....	74
<b>2. Tabellarischer Lebenslauf</b> .....	<b>75</b>
<b>3. Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>77</b>
<b>4. Sonderdrucke der Publikationen zum Thema</b> .....	<b>78</b>

### **III. Angaben zum Forschungsthema**

#### **1. Zusammenfassung**

Das Pankreaskarzinom ist nach wie vor durch eine außerordentlich schlechte Prognose gekennzeichnet. Neben der chirurgischen Therapie zeigen die onkologischen Standardtherapieverfahren, Chemo- und Strahlentherapie, trotz aller bisherigen Fortschritte ein limitiertes therapeutisches Potenzial. Daher wird aktuell nach neuen Behandlungsmethoden gesucht, die eine für Tumorzellen selektive und hohe antitumorale Wirkung aufweisen, aber andere Körperzellen, die nicht entartet sind, nicht beeinträchtigen. Besonders interessant sind immun- und gentherapeutische Ansätze, die zukünftig neue Behandlungsoptionen ermöglichen sollten und Chancen für betroffene Tumorpatienten erhöhen könnten. Die chirurgische Therapie des Pankreaskarzinoms hat insbesondere durch den Zentrumseffekt zu einer Zunahme der Resektabilitätsrate und Abnahme der Morbidität und Mortalität geführt und ist die einzig potenziell kurative Behandlungsoption. Allerdings ist aufgrund der aggressiven regionalen Tumorzell dissemination und frühen lymphogenen Metastasierung in der Mehrzahl der Resektionen auch beim lokalisierten Pankreaskarzinom nach neueren Studien eine R1-Situation festzustellen. Daher ist eine Verbesserung der Prognose nur durch multimodale Therapiekonzepte zu erreichen. Neben der adjuvanten systemischen Chemotherapie oder Radiochemotherapie sind Kombinationen mit innovativen immun- oder gentherapeutischen Therapieformen nach unseren Überlegungen sinnvoll und möglich.

Die vorliegende Arbeit gibt eine Zusammenfassung publizierter Ergebnisse zu den verschiedenen Aspekten dieser innovativen Therapiemethoden beim experimentellen Pankreaskarzinom in einem immunkompetenten Tiermodell. Ziel des Projektes war es erstens Strategien zur Steigerung der antineoplastischen Wirkung genotoxischer Therapien bei gleichzeitiger Verminderung der therapie-assoziierten systemischen Nebenwirkungen zu entwickeln, und zweitens immunologisch basierte Therapieansätze zur Aktivierung des

Immunsystems und Steigerung der Tumorummunogenität zu untersuchen. Hierzu wurden nicht humanpathogene Parvoviren, die Adeno-assoziierten Viren Typ 2 (AAV-2) und replikationsdefiziente adenovirale Vektorsysteme, Adp53 und AdCD, *in vitro* und *in vivo* verwendet und die Auswirkungen auf das Tumorstadiumsverhalten experimentell analysiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit AAV-2 weisen signifikant deren chemosensibilisierenden Effekt nach und erweitern bisherige Erkenntnisse zur antineoplastischen Wirkung von AAV-2 auf Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* AAV-2- Infektion nicht nur zu einer Steigerung der Therapieeffizienz führt, sondern gleichzeitig zu einer Verminderung der chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen und so behandelte Tiere einen signifikanten Überlebensvorteil aufweisen. In einer weiteren Versuchsserie konnte erstmals, im Sinne einer Kombination von Chirurgie und Immuntherapie, eine durch AAV-2 induzierte, antitumorale Immunantwort generiert werden, die zu einer nahezu kompletten Tumorstadiumprotektion in dem verwendeten syngenen Pankreaskarzinommodell führt.

Die dargestellten gentherapeutischen Experimente zur Modifikation von Tumorzellen zeigen, dass durch die transiente Expression von Wildtyp p53 (Adp53) eine signifikante Steigerung der antiproliferativen Wirkung von 5-Fluorouracil (5FU) *in vitro* und *in vivo* erreicht werden kann. Gleichzeitig dokumentieren diese aber auch die Notwendigkeit der exakten molekularen Tumoranalyse, wie beispielsweise des p53 Status von Pankreaskarzinomzellen, zur Abschätzung des Therapieerfolges der verwendeten Chemotherapeutika. Die Analysen zum gezielten *in vitro* und *in vivo* Gentransfer mit dem Suizidgen Cytosin Deaminase (AdCD) zeigen die Limitationen für den Erfolg einer solchen gentherapeutischen Behandlung und unterstreichen die Bedeutung spezifischer Tiermodelle, die die Situation beim Menschen besser widerspiegeln, um neue Therapieoptionen zu definieren und den Erfolg experimenteller Therapieansätze beurteilen zu können.

## **2. Überblick der Publikationen zum Thema des Antragstellers**

### ***Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen und Reduktion chemotherapie-assoziiierter Nebenwirkungen***

#### Publikation

1. **Eisold S**, Dihlmann S, Linnebacher M, Ryschich E, Aulmann, M., Schmidt J, Schlehofer J R, Ridder R, and von Knebel Doeberitz M. Prevention of chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2. **Int J Cancer 2002**, 100: 606-614.

#### Assoziierte Publikationen

2. Schwarzbach MH, **Eisold S**, Burguete T, Willeke F, Klein-Bauernschmitt P, Schlehofer JR, Herfarth C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Sensitization of sarcoma cells to doxorubicin treatment by concomitant wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV-2) infection. **Int J Oncol 2002** Jun;20(6):1211-8.
3. zur Hausen H, Schlehofer J, Klein-Bauernschmitt P, **Eisold S**, von Knebel Doeberitz M. Verwendung adenoassoziierter Viren zur Senkung der Radio- oder Chemotherapie- reduzierten Resistenz bei Krebspatienten. **Erfindungsmeldung 2000**, P1050; Oktober



***Induktion einer systemischen antitumoralen Immunantwort durch AAV-2 in einem syngenem Rattenmodell des Pankreaskarzinoms***

Publikation

4. **Eisold S**, Schmidt J, Ryschich E, Gock M, Klar E, von Knebel Doeberitz M, Linnebacher M. Induction of an antitumoral immune response by wild-type Adeno-Associated Virus type 2 (AAV-2) in an *in vivo* model of pancreatic carcinoma. **Pancreas** 2007 Jul;35(1):63-72

Assoziierte Publikationen

5. Schmidt E, Maerten A, Linnebacher M, Ryschich, Wentzensen N, **Eisold S**, Büchler MW, Schmidt J. Activating anti-CD40-antibodies induce tumor invasion of cytotoxic T-lymphocytes and inhibition of tumor growth in experimental liver cancer. Activating anti-CD40 antibodies induce tumour invasion by cytotoxic T-lymphocytes and inhibition of tumour growth in experimental liver cancer. **Eur J Cancer** 2006 May;42(7):981-7
6. Schmidt J, **Eisold S**, Buchler MW, Marten A. Dendritic cells reduce number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma. **Cancer Immunol Immunother** 2004 Nov;53(11):1018-26.
7. Ryschich E, Autschbach F, **Eisold S**, Klar E, Buchler MW, Schmidt J. Expression of HLA class I/II antigens and T cell immune response in human neuroendocrine tumors of the pancreas. **Tissue Antigens** 2003 Jul;62(1):48-54.

***Die adenovirale p53 vermittelte 5FU-Chemosensibilierung ist abhängig vom p53 Status der Pankreaskarzinomzellen***

Publikation

8. **Eisold S**, Linnebacher M, Ryschich E, Antolovic D, Hinz, U, Klar E, Schmidt J. The effect of adenovirus expressing wild-type p53 on 5-fluorouracil chemosensitivity is related to p53 status in pancreatic cancer cell lines. **World J Gastroenterol 2004**;10: 3583-89.

Assoziierte Publikationen

9. **Eisold S**, Ryschich E, Linnebacher M, Giese T, Nauheimer D, Wild A, Bartsch DK, Buchler MW, Schmidt J. Characterization of FAMPAC, a newly identified human pancreatic carcinoma cell line with a hereditary background. **Cancer 2004**; 100: 1978-86.
10. Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, Heise JW, Schulte KM, Colombo-Benkman M, Schleicher C, Witzigmann H, Pridohl O, Ghadimi MB, Horstmann O, von Bernstorff W, Jochimsen L, Schmidt J, **Eisold S**, Estevez-Schwarz L, Hahn SA, Schulmann K, Bock W, Gress TM, Zigel N, Breitschaft K, Prenzel K, Messmann H, Endlicher E, Schneider M, Ziegler A, Schmiegel W, Schafer H, Rothmund M, Rieder H. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. **Int J Cancer 2004**; Jul 20;110(6):902-6.

***Adenoviraler Cytosine Deaminase (CD) Pro-Drug Gentransfer induziert keinen therapeutisch relevanten immunologischen Bystander***

Publikation

11. **Eisold S**, Antolovic D, Schmidt J, Wießner R, Klar E, von Knebel-Doeberitz M, Linnebacher M. Effective antitumoral immune responses are not induced by Cytosine Deaminase Suicide Gene transfer in a syngeneic rat pancreatic cancer model. **Eur Surg Res.** **2006** Oct;38(6):513-521

Assoziierte Publikationen

12. Haack K, Linnebacher M, **Eisold S**, Zoller M, von Knebel-Doeberitz, M, Gebert J. Induction of protective immunity against syngeneic rat cancer cells by expression of the cytosine deaminase suicide gene. **Cancer Gene Ther.** **2000** Oct;7(10): 1357-1364,

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Pankreaskarzinom**

Das Pankreaskarzinom besitzt mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 4-6 Monaten die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumoren. Weniger als 5% der Patienten leben länger als 5 Jahre. Nach vorliegenden Schätzungen (DKFZ Heidelberg) erkrankten in Deutschland 2002 etwa 12.800 Menschen an einem Krebs der Bauchspeicheldrüse. Das entspricht einem Anteil von 6% aller Krebserkrankungen. Männer (6.100) sind davon fast so häufig betroffen wie Frauen (6.700). Damit nimmt dieser Krebs bei Männern den 9. Platz und bei Frauen den 7. Platz in der Statistik der häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland ein. Als Todesursache rangiert das Pankreaskarzinom mit etwa 12.100 Verstorbenen im Jahr 2002 bereits an 5. Stelle aller Krebstodesfälle. Die meisten Betroffenen erkranken im höheren Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 und für Frauen bei 75 Jahren.

Pankreaskarzinome zeigen eine ausgeprägte Tendenz zur Metastasierung ohne Korrelation zur Größe des Primärtumors. Zum Diagnosezeitpunkt befindet sich die Mehrzahl der Patienten in einem lokal fortgeschrittenen Stadium, während nur 10 bis 20% der Patienten nach radiologischen Kriterien primär operabel sind. Aber selbst bei diesen Patienten zeigt die pathologische Aufarbeitung in 25 bis 60% positive Resektionsränder und auch in spezialisierten Zentren wird eine peripankreatische Weichteilinfiltration bei 38% gesehen (Beger et al., 2003; Klempa, 2004). Dies erklärt die kurze Zeitsequenz des Auftretens eines Rezidivs, in der ein lokaler Rückfall meist der Lebermetastasierung vorangeht. Die kurze Zeit von acht bis neun Monaten bis zum Rezidiv und die selbst in lokalisierten Stadien in >50% vorhandene Mikrometastasierung in das Knochenmark und in 10% erst intraoperativ gesehene hepatische Frühmetastasierung machen deutlich, dass die Erkrankung als primäre Systemerkrankung aufgefasst werden muss, und lokale Therapiemaßnahmen von eingeschränktem Nutzen sein müssen.

Dennoch ist die chirurgische Therapie des Pankreaskarzinoms die derzeit einzige potenziell kurative Option und hat vor allem durch den Zentrumseffekt («case load») zu einer Zunahme der Resektabilitätsrate und Abnahme der Morbidität und Mortalität geführt. Zentren mit hohem «case load» weisen eine Krankenhausmortalität von deutlich unter 5% auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei potenziell kurativ resezierten Patienten konnte auf 15–30% gesteigert werden (Schmied et al., 2004).

Die wichtigsten Entwicklungen der letzten 10 Jahre wurden im Bereich der Pankreastumorbiologie und Entwicklung neuer multimodaler Therapiekonzepte erzielt. So konnten neben den bereits bekannten Genen K-ras und p53 weitere Gene (p16, DPC4, BRCA2) der Pankreastumorgenese zugeordnet werden (Hahn et al., 1997). Basierend auf der molekularen Charakterisierung von Pankreaskarzinomen wurde eine Vielzahl neuerer Substanzklassen entwickelt und gezielt für spezielle Patientengruppen unter Einschluss prognostischer und prädiktiver Faktoren eingesetzt. Neuere Substanzen, wie z.B. Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren (Marimastat, BAY 12-9566), Farnesyltransferase-Inhibitoren (Tipifarnib, Lonafarnib), Inhibitoren der Epidermal-Growth-Factor-Familie (Cetuximab, Gefitinib, Erlotinib, Trastuzumab) und Inhibitoren des Vascular Endothelial Growth Factor und seinen Varianten (Bevacizumab) wurden bereits in Phase II und -III Studien getestet und zeigten unterschiedliche, zum Teil viel versprechende Resultate (Wilkowski et al., 2003). So sind Phase-II-Studien mit gezielter Therapie auf EGFR- und VEGF-Basis sehr ermutigend. Im Gegensatz dazu sind die bisherigen Studienergebnisse mit den Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren und der Farnesyltransferase-Inhibitoren eher enttäuschend (Wiedmann et al., 2005). Ursache dafür sind u. a. die Heterogenität solider Pankreastumoren und die damit verbundene Abhängigkeit von verschiedenen Signalwegen. Erschwerend für den erfolgreichen Einsatz dieser neuen Substanzen kommt hinzu, dass diese meist bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien verwendet werden.

Weitere Fortschritte in der Therapie des Pankreaskarzinoms konnten insbesondere durch den Einsatz optimierter systemischer Chemotherapien und multimodaler Therapiekonzepte erreicht werden. So wurden zahlreiche Behandlungskonzepte für unterschiedliche Behandlungsmodalitäten - neoadjuvant, adjuvant, additiv, palliativ - entwickelt. Bis zum Ende der 90ziger Jahre kam insbesondere 5-Fluorouracil (5FU) zum Einsatz mit Ansprechraten von 5 bis maximal 25%. Besonders die ESPAC-1 Studie konnte einen signifikanten Überlebensvorteil der adjuvanten Chemotherapie mit 5FU für Patienten mit operablem Pankreaskarzinom nachweisen (Neoptolemus et al., 2003). Fortschritte konnten durch das Deoxycytidinanalog Gemcitabin erreicht werden, das im Vergleich zu 5FU einen signifikant erhöhten klinischen Nutzen (20-30%) mit einem verbesserten medianen Überleben für Pankreaskarzinompatienten nachweisen konnte. Allerdings ist ein objektives Ansprechen mit einer partiellen Remissionsrate im Bereich von 5,4 bis 11,4% als allenfalls moderat zu bezeichnen (Heinemann, 2002). Mit Spannung werden daher die Daten zur ESPAC-3 Studie erwartet. Zur Verbesserung der Ansprechraten werden weiterhin unterschiedliche Kombinationsstudien mit zwei oder mehreren zytotoxischen Substanzen durchgeführt. (Hiddemann et al., 2005). Die neoadjuvante Radiochemotherapie beim Pankreaskarzinom ist bisher nicht standardisiert. Bisherige Ergebnisse zeigten, dass bei Patienten mit resezierbarem Pankreaskarzinom eine Verlängerung des Überlebens mit medianen Überlebenszeiten zwischen 15 und 30 Monaten erreicht werden kann. Allen diesen Studien gemein ist aber die Limitierung für den Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie mit oft zu starken zytotoxischen Nebenwirkungen auf gesunde Körperzellen, die die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigen. Über 80% der Patienten sind zwischen 60 und 80 Jahre alt, 10 bis 20% leiden an Diabetes, 60 bis 80% an Gewichtsverlust und eingeschränktem Karnovsky-Score, und 60 bis 70% an obstruktivem Ikterus. Diese alters- und krankheitsspezifischen Komorbiditäten schränken nicht nur die Zahl der für adjuvante Therapien in Frage kommenden Patienten ein, sie bedeuten gemeinsam mit dem ausgeprägten intrinsischen Immundefekt auch eine relevante

Einschränkung der in Frage kommenden Therapiemodalitäten. Es wird daher nach neuen Behandlungsformen gesucht, die eine für Tumorzellen selektive und hohe antitumorale Wirkung aufweisen, aber andere Körperzellen, die nicht entartet sind, nicht beeinträchtigen. Neue Behandlungsmöglichkeiten des Pankreaskarzinoms bieten hierzu vor allem Strategien zur Chemo- und Radiosensibilisierung von Tumorzellen sowie gen- und immuntherapeutische Ansätze.

Die vorliegende Arbeit hat sich daher zunächst mit der Frage beschäftigt wie Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* gegenüber Chemotherapeutika, hier am Beispiel des 5-Fluorouracils, empfindlicher gemacht werden können. Zytostatika können einen Wachstumsstopp oder den Zelltod von Tumorzellen auslösen und somit das Tumorstadium hemmen oder gar verhindern. Leider gelingt es Krebszellen sehr häufig der zellzerstörenden Wirkung von Zytostatika zu entkommen. Sie werden „resistent“, das heißt das gegen die Krebserkrankung eingesetzte Medikament büsst seine Wirkung ein. Die therapeutische Effektivität zytotoxischer Pharmaka wird darüber hinaus durch die ansteigende Resistenz humaner Tumorzellen gegenüber denjenigen Dosisgrößen des Chemotherapeutikums, die zur Therapie des Krebspatienten eingesetzt werden können, limitiert. Dosis-Eskalierungsstudien haben für eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorarten gezeigt, dass die therapeutische Effektivität zytotoxischer Agenzien durch Steigerung der Dosis signifikant erhöht werden könnte. Der Einsatz höherer Chemotherapeutika-Dosen ist jedoch in der Regel aufgrund ernsthafter toxischer Nebeneffekte des Therapeutikums nicht möglich. Um derartige Chemoresistenzmechanismen zu durchbrechen und die Wirksamkeit von 5-Fluorouracil zu steigern, wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Therapieansätze experimentell untersucht. Gemeinsam ist allen Ansätzen, dass es sich um virale Behandlungsstrategien handelt, ob als Infektion mit Adeno-assoziierten Viren Typ 2 (AAV-2) zur Chemosensibilisierung oder der Applikation von replikationsdefizienten adenoviralen Vektorsystemen zum p53 Gentransfer mit nachfolgender Chemotherapie bzw. Cytosin Deaminase Pro-Drug Gentransfer.

### 3.2 Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2)

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind kleine, einzelsträngige DNA-Viren (Parvoviren), die früh in der Kindheit die Mehrzahl der Bevölkerung infizieren, und für die bislang keine pathogenen Auswirkungen auf den Menschen bekannt sind. Sie können nur dann replizieren und einen produktiven Infektionszyklus einleiten, wenn die Zellen zugleich mit einem Helfervirus (z.B. Adeno, Vaccina oder Herpesvirus) infiziert sind. Alternativ können AAV eine latente Form der Infektion etablieren und in das Wirtszellgenom integrieren (Samulski et al., 1991, Kotin et al., 1992). Ferner führt eine AAV-Infektion nicht zur Ausbildung einer neutralisierenden Immunantwort, so dass Reinfektionen offenbar jederzeit vorkommen können. Seroepidemiologische Daten zeigen, dass die Inzidenz von Tumorerkrankungen bei Patienten mit Antikörpern gegen AAV seltener vorkommen als bei Patienten, die keine Antikörper gegen das AAV aufweisen (Georg-Fries et al., 1984). Die krebshemmenden Eigenschaften von Parvoviren wurden erstmals 1967 von Helen Toolan vom Institut für Medizinische Forschung am Putnam-Meorial-Hospital in Bennington (Vermont) beschrieben und in nachfolgenden Untersuchungen mit verschiedenen Vertretern der Familie der Parvoviridae bestätigt. Adeno-assoziierte Viren weisen verschiedene tumorsuppressive Eigenschaften auf und es wurde eine Vielzahl von möglichen Mechanismen diskutiert (Schlehofer, 1994; Rommelaere et al., 1991; zur Hausen, 1994). Dazu zählen u. a. die Hemmung der Amplifikation viraler DNA-Sequenzen in transformierten Zellen, die Induktion von Differenzierungsvorgängen in Tumorzellen, die Beeinflussung des Zellzyklus mit einer verminderten Zellzahl in der S-Phase und gesteigerter Anzahl von Zellen in der G1-Phase, die Modulation von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, z.B. p21/WAF1 sowie die Hemmung der Transkription der humanen Protoonkogene *c-fos* und *c-myc* (Schlehofer 1997).



Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Jörg Schlehofer vom DKFZ in Heidelberg konnten zeigen, dass AAV-2 das Wachstum von Tumorzellen reduzieren und diese gleichzeitig für Strahlen- oder Chemotherapie empfindlicher machen können. So führte die Infektion von Gewebekulturzellen mit AAV-2 zu einer Erhöhung der Sensitivität der Zellen gegenüber UV- oder Gamma-Strahlen bzw. chemischen Substanzen (z.B. MNNG, DMBA) (Walz et al., 1992). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Infektion mit AAV-2 die antitumorale Effektivität verschiedener Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin, BCNU) in Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* signifikant steigern kann. *In vitro* führte die AAV-2 Infektion zu einer gesteigerten Wirkung des verwendeten Chemotherapeutikums und *in vivo* wurde ein geringeres Tumorstadium in AAV-2 infizierten Tieren beobachtet. Der sensibilisierende Effekt von AAV-2 war dabei nicht auf bestimmte Chemotherapeutika oder Tumortypen beschränkt (Klein-Bauernschmitt et al., 1992; 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine AAV-2-Infektion zu einer teilweisen Aufhebung vorhandener Resistenzen gegenüber einem Zytostatikum führte und somit resistente Tumorzellen einer erneuten chemotherapeutischen Behandlung wieder zugänglich gemacht werden konnten (Hillgenberg et al., 1999). Basierend auf den vielfältigen tumorhemmenden Eigenschaften von Adeno-assoziierten Viren (AAV-2) war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit den chemosensibilisierenden Effekt von AAV-2 zu untersuchen und Auswirkungen auf die Effizienz und Verträglichkeit einer 5FU- Chemotherapie in einem syngenem Pankreaskarzinommodell der Ratte zu analysieren.

### 3.3 Adenovirale Gentherapie

Einen viel versprechenden Ansatz in der Krebstherapie bieten neue gentherapeutische Strategien, die unter anderem darauf zielen Krebsmutationen zu korrigieren oder zu kompensieren, beziehungsweise Prozesse zu aktivieren, die solche Defekte normalerweise beheben können. Eine weitere Strategie besteht darin, in die entarteten Zellen Gene für toxische Moleküle einzuschmuggeln. Wird dann ein solches Gen exprimiert und das zugehörige Protein hergestellt geht die Zelle zugrunde (Förstermann et al., 2003; Daniel et al., 2004). Um eine Steigerung der Effizienz von Chemotherapeutika und eine Erhöhung ihrer lokalen Zytotoxizität zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Wege untersucht. Zum einen erfolgte via adenoviraler Vektoren die Einführung des Tumorsuppressorgens p53 in Kombination mit der Behandlung mit 5-Fluorouracil und zum anderen die Einschleusung des Selbstmordgens Cytosin Deaminase als so genannte „molekulare Chemotherapie“.

Die Reinstallierung von Wildtyp p53 in mutierten oder p53 negativen Tumorzellen bietet theoretisch einen attraktiven gentherapeutischen Ansatz in der Onkologie. Das Tumorsuppressorgen p53 ist das Gen, das bisher am häufigsten in humanen Tumoren mutiert nachgewiesen wurde. Eine Sequenzanalyse von p53 in Pankreaskarzinomen konnte zeigen, dass die überwiegende Anzahl der Karzinome mutiert sind (Sirivatanauskorn et al., 1998). Die Hauptfunktion von p53 wird darin gesehen, nach verschiedenen Schädigungen der DNA einen Wachstumsstopp der Zellen oder den programmierten Zelltod zu induzieren, um die Ausbreitung von Mutationen zu verhindern («guardian of the genome»). In den letzten Jahren ist im Rahmen von Studien mit mehr als 100 Zelllinien gezeigt worden, dass die Wiedereinführung des in Tumorzellen mutierten oder deletierten p53 Gens durch den Transfer des Wildtyp (wt) p53 zu einem funktionellen p53 Protein führt (Wills et al., 1994; Harris et al., 1996). Für die Mehrzahl der entweder für das p53-Tumorsuppressorgen mutierten oder deletierten neoplastischen Zellen konnte durch die transiente Expression des wtp53 der Zelltod ausgelöst

werden. Allerdings konnte für einige wenige dieser Tumorzellen lediglich ein Wachstumsstopp beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren neoplastische Zellen mit wtp53 und normale Zellen unbeeinflusst von dem adenoviralen p53-Gentransfer. Der erfolgreiche p53-Gentransfer via adenoviraler Vektoren konnte ebenso in verschiedenen xenogenen Tumormodellen gezeigt werden. Dabei konnte eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums bis hin zur Tumorregression dokumentiert werden (Zhang et al., 1994; Gomez-Manzano et al., 1996; Nielsen et al., 1997). Typische Effekte des erfolgreichen p53-Gentransfers sind Änderungen der Zellmorphologie, die Auslösung eines Zellzyklusarrests und eine gesteigerte Apoptoserate. Eine bisher geringe Anzahl von Studien beschäftigte sich mit der Möglichkeit der Kombination der p53-Gentherapie und Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen und Bestrahlung, um potenziell synergistische Therapieeffekte zu untersuchen (Nguyen et al., 1996; Yang et al., 1996; Vallböhmer et al., 2006). Dies stimulierte uns, die Auswirkungen einer kombinierten p53 Gentherapie und 5U- Chemotherapie auf das Wachstumsverhalten von Pankreas-karzinomzellen zu untersuchen und gleichzeitig den Einfluss des endogenen p53 Status durch die Einbeziehung unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien näher zu analysieren.

Bei einer weiteren Form der Gentherapie, bezeichnet als molekulare Chemotherapie, nutzt man die Aktivität eines übertragenen Gens, um in den malignen Zellen eine Selbstzerstörung einzuleiten. Das Prinzip besteht in der *in situ* Expression des Suizidgens in Tumorzellen und der Applikation des nichttoxischen Medikaments, welches anschließend in diesen transduzierten Zellen in den toxischen Metaboliten umgewandelt werden kann. Theoretisch können dadurch sehr hohe Konzentrationen dieses toxischen Metaboliten in einem lokalen Milieu erreicht werden, ohne die Limitierung der systemischen Zytotoxizität konventioneller Chemotherapeutika aufzuweisen. Ein solches Suizidgen ist Cytosin Deaminase (CD). Cytosin Deaminase ist ein bakterielles Enzym mit einer Größe von 52-kD und konvertiert das nicht toxische 5-Fluorcytosin (5FC) in das chemotherapeutisch wirkende 5-Fluoruracil (5FU) (Andersen et al.,

1989; Mullen et al., 1992; Moolten et al., 1994). Als Vektorsystem für diesen Suizidgentransfer wurden in den letzten Jahren zunehmend rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren verwendet (Trapnell et al., 1994; Bramson et al., 1995; Amalfitano et al., 1998). Deren Vorteil gegenüber anderen viralen oder nicht-viralen Strategien sind die hohe Infektionseffizienz und die Möglichkeit, auch nicht-proliferierende Zellen zu infizieren. Der Nachteil liegt in der transienten Genexpression und der Problematik der Induktion einer zellulären und humoralen Immunantwort gegen das Adenovirus, besonders bei wiederholter Applikation. Der erfolgreiche adenovirale CD-Suizidgentransfer konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien der letzten Jahre für Mamma -, Colon -, und Ovarialtumoren nachgewiesen werden (Austin et al., 1993; Huber et al., 1993; Mullen et al., 1994; Hirschowitz et al., 1995). Die intratumorale Applikation von AdCD und anschließende 5FC-Behandlung führte zu einer signifikanten Hemmung dieser als Xenografts in Nacktmäusen implantierten Tumorzellen (Seth et al., 1996; Evoy et al., 1997; Kievit et al., 1999). Die Problematik aller bisherigen *in situ* Gentransfersysteme ist, dass nur eine begrenzte Anzahl von Zellen des Tumors transfiziert werden kann. Einen Lösungsansatz bietet die Expression von kleinen, lokal zytotoxischen Genprodukten in den transfizierten Tumorzellen mit der Möglichkeit der Diffusion dieser in benachbarte, nicht-transfizierte Tumorzellen. Dieser so genannte Bystandereffekt, der eine Hemmung des Tumorwachstums auch nicht-transfizierter Zellen bewirkt, konnte für das CD-Gen eindrucksvoll gezeigt werden (Rowley et al., 1996; Ge et al., 1997; Wolff et al., 1998; Topf et al., 1998). *In vitro* Experimente demonstrierten, dass nur 10% AdCD transfizierter Zellen ausreichen, um einen kompletten zytotoxischen Effekt auf alle Tumorzellen durch die Zugabe von 5FC zu generieren (Huber et al., 1994; Li et al., 1997). Allerdings wurden die bisher publizierten Therapieerfolge meist in optimalen Tiermodellen erzielt und sind kaum auf die Situation des Pankreaskarzinoms beim Menschen übertragbar. Dies veranlasste uns das Verfahren des adenoviralen Cytosin Deaminase Gentransfers in einem klinisch eher relevanten Tiermodell für das Pankreaskarzinom zu analysieren.

### 3.4 Immuntherapie

Neben den verschiedenen Ansätzen zur Verbesserung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika und neuen Mechanismen möglichst selektiv Krebszellen zu zerstören, könnte vor allem die Immuntherapie zukünftige Chancen in der Krebsbehandlung bieten. Daher werden seit vielen Jahrzehnten unterschiedliche immunologische Strategien zur Therapie von Tumorerkrankungen klinisch getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass immunologische Effektormechanismen prinzipiell in der Lage sind, auch große Tumormassen *in vivo* zu eliminieren (Renner et al., 2002; Waldmann, 2003). So wurden eine Vielzahl von Antigenen auf menschlichen Karzinomzellen identifiziert und es konnten auch für das duktales Adenokarzinom des Pankreas immunogene Eigenschaften nachgewiesen werden (Gilboa, 1999; Blattmann et al., 2004). Wenngleich die Immunogenität von Tumoren in aller Regel nicht für den systeminhärenten Aufbau einer Immunantwort ausreicht, gibt es heute eine Reihe von Möglichkeiten über gezielte Vakzinierungsverfahren dieses Defizit *in vivo* auszugleichen.

Eine Schlüsselrolle bei der Abstoßung von Tumoren spielen antigenspezifische T-Zellen (T<sub>c</sub>) des Immunsystems. Peptide von Tumorzellproteinen werden T-Zellen durch MHC-Moleküle präsentiert und können durch die Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) eine tumorspezifische T-Zell-Reaktion bewirken. Diese kann entweder direkt zur Lyse von Tumorzellen (zytotoxische T-Zellen) oder indirekt durch Sekretion von Zytokinen zur Tumorableitung (T-Helferzellen) führen. Für das Pankreaskarzinom konnten verschiedene T-Zell-Reaktionen gegen tumor-assoziierte Antigene (TAA) wie z.B. das Glycoprotein GA733, ras p21, EGFRs und MUC-1 (MHC-unabhängig) nachgewiesen werden (Staib et al., 1999). Dennoch blieben die Erfolge bisher weit hinter den Erwartungen zurück, unterstreichen aber die prinzipielle Möglichkeit für immuntherapeutische Ansätze beim Pankreaskarzinom (Rammensee et al., 2002; Muehlbauer et al., 2003). Hauptgrund des bisherigen limitierten Erfolges ist, dass Krebszellen verschiedene Überlebensstrategien entwickelt haben, um

einer zerstörenden Immunantwort zu entkommen. Ein aktiver Schutzmechanismus ist die Blockierung wichtiger Funktionen der Immunabwehr durch die tumorale Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10 oder VEGF, oder durch Expression des Liganden von CD95, der Lymphozyten durch die Interaktion mit CD95 in die Apoptose führt. Häufig umgehen Krebszellen eine antitumorale Abwehr auch passiv, indem sie durch verschiedene Modifikationen für Immunzellen unkenntlich geworden sind oder kein „danger“ Signal vermitteln. Durch den Verlust tumoraler Antigene oder die Abnahme funktionstüchtiger MHC Moleküle zur Antigenpräsentation können Krebszellen die direkte Erkennung durch zytotoxische T Zellen (CTL) verhindern. Die tumorspezifische CTL-Aktivierung kann zudem durch eine verminderte Antigenprozessierung beeinträchtigt sein. Wird bei der Antigenpräsentation kein „danger“ Signal vermittelt, erhalten Tumorantigen-spezifische CTLs ein autoreaktives Signal und gehen in einen anergen Zustand über. Die dadurch entstehende Tumortoleranz (Crosstolerance) wird auch dadurch begünstigt, dass Krebszellen aus gesunden Körperzellen entstanden sind und den T-Zellen somit viele körpereigene „self“Antigene präsentiert werden. Die Chance der Tumorantigenerkennung vom körpereigenen Immunsystem wird durch das vom Tumor induzierte immunsuppressive Milieu zusätzlich verringert. Insgesamt wird die Toleranz gegenüber den „self“ oder „non-dangerous“ Tumorantigenen als einer der Hauptgründe des Versagens der immunologischen Krebsabwehr angesehen, da bereits mehrere Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) nachgewiesen werden konnten, und eine Tumorerkennung daher grundsätzlich möglich sein sollte (Espinoza-Delgado, 2002; Perales et al., 2002). Mit zukünftigen immuntherapeutischen Strategien sollen genau diese Immundefekte bewältigt werden. Es gibt verschiedene Ansätze, die dem Immunsystem helfen sollen, Krebszellen als „nonself“ und „dangerous“ zu erkennen. Zwei dieser möglichen Mechanismen sollen im Rahmen dieser experimentellen Arbeit diskutiert werden. Erstens die unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch AAV-2 und zweitens die Steigerung

der Tumorimmunogenität durch die *in vivo* Modifizierung von Tumorzellen mit dem Suizidgen Cytosin Deaminase.

Die unspezifische Immunstimulation durch mikrobiologische Ansätze ist ein bekanntes Konzept in der Immunologie. Es geht davon aus, dass das angeborene Immunsystem (Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen) die Fähigkeit besitzt, potenzielle Krankheitserreger anhand charakteristischer molekularer Muster zu erkennen und eine auf die Bekämpfung des Erregers abgestimmte antigenspezifische Immunantwort, erworbene Immunantwort (T-Zellen, B-Zellen), zu initiieren und zu steuern (Rothenfuß et al., 2001). Unterschiede im Aufbau von bakterieller oder viraler DNA (so genannte CpG-Motive) im Vergleich zur Wirbeltier-DNA ermöglichen dem Immunsystem, diese potenziellen Krankheitserreger aufgrund ihrer DNA-Struktur zu erkennen. CpG-Motive innerhalb der DNA (intrazelluläre Bakterien oder Viren) aktivieren direkt Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (angeborenes Immunsystem) sowie B-Zellen (erworbenes Immunsystem). Sekundär werden NK-Zellen über die vermehrte Synthese der Zytokine IL-12 und INF- $\alpha$  stimuliert. Die Synthese von INF- $\gamma$  durch NK-Zellen wiederum kostimuliert die Synthese von IL-12 durch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. T-Zellen werden durch die vermehrte Expression von antigenpräsentierenden Molekülen (MHC) sowie der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 aktiviert. Dieser Mechanismus der zur Elimination von infizierten körpereigenen Zellen führt ist für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien gegen Tumorzellen von zunehmend wichtiger Bedeutung. Daten für das nicht humanpathogene und im Gegensatz zu den onkolytischen Viren replikationsdefiziente Adeno-Assoziierte Virus Typ 2 lagen bisher nicht vor. Dies veranlasste uns, das immunologische Potenzial einer AAV-2 Infektion in einem syngenem Pankreaskarzinommodell immunkompetenter Ratten zu untersuchen.

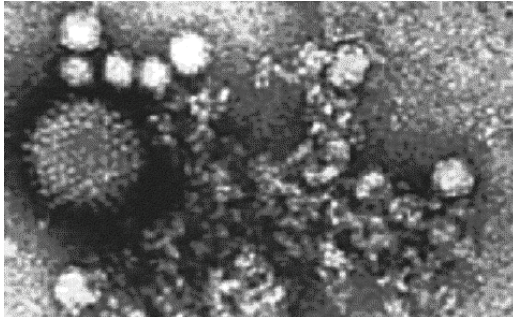
Eine weitere immuntherapeutische Alternative ist die Modifizierung von Tumorzellen, um die Antwort des Immunsystems auf Krebszellen zu erhöhen und so zu ihrer Zerstörung beizutragen. Neben dem bekannten

lokalen Bystander Effekt verschiedener Suizidgensysteme gibt es einen zusätzlichen Effekt, der über das Immunsystem vermittelt wird (Consalvo et al., 1995; Freemann et al. 1997; Dilber et al., 1997). Die Expression von fremden bakteriellen oder viralen Proteinen sollte theoretisch zu einer verstärkten Generierung einer Immunantwort gegen meist schwach immunogene Tumoren führen. Obwohl der Rückgang des Tumors während einer Suizidgen-Pro-Drug Therapie durch die lokale Generierung eines Toxins erfolgt, sollte es möglich sein, dass eine immunologische Reaktion mit diesem Prozess einhergeht. Histologische Untersuchungen derartig modifizierter Tumoren unter einer Pro-Drug Therapie zeigten eine inflammatorische Infiltration von Makrophagen und T-Zellen. Hierdurch kann es zur Aktivierung eines immunologischen Gedächtnisses kommen. Die Infiltration von NK-Zellen kann darüber hinaus zu einem direkten Erkennen und Bekämpfen von Tumorzellen führen. So berichtete beispielsweise Mullen et al. [1994], dass die Expression von CD in Kolonkarzinomen und die anschließende Behandlung mit 5FC immunkompetente Mäuse immunisiert und nur ein Viertel der Tiere erneut einen Tumor ausbildet. Weiterhin wurde eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, z. B. von Tumor Nekrose Faktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-6, Interferon- $\gamma$  und Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) in so modifizierten Tumorzellen nach Pro-Drug-Gabe [Ramesh et al., 1998] beobachtet. Da das Wiederauftreten eines Tumors unter einer *in vivo* Suizidgen-Therapie nach Absetzen der Pro-Drug bekannt ist, dies aber häufiger in Nackt-Mäusen festgestellt wurde als in immunkompetenten Mäusen [Gagandeep et al., 1996; Kuriyama et al., 1999], sollte in dieser Arbeit überprüft werden, welche Rolle das Immunsystem in einem syngenem Pankreaskarzinommodell immunkompetenter Tiere spielt. Bisherige Untersuchungen zu diesem Thema erfolgten zumeist in „idealen“ Tumormodellen mit einem hohen Anteil suizidgentragender Tumorzellen oder *ex vivo* modifizierten Tumorzellen, so dass bewusst versucht wurde die klinische Situation von Pankreaskarzinompatienten im Tiermodell besser abzubilden.



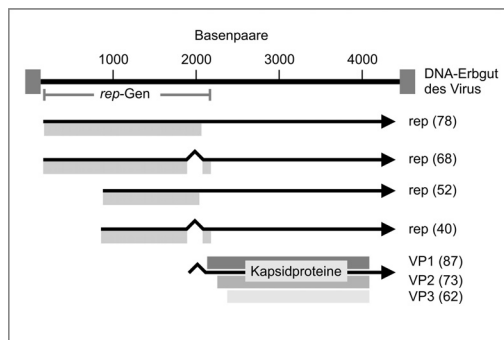
## 4. Methodischer Überblick

### 4.1 Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2)



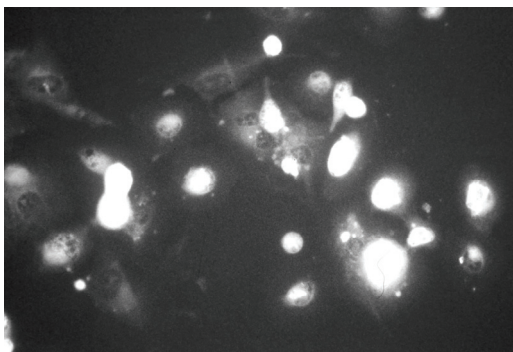
Parvoviren gehören zu den kleinsten bekannten Viren mit einem Durchmesser von 18-20 nm. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Adeno-assoziierte Viruspartikel (AAV-2), die anders als die autonomen Parvoviren zur Vermehrung auf die Mithilfe anderer Helferviren (z.B. Ad2) angewiesen sind. Ihr Erbgut kann sich in das der Wirtszelle integrieren und tumorhemmend wirken.

**Abbildung:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Adeno-assoziierten Viren (AAV-2) und Adenovirus (Ad2) (freundliche Überlassung von P. Klein-Bauernschmitt)



AAV-2 ist ein nicht pathogenes Parvovirus mit einem kleinen, einsträngigen DNA-Genom. Seine zwei Gene cap und rep werden von inverted terminal repeats (ITR) flankiert, die das Verpackungssignal enthalten. Das cap-Gen kodiert virale Hüllproteine, das rep-Genprodukt ist an der viralen Replikation und Integration beteiligt. Zusätzlich benötigt AAV weitere Gene für die Replikation, die von Helferviren geliefert werden.

**Abbildung:** Genomorganisation Adeno-assoziiierter Viren (AAV-2) (modifiziert aus J.R. Schlehofer, Mutation Research 1994)

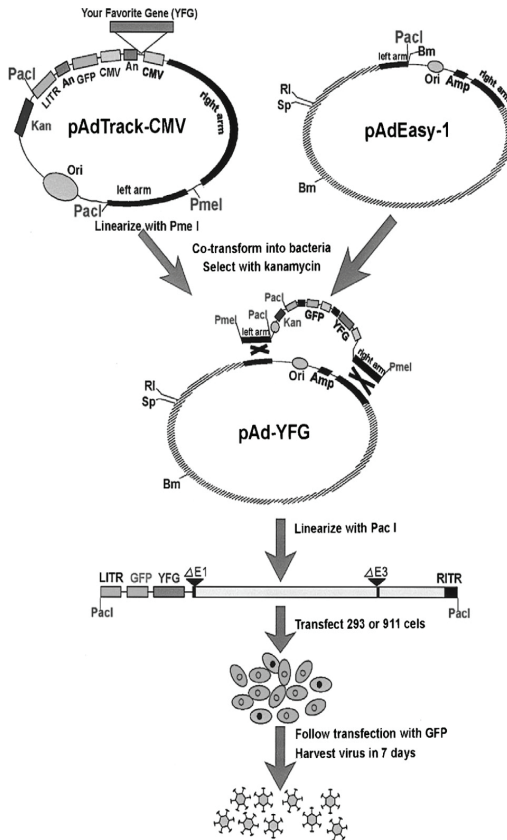


AAV-2 kann ein breites Spektrum an Zellen infizieren und in Anwesenheit des rep-Genprodukts die virale DNA spezifisch in das Wirtsgenom integrieren. Im dargestellten Beispiel wurden DSL6A Pankreas-karzinomzellen mit AAV-2 und Ad2 infiziert und zeigen das rep78 Protein, sichtbar gemacht durch fluoreszenzmarkierte Antikörper.

**Abbildung:** Immunfluoreszenznachweis von AAV-2 spezifischen rep78 Protein in infizierten DSL6A Pankreaskarzinomzellen

## 4.2 Adenovirale Vektorsysteme

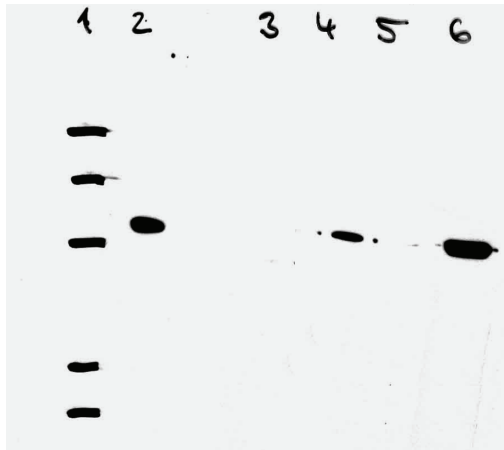
### Generierung rekombinanter adenoviraler Vektoren



Für die Generierung der verwendeten adenoviralen Vektoren AdCD bzw. Adp53 wurde das AdEasy-System verwendet. Dieses System bietet mehrere so genannte Transfervektoren (pShuttle, pShuttle-CMV, pAdTrack, pAdTrack-CMV) in die bedarfsmässig das gewünschte Transgen, Cytosin Deaminase (CD) oder p53, inseriert wird, sowie zwei Rekombinationsplasmide (pAdEasy-1 und pAdEasy-2), die neben regulatorischen Elementen das E1/E3-deletierte (pAdEasy-1) bzw. E1/E3/E4-deletierte (pAdEasy-2) adenovirale Genom enthalten. Der hergestellte Transfervektor wird zusammen mit einem viralen DNA-Plasmid in den E. coli-Stamm BJ 5183 transformiert. In BJ 5183, die im Gegensatz zu anderen E. coli-Stämmen intakte Rekombinationsenzyme exprimieren, entsteht durch Anlagerung homologer Sequenzen beider Plasmide (homologe Rekombination) ein kombiniertes Plasmid, welches das Transgen in Verbindung mit dem adenoviralen Genom enthält. Die rekombinante DNA wird in 911- oder 293-Zellen transfiziert, in denen die Produktion von Viruspartikeln stattfindet.

**Abbildung** aus: He et al., A simplified system for generating recombinant adenoviruses, PNAS Online, Vol. 95, Issue 5, 2509-2514, March 3, 1998

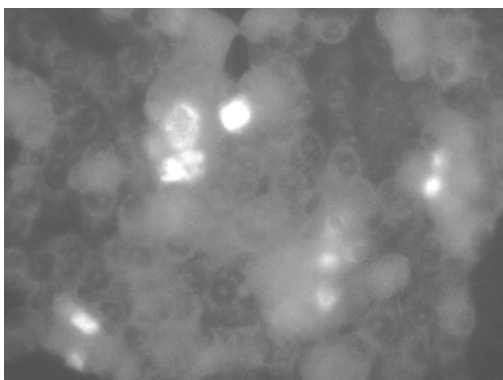
### **AdCD Vektor**



Im Western Blot zeigt sich eine deutliche Cytosin Deaminase (CD) Proteinexpression 24h nach *in vitro* Infektion der Zelllinien 911 und DSL6A (Pankreaskarzinomlinie der Ratte) mit dem generierten AdCD Vektor (MOI 10). Als Positivkontrolle (Spur 2) dient das gereinigte, 52kD-CD-Protein [Haack K., 1997]. Links (Spur 1) der Proteingrößenmarker. Spur 3: 911 Zellen, mock-infiziert, Spur 4: 911 Zellen + AdCD, Spur 5: DSL6A Zellen, mock-infiziert, Spur 6: DSL6A Zellen + AdCD.

**Abbildung:** Nachweis der Cytosin Deaminase (CD) Expression nach AdCD- Gentransfer im Westernblot

### **Adp53 Vektor**

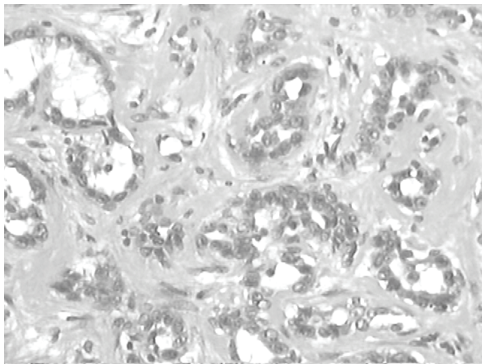
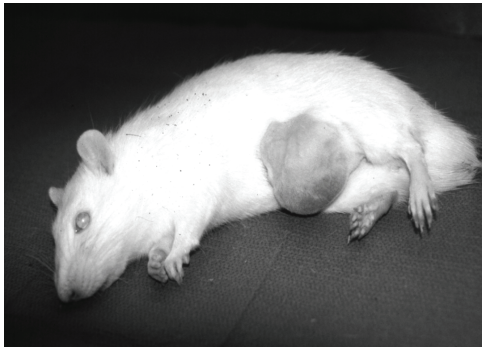


Nach *in vitro* Infektion mit dem hergestellten Adp53 Vektor (MOI 50) zeigen DSL6A Pankreaskarzinomzellen in der Immunfluoreszenz ein deutlich positives Signal für die Überexpression von p53 Protein (monoklonaler p53 Antikörper DO7).

**Abbildung:** Nachweis der p53 Expression nach Adp53 Gentransfer in der Immunfloreszenz

## 4.3 Tiermodell

### *Duktales Pankreaskarzinom der Ratte*



Zur Etablierung eines klinisch relevanten, immunkompetenten Tiermodells für das Pankreaskarzinom wurde die murine Zelllinie DSL6A verwendet. Diese Pankreaskarzinomzellen wurden in Azaserine behandelten Lewis Ratten generiert und zeigen einen duktalem Zelltyp (Pettengill et al., AmJ Pathol 1993).

Im Tierexperiment werden diese syngenen DSL6A Pankreaskarzinomzellen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  subkutan in männliche Lewis Ratten inokuliert. Es entwickeln sich ähnlich der klinischen Situation solide, lokal aggressive Pankreaskarzinome mit späterer systemischer Metastasierung und unbehandelt nach ca. 12 Wochen der Tod der Tiere. Für die experimentelle Therapie der verschiedenen Behandlungsstrategien wurde der Beginn nach 6 bzw. 8 Wochen Tumorwachstums festgelegt.

In der HE-Färbung zeigt sich der drüsige Aufbau des Pankreaskarzinoms mit begleitender desmoplastischer Reaktion.

**Abbildung:** Männliche Lewis Ratte mit solidem DSL6A Pankreastumor, der in der HE-Färbung duktale Strukturen zeigt

## **5. Ziele der Arbeit**

Spezifische Ziele der vorgelegten Arbeiten zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte für das experimentelle Pankreaskarzinom mit Adeno-assoziierten Viren Typ 2 (AAV-2) und den replikationsdefizienten adenoviralen Vektorssystemen Adp53 und AdCD sind nachfolgend zusammengefasst.

### ***Steigerung der lokalen Wirksamkeit zytotoxischer Substanzen und Reduktion der therapie-assoziierten Nebenwirkungen***

- i. Untersuchungen zur Chemosensibilisierung von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* und *in vivo* durch 5FU-Behandlung und parallele Infektion mit Adeno-assoziierten Viren (AAV-2); Festlegung der genauen Kinetik und Reihenfolge der 5FU-Applikation und AAV-2-Infektion; Ermittlung geeigneter Dosen *in vitro* und *in vivo* zur Dosisreduktion bzw. Durchbrechung der Chemotherapieresistenz durch die gleichzeitige Infektion mit Adeno-assoziierten Viren
- ii. Untersuchungen über die Auswirkungen einer AAV-2-Infektion in immunkompetenten, tumortragenden Tieren auf Nebenwirkungen der Chemotherapie, Dauer der Applikation und verwendeten Chemotherapeutikadosis, den Allgemeinzustand der Tiere, und den Veränderungen der hämatologischen Parameter
- iii. Quantifizierung der Apoptoseinduktion, die durch den adenoviralen p53-Transfer in Pankreaskarzinomzellen hervorgerufen wird; Evaluierung synergistischer Effekte, durch die eine gleichzeitige Chemotherapie die Apoptoseinduktion steigern kann; die Definition weiterer Faktoren (wie z.B. p53-Status der Pankreaskarzinomzellen), die die Empfindlichkeit der Pankreaskarzinomzellen gegenüber den adenoviralen Konstrukten bzw. der gleichzeitigen Chemotherapie beeinflussen

**Aktivierung des Immunsystems und Steigerung der Tumorimmunogenität**

- iv. Untersuchungen der Aktivierung des Immunsystems und Analyse der Auswirkungen einer Immunantwort gegen AAV-2 nach der *in situ* Applikation von AAV-2; Bestimmung der Zytokinveränderungen und Analyse des Beitrages immunkompetenter Zellen auf den therapeutischen Effekt *in vivo*
  
- v. Untersuchungen zum Cytosin Deaminase Pro-Drug Gentransfer auf Tumorwachstum und Tumorkontrolle (lokaler Bystandereffekt) *in vitro* und *in vivo*; Analyse des postulierten immunologischen Bystandereffektes in einem syngenem Pankreastumormodell immunkompetenter Ratten; Evaluation lokal inflammatorischer Botenstoffe und apoptotischer Zellfragmente auf die Induktion einer Immunantwort

## **6. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse**

### **6.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen und Reduktion chemotherapie-assoziiierter Nebenwirkungen**

#### ***AAV-2 erhöht die Wirksamkeit von 5FU in vitro und in vivo***

Die vorliegenden Daten zur verbesserten Wirksamkeit von Chemotherapeutika durch eine AAV-2 vermittelte Sensibilisierung von Tumorzellen wurden bisher *in vitro* oder in Nacktmausmodellen gezeigt. Daher war es ein Ziel, diese Effekte in einem syngenem Pankreastumormodell immunkompetenter Ratten zu überprüfen. Vorab bestätigten die *in vitro* Experimente, den chemosensibilisierenden Effekt von AAV-2 für 5FU. Es konnte gezeigt werden, dass für die im Tierversuch verwendete Rattenpankreaskarzinomzelllinie (DSL6A) und zwei weitere humane Pankreaskarzinomzelllinien (DANG, Capan-1) eine AAV-2 Infektion mit nachfolgender 5FU-Chemotherapie zu einer signifikanten Proliferationshemmung und Steigerung der Apoptoserate führte. Im Tierexperiment wurde zunächst für 5FU die Minimaldosis mit 5 mg/kg/KG definiert und einmal wöchentlich verabreicht. Die Applikation von  $10^8$  AAV-2 Viruspartikeln erfolgte intratumoral als alleinige Therapie oder in Kombination mit 5FU-Chemotherapie, ebenfalls wöchentlich. Im Ergebnis zeigte sich ein signifikanter Effekt der AAV-2 Infektion auf das Tumorwachstum und Überleben der Tiere. So konnte sowohl mit der alleinigen AAV-2 Applikation als auch, noch stärker ausgeprägt, in Kombination mit 5FU die Tumorprogression signifikant gehemmt werden. Bei insgesamt 8 von 12 Tieren, die eine Kombinationstherapie mit AAV-2 und 5FU erhielten, zeigte sich sogar ein Wachstumsstopp und auch > 20 Wochen nach Tumorinokulation kein weiteres Tumorwachstum mehr. Im Vergleich dazu wiesen die unbehandelten Kontrolltiere ein rasches Tumorwachstum auf. Die alleinige Chemotherapie mit 5FU führte zwar zu einem verzögerten Tumorwachstum, konnte aber die weitere Tumorprogression nicht verhindern. Alle AAV-2 behandelten Tiere waren auch nach Ende der Therapie am Leben, während unbehandelte Kontrolltiere spätestens 12 Wochen nach Tumorinokulation verstarben.

Tiere mit alleiniger 5FU-Chemotherapie waren 17 Wochen nach Tumorinokulation entweder verstorben oder mussten aufgrund der Größenprogredienz des Pankreastumors getötet werden. Dieser Überlebensvorteil für AAV-2 infizierte Tiere war am stärksten ausgeprägt für Tiere, welche die Kombinationstherapie von AAV-2 und 5FU erhielten.

### ***AAV-2 reduziert signifikant die 5FU-assoziierten Nebenwirkungen***

Im nächsten Schritt erfolgte der analoge tierexperimentelle Versuchsablauf, allerdings unter Verwendung einer 10-fach höheren 5FU-Dosis mit 50 mg/kg/KG als Maximaldosis und einem späteren Beginn der Therapie bei weiter fortgeschrittenen Pankreastumoren. Auch hier bestätigte sich der chemosensibilisierende Effekt von AAV-2, wenngleich weniger ausgeprägt. Verbunden mit einer verbesserten Ansprechrate der Tumoren auf die 5FU-Hochdosistherapie waren vor allem systemisch toxische Nebenwirkungen. So verstarben alle Tiere aus der Gruppe der Hochdosischemotherapie bereits vor dem geplanten Therapieende an ihren tumorbedingten oder therapie-assoziierten Nebenwirkungen. Im Gegensatz dazu waren noch 50% der Tiere mit gleicher Hochdosis-5FU-Chemotherapie, aber zusätzlicher AAV-2 Behandlung zum Zeitpunkt des Therapieabschlusses am Leben. Die alleinige AAV-2 Applikation konnte zwar das Tumorwachstum nur gering verlangsamen, aber alle Tiere wiesen einen erheblich besseren Allgemeinzustand auf. Um diese Beobachtungen besser quantifizieren zu können, wurde ein Scoresystem („Clinical Performance Score“) entwickelt und die Versuchstiere täglich evaluiert. Dieser Score umfasste die Parameter, 1. Aktivität und Verhalten, 2. Bewegung und Haltung, 3. Ernährung und Gewicht, 4. Haarkleid und 5. Schmerzsymptome. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung hämatologischer Parameter. Zusammenfassend war eine deutlich bessere Verträglichkeit der 5FU-Hochdosischemotherapie für Tiere mit vorangegangener AAV-2 Infektion festzustellen. Dies spiegelte sich unter anderem in einem höheren „Clinical Performance-Score“ mit besserer Vigilanz und stabilem Gewichtsverlauf der Tiere wider. Dagegen wiesen Tiere mit alleiniger Hochdosischemotherapie eine eingeschränkte Vigilanz und einen fast



20% Gewichtsverlust unter der Behandlung auf. Diese Tiere zeigten einen signifikanten Abfall der Leukozyten und Thrombozyten auf <10% des Normalwertes und eine Reduktion des Hb-Wertes um mehr als 50%. Im Gegensatz dazu waren bei Tieren mit gleichzeitiger AAV-2 Behandlung nahezu keine toxischen Nebenwirkungen im Blutbild festzustellen. Diese neuen Erkenntnisse unterstrichen erstmals den überraschenden Befund, dass eine konkomitante AAV-2 Infektion die unerwünschten 5FU-assoziierten toxischen Nebenwirkungen verhindern kann.

## **6.2 Induktion einer antitumoralen Immunantwort durch AAV-2 in einem syngenem Rattenmodell des Pankreaskarzinoms**

### ***AAV-2 verhindert erneutes Tumorwachstum in Lewis-Ratten***

Im Gegensatz zu den onkolytischen Viren, die neben der Zerstörung von Tumorzellen auch eine spezifische Immunantwort auslösen können, waren bisher keine Untersuchungen immunologisch basierter antitumoraler Effekte für AAV-2 bekannt. Daher war es Ziel unserer Arbeit, das immunologische Potenzial einer AAV-2 Infektion *in vivo* im Pankreastumormodell immunkompetenter Lewis-Ratten zu analysieren. DSL6A Pankreastumorzellen wurden subkutan in Lewis Ratten inokuliert und nach 6 Wochen Tumorwachstum wurde mit der Applikation von AAV-2 ( $10^8$  Viruspartikel) intratumoral oder intraperitoneal zweimal wöchentlich für insgesamt 4 Wochen begonnen. Anschließend erfolgte die komplette Tumorsektion (Ro). Nachmals 6 Wochen später wurde bei den tumorfreien Tieren eine erneute Inokulation (Rechallenge) mit der tumorigenen Dosis von  $1 \times 10^6$  DSL6A-Pankreaskarzinomzellen durchgeführt. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Wochen entwickelten 11 von 12 (92%) Kontrolltieren („mock“-infiziert) erneut einen soliden Pankreastumor. Im Gegensatz dazu zeigten nur 3 von 12 (25%) der AAV-2 infizierten Tiere ein erneutes Tumorwachstum. Dieser tumorprotektive, AAV-2 induzierte Effekt, zeigte sich davon unabhängig, ob die initiale AAV-2 Applikation lokal oder systemisch erfolgte. Zusätzlich zeigte sich am Ende des Experiments, dass AAV-2 infizierte Tiere keine

Tumormetastasierung aufwiesen, wo hingegen 5 von 12 (42%) der Kontrolltiere eine Metastasierung in Lunge, Leber oder Milz aufwiesen.

### ***AAV-2 wirkt immunstimulatorisch und induziert eine Immunantwort***

Um diese Resultate weiter analysieren zu können, erfolgte die Bestimmung immunologischer Parameter. Dabei zeigte sich in der Blutbilduntersuchung, dass eine AAV-2- Infektion zu einer signifikanten Erhöhung von Neutrophilen und Monozyten führte. Des Weiteren war in der immunhistochemischen Aufarbeitung der initialen Tumoren dieser Tiere eine Vielzahl von infiltrierenden Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, CD4 positiven und ganz besonders zytotoxischen CD8 positiven T-Zellen zu beobachten. Die Serumanalyse der Zytokine IL1 $\beta$ , IL4, IL6, INF $\gamma$  und TNF $\alpha$ , zeigte keinen Unterschied zwischen AAV-2 infizierten Tieren und Kontrolltieren, während IL10 und MCP-1 auf mehr als das zweifache in AAV-2 infizierten Tieren erhöht waren. Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Tumorprotektion AAV-2 infizierter Tiere gegenüber einer erneuten Tumorzellinokulation aufgrund der Auslösung einer zellulären Immunantwort erfolgte, wurden <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitätstests durchgeführt. Periphere Blutzellen von AAV-2 infizierten Tieren, welche kein erneutes Tumorwachstum im Tumorrechallengeexperiment zeigten wurden mit DSL6A Pankreastumorzellen als Targetzellen inkubiert und ihre zytotoxische Aktivität bestimmt. Dabei konnte eine signifikante Lyse von DSL6A Zellen nachgewiesen werden, während periphere Blutzellen der Kontrolltiere keine Lyse der Tumorzellen bewirkten. Weitere Experimente mit verschiedenen Targetzellen, AAV-2 infizierten DSL6A Zellen, für natürliche Killerzellen sensible YAC-Zellen und der Rattenkolonkarzinomzellen CC531, demonstrierten, dass AAV-2 eine spezifisch zytotoxische T-Zellantwort induziert und das zusätzlich eine Aktivierung natürlicher Killerzellen stattfindet.

Zusammenfassend konnte erstmals für AAV-2 ein immunstimulatorischer Effekt mit Aktivierung von Effektorzellen sowohl des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden.

### **6.3 Die adenovirale p53 vermittelte 5FU-Chemosensibilisierung ist abhängig vom p53 Status der Pankreaskarzinomzellen**

#### ***Adp53 und 5FU wirken synergistisch in vitro und in vivo***

Die Wiedereinführung des Tumorsuppressorgens p53 in Tumorzellen mit einer alterierten p53 Funktion reduziert nicht nur die Tumorigenität dieser Zellen und steigert deren Apoptoserate, sondern kann diese Zellen für die genotoxische Wirkung von Strahlen- und Chemotherapeutika sensibilisieren. Kontrovers diskutiert wird aber die Frage, ob diese Chemosensibilisierung vom endogenen p53 Status der Tumorzellen abhängt oder nicht. Ziel war es daher, den Effekt der Kombination von adenoviralem p53 Gentransfer (Adp53) und 5-Fluorouracil (5FU)-Behandlung *in vitro* und *in vivo* zu analysieren und mit dem endogenen p53-Status der untersuchten Pankreaskarzinomzellen zu korrelieren. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden vier humane (Capan-1<sup>p53mut</sup>, Capan-2<sup>p53wt</sup>, FAMPAC<sup>p53mut</sup>, PANC1<sup>p53mut</sup>) und zwei murine (AS<sup>p53wt</sup>, DSL6A<sup>p53null</sup>) Pankreaskarzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53 Status verwendet. Zunächst erfolgte der adenovirale p53 Gentransfer in die verschiedenen Zelllinien, um anschließend 24 Stunden später eine 5FU-Chemotherapie durchzuführen. Dabei zeigte sich in diesen *in vitro* Experimenten, dass alle verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien erfolgreich mit Adp53 transduziert werden können. Die Zelllinien Capan-1, FAMPAC, PANC1 und DSL6A mit einer endogenen Alteration des p53 Status zeigten unter alleiniger Adp53 Behandlung eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums und eine gesteigerte Apoptoserate gegenüber den Wildtyp p53 enthaltenen Zelllinien Capan-2 und AS. Für humane Capan-2 Zellen konnte ein antiproliferativer Effekt nur bei höherer Anzahl der eingesetzten Adp53 Viruspartikel erreicht werden, während die murine Zelllinie AS keine signifikante Tumorzellwachstumshemmung aufwies. Aufgrund der Tatsache, dass es bisher schwierig ist eine hohe Transfektionseffizienz adenoviraler Vektorsysteme *in vivo* zu erreichen und die Verwendung hoher 5FU Dosen durch ihre toxischen Nebenwirkungen limitiert ist wurden für die kombinierte Adp53 und 5FU-Therapie *in vitro* geringere Virustiter und 5FU-Konzentrationen eingesetzt.

Trotzdem konnte ein signifikant synergistischer Effekt dieser Kombinationsbehandlung für die Zelllinien mit einer p53 Alteration nachgewiesen werden. Im Vergleich zur alleinigen 5FU-Chemotherapie führte die zusätzlich zuvor durchgeführte Infektion der Zelllinien Capan-1, FAMPAC, PANC1 und DSL6A mit Adp53 zu einer um mehr als den Faktor zwei verstärkten Tumorstillung im WST-1 Zellproliferationstest. Um den Effekt der adenoviralen p53 vermittelten Chemosensibilisierung für 5FU in diesen Zelllinien näher zu analysieren wurde die Apoptoserate *in vitro* bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Adp53 Infektion mit anschließender 5FU-Chemotherapie die Apoptoserate um den Faktor drei im Vergleich zur alleinigen 5FU-Behandlung steigert. Im Gegensatz dazu waren die Wildtyp p53 enthaltenden Zelllinien Capan-2 und AS primär zwar etwas chemosensibler für 5FU, aber die zusätzliche Adp53 Infektion der Zellen konnte den antiproliferativen Effekt nicht signifikant steigern.

Im Unterschied zu vielen publizierten Daten genterapeutischer *in vivo* Experimente, wurde ein syngenes Tumormodell verwendet und die zu behandelnden Pankreastumoren waren vor Therapiebeginn ausreichend solide etabliert. Die zuvor *in vitro* analysierten DSL6A Pankreaskarzinomzellen wurden subkutan inokuliert und nach 8 Wochen mit der Behandlung begonnen. Dabei erfolgte die Applikation der adenoviralen p53 Viruspartikel ( $10^8$ ) intratumoral und die 5FU-Chemotherapie (5mg/kg/KG) intraperitoneal, zweimal wöchentlich für einen Behandlungszeitraum von insgesamt 4 Wochen. Während der ersten zwei Behandlungswochen zeigten sich tumorwachstumshemmende Effekte für die alleinige 5FU-Behandlung, die alleinige Adp53 Applikation sowie die Kombinationsbehandlung beider Monotherapien. Allerdings zeigte sich dann in den nachfolgenden 2 Behandlungswochen ein progredientes Tumorstillung für Tiere mit alleiniger 5FU- oder Adp53-Behandlung. Im Gegensatz dazu zeigte sich hochsignifikant der stärkste tumorwachstumshemmende Effekt für die kombinierte Behandlung von Adp53 und 5FU. Obwohl keines der so behandelten Tiere am Ende des Experiments tumorfrei war, konnten mit dieser kombinierten Behandlung

ein Tumorwachstumsstopp und eine lokale Tumorkontrolle erreicht werden. Analog der *in vitro* Resultate wurde der tumorhemmende Effekt auch hier durch eine verstärkte Apoptoseinduktion *in vivo* ermöglicht.

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass die transiente Einführung von funktionsfähigem p53 in Pankreaskarzinomzellen mit einem alterierten p53 Status signifikant die Chemosensibilität für eine 5FU Chemotherapie *in vitro* und *in vivo* steigern kann.

#### **6.4 Adenoviraler Cytosine Deaminase (CD) Pro-Drug Gentransfer ist ineffizient zur Auslösung einer signifikanten antitumoralen Immunantwort**

##### ***Die AdCD vermittelte Tumorwachstumskontrolle ist zeitlich limitiert***

Die Übertragung des Suizidgens Cytosin Deaminase in Tumorzellen bietet theoretisch zwei attraktive Möglichkeiten zur gentherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen. So kann Cytosine Deaminase (CD) zum einen 5-Fluorocytosin in den toxischen Metaboliten 5-Fluorouracil konvertieren und damit die malignen Zellen zerstören und zum anderen zur Steigerung der Immunogenität von Tumorzellen führen und damit ihre Zerstörung durch immunkompetente Zellen bewirken. Ziel unserer Untersuchungen war es daher, beide Effekte für schwach immunogene, syngene DSL6A Pankreaskarzinomzellen in einem immunkompetenten Rattentumormodell zu überprüfen. Zunächst erfolgte *in vitro* die Analyse des replikationsdefizienten adenoviralen Vektorkonstruktes. Dabei zeigte sich, dass DSL6A Zellen erfolgreich transient mit CD transduziert werden können und die Applikation mit 5FC einen signifikante *in vitro* Wachstumshemmung bewirkt. Dieser Effekt beruht auf der Konversion von 5FC zu 5FU und resultiert in einer signifikant erhöhten Tumorzell-Apoptoserate. *In vivo* wurden männlichen Lewis Ratten subkutan mit  $1 \times 10^6$  DSL6A Pankreaskarzinomzellen inokuliert und nach 6 Wochen mit der Behandlung begonnen. Zweimal wöchentlich erfolgten für einen Therapiezeitraum von 8 Wochen die intratumorale Applikation von AdCD

( $10^8$  Viruspartikel) und die 5FC-Behandlung (500mg/kg/KG) intra-peritoneal. Als Kontrollgruppen dienten tumortragende Lewis-Ratten ohne Behandlung, oder mit alleiniger AdCD bzw. 5FC Therapie. Im Verlauf der Behandlung zeigte sich in den ersten 4 Wochen ein rasch progredientes Tumorwachstum in den Kontrolltieren. Tiere mit AdCD/5FC Therapie zeigten kein weiteres Tumorwachstum und es konnte eine lokale Tumorwachstumskontrolle erreicht werden. Immunhistochemische Färbungen bestätigten, dass dieser Effekt durch eine erhöhte Apoptoserate auch *in vivo* erzielt wurde. Dieser antiproliferative Effekt war jedoch zeitlich limitiert und im weiteren Verlauf musste trotz Fortführung der Therapie ein Fortschreiten des Tumorwachstums registriert werden. Nach 8 wöchiger Behandlung war kein signifikanter Unterschied der Tumorgröße zwischen den so behandelten AdCD/FC Tieren und den Kontrolltieren festzustellen.

#### ***AdCD-Transfer in vivo schützt nicht vor erneutem Tumorwachstum***

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob neben dem bekannten Bystandereffekt zusätzlich eine Immunantwort ausgelöst werden kann und AdCD/FC behandelte Tiere gegenüber einem erneuten Tumorwachstum geschützt werden können. Analog zu oben genannten *in vivo* Experimenten verwendeten wir das syngene Pankreaskarzinommodell immunkompetenter Ratten. Die subkutan inokulierten DSL6A-Pankreaszellen konnten innerhalb von 6 Wochen solide Tumoren formieren und anschließend wurde mit der Behandlung AdCD/5FC bzw. Therapie entsprechend der bereits o. g. Kontrollgruppen begonnen. Diese Behandlung erfolgte für insgesamt 4 Wochen. Danach wurden die Tumoren komplett R0-reseziert. Weitere 4 Wochen später erfolgte erneut die subkutane Inokulation der parentalen Pankreaskarzinomzelllinie mit der tumorigenen Dosis von  $1 \times 10^6$  DSL6A Zellen. Im Verlauf wurde das *in vivo* Tumorwachstum beobachtet und die mögliche Induktion einer Immunantwort analysiert. Zunächst zeigte sich, dass bei allen Tieren, auch bei den Tieren mit zuvor AdCD/5FC behandelten Tumoren, ein erneutes Tumorwachstum auftrat. Überraschenderweise konnte darüber

hinaus kein signifikanter Unterschied der Wachstumskinetik zwischen den unterschiedlichen Gruppen beobachtet werden. Um nun die Ursachen für den postulierten aber ausgebliebenen tumorprotektiven Effekt in unserem experimentellen Tiermodell zu untersuchen, erfolgten immunhistochemische Färbungen von Tumorschnitten für immunkompetente Zellen und Aktivitätsbestimmungen peripherer Blutlymphozyten mittels Chromfreisetzungstest gegenüber unterschiedlichen Targetzellen. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten kein Auftreten tumorinfiltrierender CD4+ und CD8+ Zellen unabhängig von der Behandlungsmodalität. Lediglich einige NK-Zellen in AdCD modifizierten Tumoren konnten als mögliche antitumoral wirkende Immunzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass weder periphere Blutlymphozyten von Kontrolltieren noch von AdCD/5FC behandelten Tieren in der Lage waren DSL6A Pankreaskarzinomzellen effizient zu lysieren. Es zeigte sich vielmehr, dass die beobachtete Grundaktivität eher auf eine unspezifische NK-Zellaktivität zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigte sich in unserem experimentellen Pankreaskarzinommodell, dass die *in vivo* Modulation von Pankreastumorzellen mittels AdCD/5FC nicht ausreichend ist, um etablierte solide Tumoren vollständig zu beseitigen und Tiere gegen ein erneutes Tumorwachstum zu schützen. Trotz des fehlenden Nachweises eines protektiven immunologischen Gedächtnisses unterstützt gerade die initial beobachtete Tumorwachstumskontrolle neue multimodale Therapiestrategien zur Überwindung negativer Auswirkungen einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung und chemotherapie-assoziiertes Nebenwirkungen auf das Immunsystem.

## **7. Diskussion der Ergebnisse**

### **7.1 Steigerung der lokalen Wirksamkeit zytotoxischer Substanzen und Reduktion der therapie-assoziierten Nebenwirkungen**

Die Therapie des Pankreaskarzinoms erfolgt neben der chirurgischen Entfernung bisher vor allem durch die Anwendung genotoxischer Agenzien, die in Form von Chemo- oder Radiotherapeutika Tumorzellen schädigen und zerstören. So wurden zahlreiche Behandlungskonzepte für unterschiedliche Behandlungsmodalitäten - neoadjuvant, adjuvant, palliativ - entwickelt. Neben den Schwierigkeiten der Bewertung der Erfolgskriterien dieser Studien besteht nach wie vor das Problem, dass das Pankreaskarzinom relativ chemoresistent ist. Die Limitierung einer erfolgreichen Chemotherapie begründet sich vor allem durch die systemische, zytotoxische Aktivität einzelner Chemotherapeutika in steigender Dosierung sowie deren Anwendung in unterschiedlichen toxischen Kombinationen. Der Einsatz der genotoxischen Agenzien wird durch das Auftreten von Nebenwirkungen wie beispielsweise Nausea, Hyperemesis, Depression der Blutbildung, gastrointestinalen Nebenwirkungen und anderem mehr eingeschränkt. Diese genotoxischen Agenzien können daher nicht in höherer Dosierung eingesetzt werden, als die maximal tolerierbaren Nebenwirkungen es erlauben. Gerade Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sind zum Zeitpunkt des Therapiebeginns häufig bereits in einem schlechten Allgemeinzustand (erniedrigter Karnofsky-Index, Gewichtsabnahme, Schmerzen), so dass der Vorteil einer Chemotherapie durch auftretende toxische Nebeneffekte eingebüßt werden kann.

Diese Überlegungen waren Anlass der vorliegenden Untersuchungen zur Chemosensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen und zur Steigerung der Therapieeffizienz, ohne die chemotherapie-assoziierten toxischen Nebeneffekte auf normale Gewebe zu erhöhen und darüber hinaus die klinische Performance („clinical benefit response“) zu verbessern.



## **AAV-2**

Hierzu wurden im ersten Ansatz Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2) verwendet, die im Gegensatz zu den autonomen Parvoviren, sich nicht selbständig replizieren können. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Professor Schlehofer am DKFZ Heidelberg konnte in der vorliegenden Untersuchung der chemosensibilisierende Effekt von AAV-2 gegenüber Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Dies konnte erstmals in einem immunkompetenten Rattentiermodell für das Pankreaskarzinom gezeigt werden. Die intratumorale Applikation von AAV-2 und parallele, systemische 5FU-Behandlung führten zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums und einem verbesserten Überleben der Tiere. Der sensibilisierende Effekt von AAV ist dabei nicht auf bestimmte Chemotherapeutika oder Tumortypen beschränkt, sondern konnte auch gegenüber verschiedenen genotoxischen Agenzien wie UV- oder Gamma-Strahlen bzw. chemischen Substanzen nachgewiesen werden. So zeigten beispielsweise Walz et al. (1992) eine erhöhte Empfindlichkeit von HeLa-Zelltumoren gegenüber Gamma-Strahlung und Klein-Bauernschmitt et al. (1996) eine signifikante Steigerung der Effektivität verschiedener Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin, BCNU) durch AAV-2 gegenüber verschiedenen Lungen- und Bronchialkarzinomzellen. Hillgenberg et al. (1999) konnte darüber hinaus demonstrieren, dass eine AAV-2 Infektion weitgehend resistente Tumorzellen einer erneuten chemotherapeutischen Behandlung wieder zugänglich machen kann. Damit scheint die Infektion von Tumorzellen mit AAV-2 *in vitro* und *in vivo* die Empfindlichkeit dieser Tumorzellen gegenüber genotoxischen Agenzien erheblich zu steigern und somit die Wirksamkeit einer solchen Therapie durch AAV-2 signifikant zu verstärken (Schlehofer et al., 2000).

Überraschenderweise wurde in der vorliegenden Untersuchung gefunden, dass die kombinierte Applikation von genotoxischer Therapie und Infektion mit AAV-2 zu einer sehr viel mildereren Ausbildung der sonst häufigen 5FU-Chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen führt. Diese Beobachtung konnte erstmals dokumentiert und publiziert werden. Die Behandlung der Tiere erfolgte zum einen mit der

standardmäßigen 5FU-Dosis und zum anderen mit einer 10-fach höheren Hochdosischemotherapie. Zur objektivierbaren Bewertung der „clinical performance“ der Versuchstiere wurde nach den Empfehlungen der Arbeitsgruppe der LASA (Laboratory Animal Science Association) ein Scoresystem entwickelt und darüber hinaus während der Chemotherapiebehandlung Blutbildanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich nachdrücklich, dass AAV-2 infizierte Tiere die Hochdosis-Chemotherapie signifikant besser tolerierten als Tiere mit alleiniger Hochdosis-5FU-Therapie. Dies spiegelte sich in einer besseren Vigilanz, einem konstanten Gewichtsverlauf sowie stabilen hämatologischen Parametern wider. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere mit alleiniger 5FU-Hochdosistherapie eine ausgeprägte Anämie, Leukopenie, und Thrombozytopenie. Daraus resultierte für diese Versuchsgruppe ein signifikant geringeres Überleben aufgrund der Tumor- und Therapie-assoziierten Komplikationen.

Wie kann nun eine AAV Infektion die toxischen Nebeneffekte chemotherapeutischer Substanzen, wie beispielsweise 5FU reduzieren? Aufgrund unserer Untersuchungen lässt sich der molekulare Mechanismus der zugrunde liegenden Interaktion zwischen viraler Infektion und zytotoxischer Wirkung von 5FU nicht erklären. Gestützt durch Ergebnisse von Bantel-Schaal et al. (2001) wird vermutet, dass eine AAV Infektion *in vivo* Chemokin- ähnliche Faktoren freisetzt und diese wiederum Signale ersetzen, welche durch 5FU herunterreguliert sind. Gerade der Effekt auf die blutbildenden Bestandteile lässt im Gegensatz zu den bekannten depressiven Wirkungen von 5FU auf das Knochenmark einen eher stimulierenden Einfluss von AAV auf diese schnell proliferierenden Zellen mutmaßen.

AAV Parvoviren sind in der Lage die Entstehung und das Wachstum von Tumoren zu verhindern. Dies wird als onkosuppressiver Effekt bezeichnet. Ihr spezifisches Vorkommen in neoplastischen Zellen ist mit dem parvoviralen Lebenszyklus zu erklären, der von zellulären Faktoren abhängt, die offenbar besonders in Tumorzellen vorhanden sind. Diese parvovirale Eigenschaft wird als Onkotropismus beschrieben (Rommelaere et al., 1991). Der genaue Mechanismus der hier

beschriebenen Chemo- bzw. Radiosensibilisierung nach Infektion mit AAV-2 ist weiterhin unklar. Eine verstärkte Apoptoseinduktion, die Hemmung zellulärer Reparaturmechanismen und der durch die Kombination von Chemo- bzw. Radiotherapeutika und AAV-2-Infektion ausgelöste genotoxische Stress mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sind mögliche Erklärungen und Gegenstand weiterführender Untersuchungen. In unseren Experimenten zeigte sich eine maximale Sensibilisierung von verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien, wenn diese 4 Stunden vor der 5FU-Behandlung mit AAV infiziert wurden. Dies spricht für die Bedeutung der viralen Adsorption und Internalisation in die Tumorzelle. Bereits 2 Stunden nach Infektion konnte AAV im Zellkern von Tumorzellen nachgewiesen werden (Bartlett et al. 2000). Darüber hinaus ist die Expression viraler Proteine ganz entscheidend für die beschriebene chemosensibilisierende Wirkung. So sind die AAV Proteine Rep 68 und Rep 78 an der Hemmung der S-Phase durch die Akkumulation von hypophosphorylierten Retinoblastoma Protein (pRb) beteiligt (Saudan et al. 2000). Auch kann Rep78 direkt den Mechanismus der Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen bewirken (Schmidt et al. 2000). Auch Rep Protein unabhängig ist AAV in der Lage proapoptotische Mechanismen auszulösen. So konnte erst kürzlich in diesem Zusammenhang der Mechanismus zwischen dem p53 Status einer Zelle auf die Auswirkungen einer AAV-Infektion beschrieben werden. Das Tumorsuppressor-Gen p53 ist in den meisten humanen Tumoren mutiert. Trifft AAV auf eine Zelle mit p53 Mutation, wird ein Mechanismus ausgelöst, der in der Folge zur Selbstzerstörung dieser Zelle führt. Beim Kontakt mit einer gesunden Zelle hingegen wird die Zellteilung bis zum Abbau des Virus gestoppt und geht dann ohne offensichtliche Langzeitfolgen normal weiter. Da sehr viele menschliche Tumore p53-Genmutationen und somit p53-Defekte aufweisen, zeigt Wildtyp-AAV tumorizide Eigenschaften *in vivo* (Raj et al., 2001). Die Virus-DNA scheint eine beschädigte DNA nachzuahmen und so der Zelle vorzuspiegeln, dass eine Beschädigung vorhanden ist, die ihren Selbstmord notwendig macht.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Infektion von Pankreaskarzinomzellen mit AAV die lokal zytotoxische Effektivität für 5FU signifikant erhöht und gleichzeitig die Nebenwirkungen der 5FU-Behandlung auf den tumortragenden Organismus erheblich reduziert werden können. So kann durch die kombinierte Anwendung von genotoxischer Therapie und AAV- Infektion die Dauer der Applikation und die Höhe der Dosierung der genotoxischen Behandlung gesteigert werden. Diese Erkenntnisse unterstützen die neuesten Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe von Jean Rommelaere am DKFZ Heidelberg, die den Einsatz von Parvoviren, entweder als gentechnisch veränderte rekombinante Viren oder in der Kombination mit Chemotherapeutika in der zukünftigen Krebstherapie denkbar machen.

### **p53**

Maligne Tumore weisen typischerweise Störungen der Proliferations- und der Apoptosemechanismen auf. Häufig sind solche genetische Aberrationen mit einer intrinsischen Resistenz gegenüber zytotoxischen Tumortherapien verbunden. Die Analyse dieser genetischen Veränderungen ermöglicht die Identifikation von Risikopatienten mit ungenügendem Ansprechen auf Chemotherapeutika oder Bestrahlung sowie schlechter Prognose der Tumorerkrankung. Defekte in Schlüsselgenen der Apoptose, wie z.B. in p53 tragen neben ihrer zentralen Rolle in der Tumorentstehung entscheidend zur Therapieresistenz von Tumoren bei. Die Veränderungen in der Proliferationskontrolle und der Zelltodregulation können dabei nicht isoliert betrachtet werden, da die beteiligten Signalwege auf einer Vielzahl von Ebenen engmaschig miteinander verknüpft sind. Insbesondere zeigen Daten zur Pharmakogenomik maligner Tumoren, dass Defekte zentraler regulatorischer Gene, z.B. von Komponenten des p53-Signalwegs, nicht zwangsläufig in globaler Therapieresistenz resultieren, sondern durch Einsatz adäquater Therapiemodalitäten überwunden werden können.

Das p53 Tumor-Suppressorgen ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation und Apoptose und damit ein potenzieller Kandidat für die erworbene oder intrinsische Resistenz gegenüber Chemo- und/ oder Strahlentherapie. So werden Mutationen des Tumorsuppressors p53 in vielen Malignomen gefunden und zumindest in einigen Tumorentitäten mit Chemoresistenz assoziiert. Die meisten Zytostatika bewirken nicht per se eine massive Zellschädigung, sondern triggern genetische Effektorprogramme wie beispielsweise die Apoptose. Nach Exposition mit zytotoxischen Chemotherapeutika treten wahrscheinlich alle Funktionen und Wirkungen von p53 auf. Daher können zwei entgegengesetzte Bilder aufgezeigt werden, die auf molekularer Ebene nach zytotoxischer Chemotherapie in Abhängigkeit vom zellulären Umfeld entstehen. Auf der einen Seite hat p53 das Potenzial die Apoptose in Zellen zu induzieren, die empfänglich dafür sind. Auf der anderen Seite kann ein Zellzyklus-Arrest mit folgender DNA-Reparatur anstelle der Apoptose eintreten. Daraus können zwei mögliche Szenarien nach zytotoxischer Chemotherapie folgen. Zum einen kann p53 als Apoptose-Mediator die Chemosensitivität vermitteln, zum anderen kann p53 aber auch durch Induktion des Zellzyklus-Arrests eine Chemoresistenz verursachen.

So induzieren Chemotherapeutika wie Adriamycin, Etoposide und Doxorubicin einen DNA-Schaden und eine p53-abhängige Apoptose. Daher können Zellen mit p53-Mutationen und einem Wirkungsverlust von p53 eine Chemoresistenz gegen diese Substanzen aufweisen. Andere Zytostatika wie beispielsweise das DNA- vernetzende Chemotherapeutikum Cisplatin können durch mutiertes p53, das nicht mehr länger die Reparatur des medikamenteninduzierten DNA-Schadens einleiten kann, in ihrer Wirkung gesteigert werden. Gleiches gilt für die Therapie mit Paclitaxel, das Mikrotubuli stabilisiert. Im Gegensatz dazu können DNA-Synthese-Blocker wie das in unseren Experimenten verwendete 5-Fluorouracil die Apoptose über p53-abhängige Mechanismen auslösen. Daher sollte theoretisch die Wirkung von 5FU bei fehlender p53-Funktion abnehmen.

*In vitro* untersuchten wir, ob die transiente Expression von Wildtyp p53 in Pankreaskarzinomzellen mit unterschiedlichem endogenen p53 Status die Empfindlichkeit für 5FU erhöhen kann. Der p53-Gentransfer erfolgte über ein gut charakterisiertes adenovirales Vektorsystem mit ausreichend hoher Transduktionseffizienz in allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien. Wir verwendeten in unserem experimentellen Modell bewusst geringe Adp53 Virustiter und eine niedrige 5FU-Konzentration, um eher die real existierenden suboptimalen Bedingungen der klinischen Situation widerzuspiegeln. Unsere Daten zeigen, dass Zelllinien mit gestörter p53 Funktion, nach adenoviralem p53 Gentransfer eine signifikante Hemmung ihres Tumorwachstums aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt in Pankreastumorzellen mit Wildtyp p53 nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass offensichtlich nicht nur der endogene p53 Status der Zellen eine Rolle spielt, sondern auch andere Einflussgrößen wie beispielsweise die Expression von  $\beta$ -Integrinen sowie Cocksackie und Adenovirus Rezeptoren (CAR) die Gentransfereffizienz entscheidend bestimmen (Pearson et al., 1999).

Adp53 in niedriger Dosierung führte in unseren Experimenten nur zu einem geringen Anteil apoptotischer Zellen, so dass vermutlich der Hauptanteil des beobachteten wachstumshemmenden Effektes, dem Zellzyklusstillstandes am G1-S-Kontrollpunktes zugeschrieben werden muss. (Biroccio et al., 1999; Sasaki et al., 2001). Entscheidend für die weiteren Untersuchungen war es herauszufinden, ob die transgene Expression von p53 in Kombination mit 5FU-Chemotherapie, deren Wirksamkeit steigern und somit einen chemosensibilisierenden Effekt auf derart veränderte Tumorzellen aufweisen kann. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die *in vitro* Applikation von Adp53, Pankreaskarzinomzellen mit einer Alteration der p53 Funktion für die zytotoxische Wirkung von 5FU sensibilisieren kann. Dies ist in Einklang mit einer Vielzahl publizierter *in vitro* Studien, die zeigen konnten, dass der Verlust der p53 Funktion mit einer verminderten 5FU-Chemosensitivität einhergeht (Lowe et al., 1993; Bunz et al., 1999; Longley et al., 2002). Die signifikant erhöhte Apoptoserate, der so behandelten Pankreaskarzinomzellen war dabei der bestimmende Faktor der gesteigerten

antiproliferativen Wirkung der Kombinationsbehandlung. Ähnliche Ergebnisse konnten von verschiedenen Autoren nachgewiesen werden, während andere zeigten, dass hohe Level für p53 eher einen Zellzyklusarrest der Tumorzellen bewirken (Kusumoto et al., 1999; Sasaki et al., 2001). Gerade aber um diese „Resistenz“ der p53 vermittelten Apoptose zu durchbrechen, haben verschiedene Studien den erfolgreichen Einsatz von Adp53 Gentherapie mit DNA schädigenden Substanzen zeigen können (Spitz et al., 1996; Nishizaki et al., 2001). Diese synergistischen Effekte sind weniger eindeutig für die transgene p53 Überexprimierung in Zellen mit normalem Wildtyp p53. So konnte für die humane Zelllinie Capan-2<sup>p53wt</sup> ein deutlich geringerer synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden, während die Rattenpankreaskarzinomzelllinie AS<sup>p53wt</sup> überhaupt keinen antiproliferativen Effekt aufwies. Für unsere *in vivo* Experimente verwendeten wir ein syngenes Pankreaskarzinommodell mit p53 negativen DSL6A Pankreastumorzellen. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationsbehandlung von adenoviralem p53 Gentransfer und 5FU Chemotherapie initial sowohl die soliden Tumoren verkleinern kann wie auch im weiteren Behandlungsverlauf ein weiteres Tumorwachstum verhindert. Dieser antiproliferative Effekt, der substantiell mit einer gesteigerten Apoptoserate der Tumorzellen einherging, war signifikant stärker ausgeprägt als in den Tieren, welche eine Monotherapie mit 5FU oder Adp53 erhielten. Dennoch war diese Behandlungsstrategie nicht in der Lage die Tumoren vollständig zu eliminieren. Die Ursachen liegen zum einen in dem der klinischen Situation ähnlich gewählten Modell mit gut etablierten Pankreastumoren vor Behandlungsbeginn und zum anderen durch die eher niedrig gewählten Dosen für Adp53 und 5FU. So zeigte sich in Vergleichsstudien mit AdLacZ, dass nur ca. 5-15% der Tumorzellen mit diesem Ansatz erfolgreich mit dem Zielgen transduziert werden können.

Kontrovers wird über die Frage diskutiert, ob der p53 Status maligner Tumoren über die Responsivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika gewertet werden kann. Die vorliegenden Daten zum p53 Tumorsuppressorgen als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf

eine DNA-schädigende Chemotherapie beim Pankreaskarzinom sind widersprüchlich. Je nach Studie fördern oder schwächen p53- Mutationen die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Medikamenten. Allerdings basierte der Nachweis der p53-Akkumulation in der Mehrzahl der Studien auf immunhistochemischen Untersuchungen. Diese Methode ist jedoch der wiederum weit aufwendigeren Methode der p53-Gen-Sequenzierung unterlegen, da nur 75 % der Mutationen erfasst werden. Hinzu kommt, dass p53-Aktivitäten auch durch Störung anderer Moleküle im p53-Signalweg verändert werden können, wie z. B. durch Mutation einer der p53 phosphorylierenden Kinasen. Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass der p53-Status eines malignen Tumors nicht als der alleinige Indikator für Prognose und Therapieansprechen gewertet werden kann, und Chemotherapiesensitivität und -resistenz auf der Grundlage der Interaktion der p53-Familienmitglieder neu definiert werden müssen. Es gibt zahlreiche molekulare Faktoren, die zur „Response-Prädiktion“ in der (neo-)adjuvanten Therapie von Pankreaskarzinomen in Zukunft eingesetzt werden können. Dabei wurden neben dem Tumorsuppressor-gen p53 weitere mögliche prädiktive und prognostische Marker aus unterschiedlichen zellulären Prozessen beschrieben: die Zellzyklus-regulierenden Proteine p21 und p27, der Proliferationsmarker Ki-67, der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor, HER2/neu, angiogentische Faktoren (VEGF, Cox-2, TP), Faktoren involviert in den Platin-Stoffwechsel (ERCC1), Faktoren involviert in den 5FU-Stoffwechsel (TS, DPD) oder andere genetische Phänomene, wie „loss of heterozygosity“ (LOH) oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Mit Hilfe der molekularen Tumoranalyse könnten jene zusätzlichen Informationen über das biologische Verhalten von Pankreaskarzinomen gewonnen werden, die nötig sind, um ein auf den Patienten maßgeschneidertes therapeutisches Konzept zu ermöglichen. Ein Ziel der experimentellen Forschung sollte es daher sein, die weitere Entwicklung krankheitsrelevanter und genetisch manipulierbarer Tiermodelle als Testsystem zu etablieren, um Chemo-Response-Programme *in vivo* zu untersuchen und relevante Targetstrukturen für neue Therapiestrategien zu identifizieren.



## **7.2 Aktivierung des Immunsystems und Steigerung der Tumorimmunogenität**

Die immuntherapeutische Behandlung von Tumoren steht immer noch an ihren Anfängen, obwohl das Konzept bereits seit nahezu 100 Jahren verfolgt wird. Fortschritte in der Tumorimmunologie und Molekularbiologie haben in den letzten Jahren ein besseres Verständnis für die komplexe Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzelle ermöglicht und neue Reagenzien wie z.B. rekombinant hergestellte Antikörper für den Einsatz in der Tumorthherapie hervorgebracht. Die Entdeckung zahlreicher neuer menschlicher Tumorantigene sowie neue Erkenntnisse über den Prozess der Antigenaufnahme und -präsentation haben zu einer Renaissance unterschiedlicher Vakzinierungsstrategien geführt, deren therapeutischer Stellenwert aber bisher noch unklar ist (Rammensee et al., 2002; Muehlbauer et al., 2003; Wang et al., 2005). Gemeinsam ist allen Ansätzen, Krebszellen gezielt zu zerstören und körpereigene gesunde Zellen nicht zu beeinflussen. Eine so hervorgerufene Immunreaktion könnte dann idealerweise nicht nur den primären Tumor attackieren, sondern bereits disseminierte residuale Tumorzellen eliminieren und präventiv die Entstehung maligner Tumoren verhindern. Das Problem der spezifischen Tumorkvakzinierung ist, dass diese meist tumor-assoziierten Antigene nur eine schwache Immunantwort hervorrufen. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass Tumorantigene selten so genannte Neoantigene darstellen, sondern zumeist physiologisch vorkommende, das heißt auch auf normalen Zellen exprimierte Antigene sind. Um gegen solche Antigene eine suffiziente Immunantwort zu induzieren, muss die vorhandene immunologische Toleranzschwelle durchbrochen werden. Da humorale oder zelluläre Immunreaktionen in Krebspatienten offenbar nicht ausreichen um das Tumorstwachstum zu verhindern, müssen neue Immunstrategien entwickelt werden mit dem Ziel der Aufhebung dieser natürlichen oder auch tumorinduzierten künstlichen Toleranz. Im Folgenden werden zwei Strategien zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems und Steigerung der Tumorimmunogenität durch Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) und AdCD-Gentherapie diskutiert.

## **AAV**

Die bisherigen Erkenntnisse zu den tumorsuppressiven Eigenschaften von AAV waren Anlass weiterführende immunologisch basierte antitumorale Effekte in unserem immunkompetenten Rattenmodell für das Pankreaskarzinom zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die nicht humanpathogenen Parvoviren, AAV-2, einen systemischen Stimulus für das Immunsystem darstellen und eine Immunantwort gegen syngene DSL6A Pankreastumorzellen in Lewis Ratten bewirken können. Dies konnte nicht nur in tumortragenden Tieren gezeigt werden, sondern diese Tiere konnten in Kombination mit einer chirurgischen vollständigen Tumorentfernung vor einem erneuten Tumorwachstum geschützt werden. Dieser tumorprotektive Effekt konnte interessanterweise unabhängig von dem Applikationsort der AAV-2 Partikel, intratumoral oder intraperitoneal, beobachtet werden.

AAV-2 wirken genotoxisch und antikarzinogen in Verbindung mit genotoxischem Stress auf infizierte Zellen. Neben anderen Faktoren kommt dabei dem AAV spezifischen Rep-Genen besondere Bedeutung zu. Allerdings kann der hier nachgewiesene immunologische Effekt von AAV-2 nicht durch diese vorwiegend tumorsuppressiven Charakteristika erklärt werden. Die Tumorprotektion AAV-2 infizierter, initial tumortragender Tiere gegen eine erneute Tumorzellinokkulation resultiert offensichtlich aus einer AAV-2 getriggerten Induktion einer potenten Immunantwort gegen DSL6A-Pankreastumorzellen. Diese neuen Erkenntnisse für AAV-2 werden unterstützt durch eine Vielzahl anderer experimenteller und klinischer Experimente.

Bereits um 1890 hat der New Yorker Chirurg William Coley erkannt, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumoren erfolgreich zu bekämpfen. Er beobachtete, dass Tumoren von Patienten nach einer bakteriellen Infektion sich zurückbildeten. Der Mechanismus dieser Beobachtung war unklar, obwohl auch damals schon bekannt war, dass eine bakterielle Infektion das Immunsystem stimulieren kann. Coley's Arbeiten waren ein Meilenstein auf dem Gebiet der Tumorimmunologie (Wiemann et al.,

1994). Die Eigenschaft, dass viele bakterielle und virale Infektionen oft eine starke Immunantwort auslösen wurde bisher für verschiedene innovative immuntherapeutische Ansätze genutzt. Besonders hervorzuheben sind CpG-Oligonukleotide als Vakzine bzw. als Adjuvans (Garbi et al., 2004). In neueren experimentellen Studien konnte beispielsweise für die bakteriolytische Therapie mit dem anaeroben Bakterium *Clostridium novyi-NT* die Generierung einer potenten Immunantwort zur Abstoßung von Tumorzellen beschrieben werden (Dang et al., 2001; Agrawal et al., 2004). Für das Influenza A Virus konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von humanen peripheren Makrophagen zu einer Erhöhung der INF $\alpha$ / $\beta$  und IL18 Level führt und synergistisch die INF $\gamma$  Genexpression in humanen T-Zellen steigert (Sareneva et al., 1998). Aktuelle Arbeiten zu Verwendung von onkolytischen Viren als antitumorale Agenzien, zeigten, dass diese nicht nur Tumorzellen *in vitro* zerstören, sondern auch eine spezifische Immunantwort *in vivo* gegen Tumorzellen auslösen (Thorne et al., 2004). Interessanterweise wurden diese Effekte für die zur Gruppe der autonomen Parvoviren gehörenden H-1 Virus und das eng verwandte Minute Virus of Mice (MVM) kürzlich nachgewiesen. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung von Tumorzellen durch diese onkolytischen Viren direkt zu einer Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen und zytotoxischen T-zellen führt (Malerba et al., 2003; Moehler et al. 2004).

In unseren Experimenten konnten wir demonstrieren, dass AAV-2 einen spezifisch antitumoralen Effekt auslösen kann. Dies zeigte sich durch die starke *in vivo* Infiltration von CD8+ Lymphozyten in primäre Tumoren sowie der Induktion einer spezifischen Lyse von DSL6A Pankreastumorzellen in den durchgeführten *in vitro* Zytotoxizitätstests. In vielen Studien konnte die Notwendigkeit der Aktivierung immunkompetenter Zellen, wie beispielsweise der Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten innerhalb des Tumors selbst zur Generierung einer erfolgreichen Immunantwort nachgewiesen werden (Carlos et al., 2001). Allerdings weisen Tumorgewebe nicht selten eine

starke Infiltration von Lymphozyten auf, unter denen beispielsweise Tumor-spezifische T-Zellen identifiziert werden konnten. Aber diese Lymphozyten scheinen im Tumorgewebe meist inaktiv zu sein, da sie das Wachstum des Tumors *in vivo* nicht verhindern können. Die Erkennung und Bekämpfung der Ursachen für diese funktionelle Inaktivität der Lymphozyten könnte zu einer Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze führen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen innerhalb der infiltrierenden Lymphozyten einen substantiellen Anteil ausmachen und offenbar zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen. Zielzellen der NK-Zellen sind vor allem virusinfizierte Zellen und Tumorzellen, die durch Veränderungen an der Zelloberfläche, speziell dem Verlust oder der Modifikation von MHC-I-Molekülen, als Target erkannt werden. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind NK-Zellen in der Lage, ohne vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung ihre Zielzellen zu erkennen. Diese Fähigkeit der schnellen und effektiven Immunreaktion auf Tumorzellen machen NK-Zellen auch zu einem wichtigen Instrument in der experimentellen Tumorthherapie und einem Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Palucka et al., 1999; Watzl et al., 2000; Kawai et al., 2006). Möglicherweise hat gerade in unserem Tiermodell die lokal unspezifische Aktivierung von Immunzellen durch die Applikation von AAV-2 in einem zweiten Schritt durch das „Tumormilieu“ tumorspezifische T-Zellen aktivieren können. Das Problem der Toleranzinduktion durch den Tumor als Ausdruck der ungenügenden Aktivierung und Anergie der T-Zellen könnte so zukünftig überwunden werden.

Interessanterweise bewirkte die Infektion mit AAV-2 nicht nur einen lokal auf den Tumor beschränkten Effekt, sondern führte als systemische Wirkung zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl von Neutrophilen und Monozyten im Blut der Tiere sowie einer deutlichen Erhöhung der Zytokine MCP-1 und IL-10. Dabei wirken MCP-1 proinflammatorisch und im Gegensatz IL-10 antiinflammatorisch. MCP-1 gehört zur Gruppe der Chemokine, die die Migration und Aktivierung von Leukozyten regulieren.

Damit spielen sie eine zentrale Rolle in Prozessen der Immunantwort, Angiogenese, entzündlichen Reaktionen und Hämatopoese. Chemokine interagieren über spezifische Rezeptoren (CCR, CXCR) (Premack et al., 1996; Schweickart et al., 2001; Hokeness et al., 2005). Diese Rezeptoren können mehrere Liganden binden und umgekehrt kann ein Chemokin mit verschiedenen Rezeptoren interagieren. MCP-1 besitzt eine hohe Affinität zu den Rezeptoren CCR1-3 und CCR5, die von Monozyten, T-Zellen, Natürlichen Killer (NK)-Zellen, Granulozyten sowie Dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass MCP-1 bevorzugt über CCR2 mit Monozyten interagiert. Die Ergebnisse in unserem Tiermodell verdeutlichen, dass MCP-1 eine Chemotaxis monozytärer Zellen, aktivierter NK-Zellen, sowie von CD4 und CD8- T-Zellen bewirkt. Inwieweit die signifikante Erhöhung von MCP-1 zu einer Aktivierung der unterschiedlichen Immunzellen geführt hat, wurde von uns nicht detailliert untersucht. Im Ergebnis zeigte sich jedoch, dass die Aktivität der immunkompetenten Effektorzellen in unserem immunogenen DSL6A-Pankreastumormodell in immunkompetenten Ratten zur Abstoßung der Pankreastumoren und zu einer tumorspezifischen erworbenen Immunität führte. Im Gegensatz dazu wird die Erhöhung von IL-10 als Gegenregulation auf die AAV-2 Infektion der immunkompetenten Tiere gewertet. Inwieweit AAV-2 selbst über Chemokin-Homologe verfügen, die antagonistisch zelluläre Rezeptoren besetzen und so die Signaltransduktion inhibieren ist bisher nicht bekannt (Asadullah et al., 2003).

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass AAV-2 als unspezifisches Adjuvans einen immunogenen Stimulus für das gesamte Immunsystem darstellt. Im Rahmen der viralen Infektion erfolgt eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems, besonders von Monozyten, Neutrophilen und NK-Zellen sowie vermutlich dendritischer Zellen. Dendritische Zellen wiederum sind entscheidend beteiligt an der Induktion einer T-Zellantwort und spielen damit eine zentrale Rolle bei der Vermittlung zwischen dem angeborenen unspezifischen und dem erworbenen antigenspezifischen Immunsystem. Durch die direkte

Tumorzellinfektion bzw. den Tumorzelltropismus für AAV-2 werden offenbar proinflammatorische Zytokine, besonders MCP-1, vermehrt synthetisiert und das lokale Tumormilieu entscheidend beeinflusst. Daraus resultiert eine signifikante Steigerung der Anzahl und Aktivität tumorinfiltrierender Immunzellen, besonders CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> - T-Zellen sowie NK-Zellen. Offenbar führt die AAV-2 Infektion in unserem Tumormodell nicht nur zu einer Aktivierung immunologischer Effektorzellen, sondern auch zu einer Durchbrechung der Tumorimmuntoleranz. Diese Toleranz des Immunsystems gegenüber Tumoren wird als Hauptursache des Versagens vieler bisheriger immuntherapeutischer Strategien angesehen. Auch wenn die in unseren Experimenten beobachtete spezifische Immunantwort nicht ausreichend war, einen soliden gut etablierten Tumor primär zu zerstören, so konnten wir einen signifikanten tumorprotektiven Effekt in den Rechallenge-Versuchen nachweisen. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen daher multimodale Therapiekonzepte, in denen versucht wird, die Immuntherapie als adjuvante Therapie nach R0-Resektion bzw. bei Patienten mit „minimal residual disease“ von prognostisch ungünstigen Tumoren zu etablieren.

### **AdCD**

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, den propagierten immunologisch basierten Bystandereffekt einer AdCD/FC Prodrugtherapie in unserem syngenem Pankreastumormodell immunkompetenter Ratten zu evaluieren. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Transfektion von meist schwach immunogenen Tumorzellen mit dem CD-Suizidgen zu einer Immunantwort führt. An dieser antitumoralen Reaktion sind dabei sowohl humorale als auch zelluläre immunologische Komponenten beteiligt (Freeman et al., 1997; Ramesh et al., 1998). So konnte im Tierversuch demonstriert werden, dass Tumorzellen, welche stabil mit dem CD-Gen transfiziert wurden, ein vermindertes Proliferationsverhalten gegenüber der parental Zelle aufwies. Die erneute Inokulation mit modifizierten CD-Tumorzellen führte zu einer Abstoßung der CD-

exprimierenden Zellen. Bei Tieren, die eine weitere Inokulation mit der parentalen Tumorzelllinie erhielten, wurde auch diese abgestoßen. Es konnte dabei eine Antikörperreaktion sowohl gegen das CD-Protein als auch gegen tumorassoziierte Antigene nachgewiesen werden. Zytotoxizitätstest belegten, dass Lymphozyten dieser Ratten spezifisch Tumorzellen lysieren konnten (Mullen et al., 1994; Consalvo et al., 1995; Haack et al., 2000). Es wurde daher angenommen, dass die erfolgreiche Elimination CD-positiver Tumorzellen *in vivo* zu einer effektiven Antigenpräsentation bzw. Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen führt und das CD-Protein selbst als Superantigen wirkt (Pope et al., 1997; Paillard, 1997; Kuriyama et al., 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse, war es daher unser Ziel, den immunologisch basierten Bystandereffekt in einem experimentellen Tumormodell zu untersuchen, welches die klinische Situation möglichst nah widerspiegelt.

Die Ergebnisse unserer Arbeit konnten diese postulierten immunologischen, antitumoralen Effekte nicht bestätigen. Vielmehr zeigte sich in unserem Tiermodell, dass die AdCD/FC Therapie zwar zu einer zeitlich limitierten Tumorstadiumskontrolle führt, jedoch im Langzeitverlauf die Tumorprogression nicht verhindert und keine spezifische Immunantwort generieren kann, die in der Lage wäre, erneut inokulierte Tumorzellen in den Rechallenge-Experimenten effizient abzustoßen. Für das Versagen der Therapie in unserem Tiermodell können eine Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren verantwortlich gemacht werden. Im Gegensatz zu vielen bisher publizierten experimentellen Studien erfolgte die gentherapeutische Behandlung erst 6 Wochen nach Tumordinokulation und über einen sehr langen Behandlungszeitraum. Dies erlaubte zum einen, dass die Tiere einen gut etablierten soliden Pankreastumor entwickeln konnten und zum anderen eine eher realistische Aussage über die Wirksamkeit der Therapie mit einem Beobachtungszeitraum von insgesamt 14 Wochen. Während in den ersten 4 Wochen nach Therapiebeginn eine lokale Kontrolle des Tumorstadiums erreicht werden konnte, war dieser Effekt im weiteren

Behandlungsverlauf nicht mehr nachweisbar und die inokulierten Tumoren entwickelten sich ungebremst, vergleichbar den Tumoren der Kontrolltiere.

Wesentlich für den Erfolg einer Suizidgentherapie sind neben dem verwendeten Vektordesign, die Applikationsart, die katalytische Enzymaktivität, die Auswahl des Gewebetyps und des Tiermodells. Zusätzlich wird die Transduktionseffizienz und Dauer der Transgenexpression durch immunologische Faktoren der humoralen und zellulären Immunantwort beeinflusst (Harvey et al., 1999; Molinier-Frenkel et al., 2000; Niculescu-Duvaz et al., 2005). Das Suizidgen kann auf verschiedenen Wegen in die Tumorzellen transduziert werden, wobei sich die direkte intratumorale Applikation, als die effektivste Art herausgestellt hat (Maron et al., 2001). Dieses Vorgehen muss allerdings unter onkologisch-klinischen Gesichtspunkten als problematisch gewertet werden. Daher wurden neuere Vektoren entwickelt mit speziellen Promotoren, die lediglich in bestimmten Zelltypen oder Geweben aktiv sind, und damit die Selektivität verbessern. Mit Hilfe dieser Zelltyp-spezifischen Promotoren und durch spezielle Applikationstechniken, z.B. Dispatchkatheter, lässt sich zukünftig eine erhöhte Sicherheit schaffen, ohne auf die gewünschte Therapieeffizienz verzichten zu müssen.

Bei den vielen beschriebenen *in vivo* Suizidgen-Therapien handelt es sich meist um Idealsysteme, bei denen alle Tumorzellen Suizidgene enthalten. Aktuell ist es aber nicht möglich, mehr als 1 bis 10% des vorhandenen Tumolvolumens mit Suizidgenen zu transduzieren. Der lokale Bystander-Effekt ist daher unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Suizidgen-Therapie. Er bewirkt, dass genetisch modifizierte Zellen in Gegenwart von Pro-Drugs einen toxischen Effekt auf nicht Suizidgen-tragende Zellen ausüben. Dieser Bystander-Effekt ist ein wichtiger Verstärkungsfaktor in vielen Suizidgen/ Pro-Drug Systemen und kann zwischen den einzelnen Zelllinien und Systemen erheblich variieren. Er kann zum einen nicht vorhanden sein oder aber so stark sein, dass innerhalb des Tumors nur 1 bis 5% der Zellen Suizidgene enthalten müssen, um alle Zellen zu töten und eine vollständige Regression und Heilung der tumortragenden Tiere zu erzielen (Huber et al., 1993). Ein



weiterer wichtiger Faktor ist die katalytische Aktivität des Enzyms, die einen bestimmten Schwellenwert erreichen muss, um das Pro-Drug aktivieren zu können. Wir verwendeten daher ein CD/5FC Behandlungsprotokoll, ähnlich dem der zuvor beschriebenen Experimenten, die eine ausreichende Cytosin Deaminase Expression dokumentierten und *in vitro* sowie *in vivo* eine signifikante Elimination CD-modifizierter Tumorzellen nach 5FC Gabe aufwiesen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die AdCD/FC Therapie *in vitro* signifikant die Tumorzelleliminierung durch die Induktion von Apoptose CD-positiver und CD-negativer Pankreastumorzellen auslösen kann. Im Gegensatz dazu demonstrierten unsere *in vivo* Experimente, dass diese AdCD/FC Therapie nur eine zeitlich limitierte Tumorstillstandskontrolle erlaubt. Trotz den experimentell eher günstigen Behandlungsbedingungen gelingt es offenbar einzelnen Tumorzellsubpopulationen sich der zytotoxischen Wirkung von 5FU zu entziehen und ein erneutes aggressives Tumorstillstand aufzuweisen. Dies spiegelt sehr gut die Situation in der Behandlung des Pankreaskarzinoms wider.

Die Expression viraler Proteine oder des Transgens in transduzierten Zellen stimulieren eine Immunantwort des Wirtes, die in der Folge zu einem Verlust der Wirksamkeit adenoviraler Vektoren und zu Entzündungsreaktionen führt (Engelhardt et al., 1994; Song et al., 1997). Humorale Immunantworten auf applizierte adenovirale Vektoren können so die therapeutische Wirksamkeit des Ansatzes durch die Ausbildung neutralisierender Antikörper gegen das Virus deutlich reduzieren, vor allem bei repetitiver Gabe (Kaplan, 2005). Umgekehrt wird ein immunologisch basierter Bystander Effekt postuliert, der durch immunkompetente Effektorzellen die antitumoralen Effekte der Pro-Drug Therapie verstärkt und nach vollständiger Tumoreradikation ein erneutes Tumorstillstand verhindern kann (Fearon et al, 1988; Nabel et al., 1994). Die Erfolgsrate von Tieren, die so vor einem erneuten Tumorstillstand nach Tumorzellinokulation mit der nicht Gen modifizierten parentalen Zelllinie geschützt werden konnte, variierte in verschiedenen Tiermodellen

zwischen 37% und 100%. Tierexperimentelle Untersuchungen von FC behandelten Tumoren zeigten eine inflammatorische Infiltration hauptsächlich von CD8+ T-Zellen und Makrophagen (Consalvo et al., 1995; Kuriyama et al., 1999). Tiere, die die Fähigkeit zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses besitzen, zeigten darüber hinaus eine signifikant erhöhte intratumorale Anzahl von CD4+ T-Lymphozyten. Andere Untersuchungen an immundefizienten Mausstämmen, die keine T- und B-Zellen, jedoch noch NK-Zellen besitzen, legten die Vermutung nahe, dass der primäre Mediator der Immunantwort NK-Zellen sind (Budzynski et al., 1994). Entscheidend für die Generierung einer suffizienten Immunantwort scheint dabei die lokale Entzündungsreaktion des Tumors durch die Applikation des adenoviralen Vektors zu sein. So konnte in vielen Arbeiten nachgewiesen werden, dass bösartige Tumoren um sich herum ein Milieu entwickeln, das den Immunzellen den Zugang verwehrt. Durch die Auslösung einer Entzündungsreaktion im Tumor selbst, können diese Bedingungen jedoch so verändert werden, dass immunkompetente Effektorzellen einwandern und Tumorzellen zerstören können. Ein wesentlicher Grund für den Erfolg ist offenbar die entzündungsbedingte Wirkung auf die Gefäßneubildung und die damit verbundene Öffnung der Blutwege für Immunzellen (Ganss, 2006)

In unserem syngenem Pankreastumormodell immunkompetenter Ratten zeigte sich, dass die postulierte Immunantwort weder ausreichte, um vorhandene, schnell wachsende Tumoren zu eliminieren, noch ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, um ein Wiederauftreten der DSL6A Pankreastumoren zu verhindern. Die durchgeführten Zytotoxizitätstests demonstrierten die fehlende Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Lediglich eine geringe Aktivität für NK-Zellen konnte nachgewiesen werden. Bestätigt wurden diese Daten durch unsere immunhistochemischen Analysen der Tumoren, die keine wesentliche inflammatorische Reaktion aufwiesen, insbesondere ließen sich keine CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten nachweisen. Nur wenige NK-Zellen ließen sich in einigen Tumorschnitten detektieren. Aufgrund der Tatsache, dass DSL6A Pankreaskarzinomzellen MHC-I Moleküle auf der

Zelloberfläche exprimieren, bleibt zu vermuten, dass keine ausreichend potenten Epitope des CD Proteins im Kontext mit den MHC-I Molekülen in Lewis Ratten präsentiert werden konnten. Ein weiterer Aspekt der fehlenden suffizienten Immunantwort ist die Tatsache, dass durch die Umwandlung von 5FC in den toxischen Metaboliten 5FU ein eher immunsuppressives Milieu erzeugt wurde. Die ebenfalls fehlende Aktivierung von CD4+ T-Zellen durch andere proinflammatorische Zellen und Signale in unseren Experimenten, muss als wichtige Ursache für das Versagen des Schutzes der Tiere vor einem erneuten Tumorwachstum in den Rechallenge-Experimenten mit der parentalen DSL6A Pankreas-karzinomzelllinie gewertet werden.

Auch wenn unsere tierexperimentellen Daten einen immunologisch basierten Bystander Effekt nicht dokumentieren konnten, so sollte es zukünftig möglich sein, die therapeutische Effizienz des CD/FC Systems durch die kombinierte Therapie mit proinflammatorischen Substanzen, z.B. Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktor, Interferon Gamma, Interleukin 2 und Interleukin 6 signifikant zu verbessern, die eine Th1-Immunantwort hervorrufen. Die genetische Modifikation von Tumorzellen zur Steigerung der Immunogenität von schwach immunogenen Tumorzellen bleibt ein interessanter immuntherapeutischer Ansatz, obgleich Ergebnisse dieser ungerichteten Immuntherapien nur in einzelnen Tiermodellen nennenswerte Erfolge zeigten. Unabhängig vom gewählten immuntherapeutischen Ansatz zeigen diese und andere Daten klar, dass durch eine chirurgische Therapie zunächst die Tumorlast soweit reduziert werden muss, dass eine Immuntherapie Erfolg versprechend sein kann. Zukünftige Immuntherapien sollten daher im Rahmen einer multimodalen Therapie bei Patienten mit "minimal residual disease" erfolgen.

## **8. Verzeichnis der zitierten Literatur**

**Agrawal N**, Bettgowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi Met al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:15172-15177.

**Amalfitano A**, Hauser MA, Hu H, Serra D, Begy CR, Chamberlain JS. Production and characterization of improved vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol*. 1998 72: 926-933.

**Andersen L**, Kilstrup M, Neuhard J. Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in *Escherichia coli* K12. Involvement of the *glnG* and *purR* genes in the regulation of *codA* expression. *Arch Microbiol*. 1989; 152, 115-118.

**Asadullah K**, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*. 2003; 55:241-269.

**Austin EA**, Huber BE. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *E. coli* cytosine deaminase. *Mol Pharm*. 1993; 43, 380-387.

**Bantel-Schaal U**. Integration of adeno-associated virus 2 DNA in human MKR melanoma cells induces a peptide with oncosuppressive properties. *Int J Cancer*. 2001; 92:537-44.

**Bartlett JS**, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*. 2000; 74:2777-85.

**Beger HG**, Poch B, Schwarz M, Gansauge F. Pankreaskarzinom: Stellenwert der neoadjuvanten Therapie. *Chirurg*. 2003; 74:202-207.

**Biroccio A**, Bufalo DD, Ricca A, D'Angelo C, D'Orazi G, Sacchi A, Soddu S, Zupi G. Increase of BCNU sensitivity by wt-p53 gene therapy in glioblastoma lines depends on the administration schedule. *Gene Ther*. 1999; 6: 1064-1072.

**Blattman JN**, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*. 2004; 305: 200-205.

**Bramson JL**, Graham FL, Gaudie J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol*. 1995; 6 (5), 590-595.

**Budzynski W**, Radzikowski C. Cytotoxic cells in immunodeficient athymic mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1994; 16:319-46

**Bunz F**, Hwang PM, Torraine C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999; 104: 263-269.

**Carlos TM**. Leukocyte recruitment at sites of tumor: dissonant orchestration. *J Leukoc Biol*. 2001; 70:171-184.

**Consalvo M**, Mullen CA, Modesti A, Musiani P, Allione A, Cavallo F, Giovarelli M, Forni G. 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J Immunol*. 1995; 154: 5302-5312.

**Dang LH**, Bettgowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:15155-60.

**Daniel PT**, Sturm I, Hemmati PG, Güner D. Pharmakogenomik maligner Tumoren. *Onkologe*. 2004; 10:46-54.

**Dilber MS**, Smith CI. Suicides genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther*. 1997; 4: 273-274.

**Engelhardt JF**, Ye X, Doranz B, Wilson JM. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:6196-200.

**Espinoza-Delgado I**. Cancer vaccines. *Oncologist*. 2002; 7:20-33.

**Evoy D**, Hirschowitz EA, Naama HA, Li XK, Crystal RG, Daly JM, Liebermann MD. In vivo adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *J Surg Res*. 1997; 69: 226-231.

**Fearon ER**, Itaya T, Hunt B, Vogelstein B, Frost P: Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene. *Cancer Res*. 1988; 48:2975-2980.

**Förstermann U**. Gentherapie- Erste Erfolge - viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2003; 100:314-318.

**Freeman SM**, Ramesh R, Marrogi AJ. Immune system in suicide-gene therapy. *Lancet*. 1997; 349:2-3.

**Gagandeep S**, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ, Kinsella AR. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther*. 1996; 3:83-8.

**Ganss R**. Tumor stroma fosters neovascularization by recruitment of progenitor cells into the tumorbed. *J Cell Mol Med*. 2006; 10:857-65.

**Garbi N**, Arnold B, Gordon S, Hammerling GJ, Ganss R. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol*. 2004; 172:5861-5869.

**Ge K**, Xu L, Zheng Z, Xu D, Sun L, Liu X. Transduction of cytosine deaminase makes rat glioma cells highly sensitive to 5-fluorocytosine. *Int J Cancer*. 1997; 71; 675-679.

**Georg-Fries B**, Biederlack S, Wolf J, zur Hausen H. Analysis of proteins, helper dependence and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology*. 1984; 134, 64-71.

**Gilboa E**. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999; 11: 263-270.

**Gomez-Manzanao C**, Feuyo J, Kyritsis AP, Steck PA, Roth JA, McDonnell TJ, Steck KD, Levin VA, Yung WK. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res*. 1996; 56; 694-699.

**Haack K**, Linnebacher M, Eisold S, Zoller M, von Knebel Doeberitz M, Gebert J. Induction of protective immunity against syngeneic rat cancer cells by expression of the cytosine deaminase suicide gene. *Cancer Gene Ther*. 2000; 7:1357-64.

**Hahn St**, Kern SE, Schmiegel WH. Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus der Pankreaskarzinomforschung. *Deutsches Ärzteblatt*. 1997; 94:3342-3350.

**Harris MP**, Sutjipto S, Wills KN, Hancock W, Cornell D, Johnson DE, Gregory RJ, Shepard HM, Maneval DC. Adenovirus-mediated p53 gene transfer inhibits growth of human tumor cells expressing mutant p53 protein. *Cancer Gene Ther*. 1996; 3: 121-130.

**Harvey BG**, Hackett NR, El-Sawy T, Rosengart TK, Hirschowitz EA, Lieberman MD, Lesser ML, Crystal RG. Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol.* 1999; 73:6729-42.

**Heinemann V.** Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol.* 2002; 29:23-31.

**Hiddemann W**, Heinemann V. Current progress in therapy of malignant diseases. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005; 130:1837-40.

**Hillgenberg M**, Schlehofer JR, von Knebel Doeberitz M, Klein-Bauernschmitt P. Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2. *Eur J Cancer.* 1999; 35: 106-110.

**Hirschowitz EA**, Ohwada A, Pascal WR, Russi TJ, Crystal R. In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumor induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. *Human Gene Ther.* 1995; 6: 1055-1063.

**Hokeness KL**, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol.* 2005; 174:1549-1556.

**Huber BE**, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.* 1993; 53: 4619-4626.

**Huber BE**, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 8302-8306.

**Kaplan JM.** Adenovirus-based cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2005; 5:595-605.

**Kawai T**, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 2006; 7:131-7.

**Kievit E**, Bershady E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* 1999; 59: 1417-1421.

**Klein-Bauernschmitt P**, von Knebel Doeberitz M, Ehrbar M, Geletneky K, Kleinschmidt J, Schlehofer JR. Infection with Adeno-associated virus type 2 renders human tumor cells more sensitive to chemotherapy. *Eur J Cancer.* 1996; 32: 1774-1780.

**Klein-Bauernschmitt P**, zur Hausen H, Schlehofer JR. Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type 2. *J Virol.* 1992; 66: 4191-4200.

**Klempa I.** Pankreaskarzinom - Was ist resektabel? *CHAZ.* 2004; 11:447-452.

**Kotin RM**, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 2211-2215.

**Kuriyama S**, Kikukawa M, Masui K, Okuda H, Nakatani T, Sakamoto T, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int J Cancer.* 1999; 81: 592-597.

**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.* 1999; 5: 2140-2147.

**Li Z**, Shanmugam N, Katayose D, Huber B, Srivastava S, Kenneth C, Seth P. Enzyme/prodrug gene therapy approach for breast cancer using a recombinant adenovirus expressing Escherische coli cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther.* 1997; 2: 113-117.

**Longley DB**, Boyer J, Allen WL, Latif T, Ferguson PR, Maxwell PJ, McDermott U, Lynch M, Harkin DP, Johnston PG. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Res.* 2002; 62: 2644-2649.

**Low SW**, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993; 74: 957-967.

**Malerba M**, Daeffler L, Rommelaere J, Iggo RD. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol.* 2003; 77:6683-6691.

**Maron DJ**, Choi EA, Spitz FR. Gene therapy of metastatic disease: progress and prospects. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001; 10:449-60.

**Moehler MH**, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, Rommelaere J, Galle PR, Heike M. Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther.* 2005; 16:996-1005.

**Molinier-Frenkel V**, Gahery-Segard H, Mehtali M, Le Boulaire C, Ribault S, Boulanger P, Tursz T, Guillet JG, Farace F. Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 2000; 74:7678-82.

**Moolten FL**. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 1994; 1: 279-287.

**Muehlbauer PM**, Schwartzentruber DJ. Cancer vaccines. *Semin Oncol Nurs.* 2003; 19: 206-216.

**Mullen CA**, Coale MM, Lowe R, Blease RM. Tumors expressing the cytosine deaminase suicidal gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res.* 1994; 54: 1503-1506.

**Mullen CA**, Kilstrup M, Blease RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: A negative selection system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 33-37.

**Mullen CA**. Metabolic suicides genes in gene therapy. *Pharmacol Ther.* 1994; 63: 199-207.

**Nabel GJ**, Chang AE, Nabel EG, Plautz GE, Ensminger W, Fox BA, Felgner P, Shu S, Cho K. Immunotherapy for cancer by direct gene transfer into tumors. *Hum Gene Ther.* 1994; 5:57-77.

**Neoptolemos JP**, Raraty MG, Ghaneh P, Hickey H, Stocken DD, Dunn JA, Friess H, Buchler MW. Adjuvante und additive Therapie beim Pankreaskarzinom. *Chirurg.* 2003;74:191-201.

**Nguyen DM**, Spitz FR, Yen N, Cristiano RJ, Roth JA. Gene therapy for lung cancer: enhancement of tumor suppression by a combination of sequential systemic cisplatin and adenovirus-mediated p53 gene transfer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112: 1372-1377.

**Niculescu-Duvaz I**, Springer CJ: Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol.* 2005; 30:71-88.

**Nielsen LL**, Dell J, Maxwell E, Armstrong L, Maneval D, Catino JJ. Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. *Cancer Gene Ther.* 1997; 4: 129-138.

**Nishizaki M**, Meyn RE, Levy LB, Atkinson EN, White RA, Roth JA, Ji L. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 2887-2897.

**Paillard F**. Bystander effects on enzyme/prodrug gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1997; 8: 1733-1735.

**Palucka K**, Banchereau J. Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med.* 1999; 5:868-70.

**Pearson AS**, Koch PE, Atkinson N, Xiong M, Finberg RW, Roth JA, Fang B. Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 4208-4213.

**Perales MA**, Blachere NE, Engelhorn ME, Ferrone CR, Gold JS, Gregor PD, Noffz G, Wolchok JD, Houghton AN. Strategies to overcome immune ignorance and tolerance. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12:63-71.

**Polyak K**, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 1996; 10: 1945-1952.

**Pope IM**, Poston GJ, Kinsella AR. The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer.* 1997; 33: 1005-1016.

**Premack BA**, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med.* 1996; 2:1174-8.

**Raj K**, Ogston P, Beard P. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature.* 2001; 412:914-7.

**Ramesh R**, Marrogi AJ, Munshi A, Freeman SM. Potentiation of the bystander effect by immunization combined with suicide gene therapy. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 541: 125-131.

**Rammensee HG**, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovic S. Towards patient specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev.* 2002; 188: 164-176.

**Renner C**, Hartmann F, Pfreundschuh M. Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Dtsch Arztebl.* 2002; 99:850-858.

**Rommelaere J**, Cornelis JJ. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods.* 1991; 33:233-51.

**Rommelaere J**, Tattersall P. Handbook of Parvoviruses. Vol. II (Tijssen, P., Ed.) CRC Press Inc. 1990; Boca Raton, FL. 41-57.

**Rothenfußer S**, Jähnsdorfer B, Krug A, Endres St, Hartmann G. CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Dtsch Arztebl.* 2001; 98:981-985.



**Rowley S**, Lindauer M, Gebert JF, Haberkorn U, Oberdorfer F, Moebius U, Herfarth C, Schackert HK. Cytosine deaminase gene as a Potenzial tool for the genetic therapy of colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1996; 61: 42-48.

**Samulski RJ**, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*. 1991; 10: 3941-3950.

**Sareneva T**, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I. Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J Immunol*. 1998; 160:6032-8.

**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: Potenzial application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther*. 2001; 8: 1401-1408.

**Saudan P**, Vlach J, Beard P. Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *EMBO J*. 2000; 19:4351-61.

**Schlehofer JR**, Dupressoir T. Infectiology and pathology of human adeno-associated viruses. *Contrib Microbiol*. 2000; 4:59-67.

**Schlehofer JR**. Parvoviren- krebshemmende Symbionten? *Spektrum der Wissenschaft*. 1997; 44-50.

**Schlehofer JR**. The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat Res*. 1994; 305: 303-313.

**Schmidt M**, Afione S, Kotin RM. Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol*. 2000; 74:9441-50.

**Schmied M**, Schmitz-Winnenthal FH, Tempia-Caliera A, Büchler MW, Zraggen K. Das Pankreaskarzinom: aktuelle Therapiekonzepte. *Schweiz Med Forum*. 2004; 4:579-584.

**Schweickart VL**, Epp A, Raport CJ, Gray PW. CCR11 is a functional receptor for the monocyte chemoattractant protein family of chemokines. *J Biol Chem*. 2001; 276:856.

**Seth P**, Brinkmann U, Schwartz GN, Katayose D, Gress R, Pastan I, Cowan K. Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging. *Cancer Res*. 1996; 56: 1346-1351.

**Spitz FR**, Nguyen D, Skibber JM, Meyn RE, Cristiano RJ, Roth JA. Adenoviral-mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clin Cancer Res*. 1996; 2: 1665-1671.

**Srivatanauksorn V**, Srivatanauksorn Y, Lemoine NR. Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 1998; 383: 105-115.

**Staub L**, Link KH, Beger HG. Immunotherapy in pancreatic cancer - current status and future. *Langenbecks Arch.Surg*. 1999; 384: 396-404.

**Thorne SH**, Kirn DH. Future directions for the field of oncolytic virotherapy: a perspective on the use of vaccinia virus. *Expert Opin Biol Ther*. 2004; 4:1307-1321.

**Topf N**, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG. Regional pro-drug gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systematic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther*. 1998; 5: 507-513.

**Trapnell BC**, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1994; 5: 617-625.

**Vallböhmer D**, Lenz HJ. Prädiktive und prognostische Faktoren in der neoadjuvanten/adjuvanten Therapie gastrointestinaler Tumoren: Wunschdenken oder Realität? *Zentralbl Chir.* 2006; 131:148-156.

**Waldmann T**. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med.* 2003; 9:269-77.

**Walz C**, Schlehofer JR, Flentje M, Rudat V, zur Hausen H. Adeno-associated virus sensitizes HeLa cell tumors to gamma rays. *J Virol.* 1992; 66: 5651-5657.

**Wang E**, Panelli MC, Marincola FM. Gene profiling of immune responses against tumors. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:423-7.

**Watzl C**, Long EO. Exposing tumor cells to killer cell attack. *Nat Med.* 2000; 6:867-8.

**Wiedmann MW**, Caca K. Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005; 5:171-93.

**Wiemann B**, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther.* 1994; 64:529-564.

**Wilkowski R**, Heinemann V, Wagner A, Bruns CJ, Schauer R, Thoma M. Können neue Substanzen endlich die Prognose verbessern? - Interdisziplinäre Behandlung des Pankreaskarzinoms. *Klinikerzt.* 2003; 32:242-247.

**Wills KN**, Maneval DC, Menzel P, Harris MP, Sutjipto S, Vaillancourt M-T, Huang W-M, Johnson DE, Anderson SC, Wen SF, Bookstein R, Shepard HM, Gregory RJ. Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding human p53 for gene therapy of cancer. *Hum Gene Ther.* 1994; 5: 1079-1088.

**Wolff G**, Korner IJ, Schumacher A, Arnold W, Dorken B, Mapara MY. Ex vivo cancer cell purging by adenovirus-mediated cytosine deaminase gene transfer and short term incubation with 5-fluorocytosine completely prevents tumor growth after transplantation. *Human Gene Ther.* 1998; 9: 2277-2284.

**Yang B**, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 1649-1657.

**Zhang WW**, Fang X, Mazur W, French BA, Georges RN, Roth JA. High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther.* 1994; 1: 5-13.

**Zur Hausen H**. Human Pathogenic Papillomaviruses. In: *Current topics in microbiology and immunology.* 1994; 186, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

## **Danksagung**

Mein Dank gebührt Herrn Professor Ernst Klar, der während meiner gesamten chirurgischen und wissenschaftlichen Ausbildung mich stets unterstützte und mich unermüdlich motivierte. Ohne seine Förderung und wissenschaftliche Erfahrung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Er ist mir Vorbild als Arzt, Wissenschaftler und Mensch.

Herrn Professor Jan Schmidt gilt mein Dank für die freundschaftliche Begleitung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch zahllose anregende und fruchtbare Diskussionen. Seine verbindliche Art und sein kollegialer Umgang eröffneten mir Entwicklungsräume, die mir ohne seine Hilfe nicht möglich gewesen wären.

Mein Dank gebührt ebenfalls meinen klinischen Lehrern Herrn Professor Christian Herfarth und Herrn Professor Markus Büchler, die ich als großartige klinische Lehrer erleben durfte.

Herrn Professor Magnus von Knebel Doeberitz möchte ich danken für die wohlwollende Einführung in die Welt der Molekularbiologie und die wunderbare Unterstützung seiner Arbeitsgruppe bei der Realisierung unserer gemeinsamen Projekte.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, der als Biologe und Freund in unzähligen Stunden Freud und Leid eines Wissenschaftlers mit mir erlebte und ohne seine kritische Intelligenz und saarländische Gelassenheit diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Alles kann, nichts muss und so wäre auch die Züchtung einer gehaltvollen Weinsorte möglich gewesen.

Dank sagen möchte ich auch den vielen Kolleginnen und Kollegen, die durch ihren Einsatz und Engagement in der klinischen Versorgung der Patienten es mir ermöglichten, Freiräume für meine Forschungsaktivitäten zu gewinnen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meiner großartigen Familie, meiner Frau Claudia und den Kindern Laurent, Etienne und Geraldine sowie meinen Eltern, die mir stets Stütze und Rückhalt während dieser Zeit waren.

## IV. Anlagen

### 1. Publikationen, Vorträge und Preise des Antragstellers

Anzahl gesamt: 21      Summe Impact-Faktor: 52,008  
Anzahl als Erstautor: 10      Summe Impact-Faktor Erstautor: 26,731

Anzahl sonstige Publikationen: 2  
Anzahl wissenschaftliche Vorträge: 13  
Anzahl wissenschaftliche Poster: 17

#### 1.1 Originalpublikationen

##### *Erstautor*

1. **IF 3,053**  
**Eisold S**, Mehrabi A, Konstantinidis L, Mieth M, Hinz U, Kashfi A, Büchler MW, Gutt C. Experimental study of cardiorespiratory and stress factors in esophageal surgery using robotic assisted thoracoscopic or open thoracic approach. **Arch Surgery 2007** *accepted*
2. **IF 2,337**  
**Eisold S**, Schmidt J, Ryschich E, Gock M, Klar E, von Knebel Doeberitz M, Linnebacher M. Induction of an antitumoral immune response by wild-type Adeno-Associated Virus type 2 (AAV-2) in an *in vivo* model of pancreatic carcinoma. **Pancreas. 2007** Jul;35(1):63-72.
3. **IF 0,775**  
**Eisold S**, Antolovic D, Schmidt J, Wießner R, Klar E, von Knebel-Doeberitz M, Linnebacher M. Effective antitumoral immune responses are not induced by Cytosine Deaminase Suicide Gene transfer in a syngeneic rat pancreatic cancer model. **Eur Surg Res. 2006** Oct;38(6):513-521.
4. **IF 6,601**  
Autschbach F\*, **Eisold S\***, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Buchler MW, Schmidt J. High prevalence of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. **Gut. 2005** Jul;54(7):944-949. *\*contributed equally*
5. **IF 3,318**  
**Eisold, S.**, Linnebacher, M., Ryschich, E., Antolovic, D., Hinz, U., Klar, E., and Schmidt, J. The effect of adenovirus expressing wild-type p53 on 5-fluorouracil chemosensitivity is related to p53 status in pancreatic cancer cell lines. **World J.Gastroenterol. 2004**Dec;10(24): 3583-3589.

6. **IF 4,434**  
**Eisold, S.**, Ryschich, E., Linnebacher, M., Giese, T., Nauheimer, D., Wild, A., Bartsch, D. K., Buchler, M. W., and Schmidt, J. Characterization of FAMPAC, a newly identified human pancreatic carcinoma cell line with a hereditary background. **Cancer**. **2004** May 1;100(9): 1978-1986.
7. **IF 4,056**  
**Eisold, S.**, Dihlmann, S., Linnebacher, M., Ryschich, E., Aulmann, M., Schmidt, J., Schlehofer, J. R., Ridder, R., and von Knebel, D. M. Prevention of chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2. **Int.J.Cancer** **2002** Jul 20;100(6): 606-614.
8. **IF 0,721**  
**Eisold S**, Schmidt J, Antolovic D, Leutloff U, Libicher M, Klar E. The intra-arterial calcium stimulation test in site diagnosis for surgical therapy of insulinoma. **Chirurg** **2000** Oct;71(10):1236-1242.
9. **IF 0,721**  
**Eisold S**, Fritz T, Buhl K, Leutloff U, Meeder PJ. Pigmented villonodular synovitis. Case reports and review of the literature. **Chirurg** **1998** Mar;69(3):284-290. Review
10. **IF 0,715**  
**Eisold S**, Gonska BD, Kreuzer H. Symptomatic and asymptomatic myocardial ischemia before and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. **Z Kardiol**. **1994** Nov;83(11):816-823.

### **Coautor**

11. **IF 3,706**  
Schmidt E, Maerten A, Linnebacher M, Ryschich, Wentzensen N, **Eisold S**, Büchler MW, Schmidt J. Activating anti-CD40-antibodies induce tumor invasion of cytotoxic T-lymphocytes and inhibition of tumor growth in experimental liver cancer. Activating anti-CD40 antibodies induce tumour invasion by cytotoxic T-lymphocytes and inhibition of tumour growth in experimental liver cancer. **Eur J Cancer**. **2006** May;42(7):981-987.
12. **IF 3,520**  
Schmidt J, **Eisold S**, Buchler MW, Marten A. Dendritic cells reduce number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**. **2004** Nov;53(11):1018-1026.
13. **IF 4,416**  
Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, Heise JW, Schulte KM, Colombo-Benkmann M, Schleicher C, Witzigmann H, Pridohl O, Ghadimi MB, Horstmann O, von Bernstorff W, Jochimsen L, Schmidt J, **Eisold S**, Estevez-Schwarz L, Hahn SA, Schulmann K, Bock W, Gress TM, Zigel N, Breitschaft K, Prenzel K, Messmann H, Endlicher E, Schneider M, Ziegler A, Schmiegel W, Schafer H, Rothmund M, Rieder H. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. **Int J Cancer**. **2004** Jul 20;110(6):902-906.

14. **IF 1,737**  
Ryschich E, Autschbach F, **Eisold S**, Klar E, Buchler MW, Schmidt J. Expression of HLA class I/II antigens and T cell immune response in human neuroendocrine tumors of the pancreas. **Tissue Antigens**. 2003 Jul;62(1):48-54.
15. **IF 2,931**  
Schwarzbach MH, **Eisold S**, Burguete T, Willeke F, Klein-Bauernschmitt P, Schlehofer JR, Herfarth C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Sensitization of sarcoma cells to doxorubicin treatment by concomitant wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV-2) infection. **Int J Oncol**. 2002 Jun;20(6):1211-1218.
16. **IF 0,120**  
Schmidt J., Heuschen U., **Eisold S.**, Kienle P., E. Klar E. Notfälle beim Morbus Crohn: Wann soll operiert werden? **Chir Gastroenterologie** 2002; 18:230-237.
17. **IF 4,151**  
Haack, K., Linnebacher, M., **Eisold, S.**, Zoller, M., von Knebel, D. M., and Gebert, J. Induction of protective immunity against syngeneic rat cancer cells by expression of the cytosine deaminase suicide gene. **Cancer Gene Ther**. 2000Oct;7(10):1357-1364.
18. **IF 0,608**  
Leutloff UC, **Eisold S**, Schenk JP, Noldge G, Schmidt J, Kauffmann GW. Obstruction in the duodenal passage. Mesenteric artery duodenal compression. **Radiologe**. 2000 Jan;40(1):83-85.
19. **IF 2,475**  
Fritz Th, **Eisold S**, Meeder PJ. The gliding nail in the therapy of unstable trochanteric fractures. A prospective study with follow up. **Osteosynthese International**. 1999; 7:144-151.
20. **IF 0,608**  
Leutloff UC, **Eisold S**, Noldge G, Fritz T, Kauffmann GW. A rare form of elbow fracture. **Radiologe**. 1998 Jul;38(7):633-635.
21. **IF 1,005**  
Leutloff UC, Roeren T, **Eisold S**, Fritz T, Mechtersheimer G, Kauffmann GW. Pigmented villonodular synovitis of the lower limb. MR-tomography and histology in 3 cases. **Rofo**. 1996 Dec;165(6):605-608.

## 1.2 Buchbeiträge

Schmidt J, **Eisold S**, Sumar N, Hermon-Taylor J. Specific Quantitation of activated pancreatic type phospholipase A2 by measurement of type 1 phospholipase A2 propeptide (PROP). In: Phospholipase A2. Basic and clinical aspects in inflammatory diseases. Prog Surg. Basel, Karger, 1997, vol 24, pp 56-64

### 1.3 Patentschrift

zur Hausen H, Schlehofer J, Klein-Bauernschmitt P, **Eisold S**, von Knebel Doeberitz M. Verwendung adenoassoziierter Viren zur Senkung der Radio- oder Chemotherapie- reduzierten Resistenz bei Krebspatienten. Erfindungsmeldung P1050; Oktober **2000**

### 1.4 Vorträge

**Eisold S**. Die Applikation von Adeno-assoziierten Viren Typ 2 (AAV-2) führt zur Tumorprotektion in einem syngenem Rattenmodell des Pankreaskarzinoms. 5.-8. April **2005, München**, 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Eisold S**. Therapeutic effects of Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) – infection as a chemosensitizer and unspecific immunostimulator in an experimental pancreatic cancer rat model. 20.-21. September. **2002, Dachau**, Surgery of liver and pancreas tumors. - State of the art -

**Eisold S**. Improved systemic antitumor effect provided by Adeno-Associated Virus type 2 (AAV-2)- infection in Lewis rats with pancreatic carcinoma. 6.-8. September **2001, Ulm**, Progress in pancreatology and GI-surgery

**Eisold S**. Die Rolle des Mycobacterium paratuberculosis beim Morbus Crohn. 29.-30. Juni **2001, Mainz**, Jahrestagung Deutsche Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (DACED)

**Eisold S**. Adenoviraler p53-Gentransfer (Adp53) und 5-FU Chemotherapie wirken synergistisch in vitro und in vivo beim experimentellen Pankreaskarzinom. 1.-5. Mai **2001, München**, 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Eisold S**. Einfluss des adenoviralen CD-Gentransfer (AdCD) als Pro-Drug Therapie auf das Tumorwachstumsverhalten beim experimentellen Pankreaskarzinom. 9.-11. November **2000, Lübeck**, 4. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Eisold S**. Neue Ansätze zur Wirksamkeitssteigerung der antineoplastischen Therapie bei gastrointestinalen Tumoren. 14. Oktober **2000, Stuttgart**, 10. Tagung Praktische Gastroenterologie

**Eisold S**. Adenovirus mediated pro-drug therapy (AdCD) induces local control of pancreatic tumor growth. 30. June **2000, Kiel**, 32<sup>nd</sup> Meeting of the European Pancreatic Club

**Eisold S.** Steigerung der Effektivität zytotoxischer Chemotherapie solider Tumoren durch Adeno-assoziierte Viren. 12. Mai **2000, Kiel**, 6. Kieler Onkologieforum in der Chirurgie

**Eisold S.** Gentherapie mit Hilfe adenoviraler Vektoren – Möglichkeiten und Grenzen beim Pankreaskarzinom. 10. Mai **2000, Heidelberg**, Tagung Onkologischer Arbeitskreis Heidelberg

**Eisold S.** Synergistic Effect of p53 adenovirus-mediated gene therapy and 5FU-Chemotherapy against Pancreatic Cancer Cells *in vitro*. 9.-11. Dezember **1999, San Diego**, Gene Therapy of Cancer Conference

**Eisold S.** Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung in der Therapie des Pankreaskarzinoms. 8. Dezember **1999, Heidelberg**, Tagung Onkologischer Arbeitskreis Heidelberg

**Eisold S.** Adenovirale Transfektion. 18.-20. November **1999, Leipzig**, 20. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub

## 1.5 Poster

**Eisold S,** Schmidt J, Nauheimer D et al. Einfluss unterschiedlicher Chemotherapeutika auf die Expression von Multidrug Resistenz-vermittelnden Genen (MDR's und MRP's) in humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien. 13.-16. November **2006, Hannover**, 61. Tagung der DGVS

**Eisold S,** Schmidt J, Nauheimer D et al. Influence of clinical relevant chemotherapeutics on the expression of multidrug- resistance family members in human pancreatic carcinoma. 20.-25. May **2006, Los Angeles**, Digestive Disease Week

**Eisold S.** The influence of chemotherapeutic agents on the expression of human multidrug resistance protein (ABCC, ABCB) family members in vitro in different pancreatic cancer cell lines. 17.-20. May **2006, Rostock**, 41. Congress of the European Society for Surgical Research

**Eisold S,** Dihlmann S, Ryschich E et al. Tumor selective augmentation of chemotherapy efficacy and reduction of 5-FU with Adeno-Associated Virus (AAV-2) infection. 19.-22. Juni **2002, Heidelberg**, Joint meeting EPC and IAP

**Eisold S,** Klar E, Ryschich et al. Tumor rejection provided by Adeno-Associated Virus (AAV-2) infection in a syngenic rat model for pancreatic carcinoma. 19.-22. May **2002, San Francisco**, Digestive Disease Week

**Eisold S,** Klar E, Linnebacher M et al. Adenoviraler p53-Gentransfer (Adp53) und 5FU-Chemotherapie wirken synergistisch in vitro und in vivo beim experimentellen Pankreaskarzinom. 8.-10. November **2001, Halle/Saale**, 5. Chirurgischen Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie



**Eisold S**, Dihlmann S, Ryschich et al. Increased anticancer activity and reduction of chemotherapy associated side effects by combination of 5FU with adeno-associated virus type 2 infection in apancreatic cancer animal model. 1.-2. November **2001, Chicago**, American Pancreatic Association Meeting

**Eisold S**, Dihlmann S, Ryschich E et al. Improved efficacy of 5FU chemotherapy mediated by Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV-2) infection against pancreatic tumor cells *in vitro* and *in vivo*. 24.-28. March **2001, New Orleans**, AACR's 92<sup>nd</sup> Annual meeting.

**Eisold S**, Schmidt J, Bartsch D et al. Characterization of a new established pancreatic cell line in association with familial pancreatic carcinoma (FAMPAC). 28 June – 1 July **2000, Kiel**, 32<sup>nd</sup> Meeting of the European Pancreatic Club

**Eisold S**, Klar E, Linnebacher M et al. Synergistic effect of p53 adenovirus-mediated gene therapy and 5-FU chemotherapy in the treatment of pancreatic cancer. 28 June – 1 July **2000, Kiel**, 32<sup>nd</sup> Meeting of the European Pancreatic Club

**Eisold S**, Ridder R, Ryschich E et al. Enhanced sensitivity of pancreatic tumor cells to 5-FU chemotherapy mediated by Adeno-Associated Virus type 2 (AAV-2) infection *in vitro* and *in vivo*. 21.-24 May **2000, San Diego**, Digestive Disease Week

**Eisold S**, Ridder R, Klein-Bauernschmidt P et al. Adenoviraler p53-Gentransfer (Adp53) in der Therapie des Pankreaskarzinoms. 11.-13. November **1999, Marburg**, 3. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Eisold S**, Ridder R, Klein-Bauernschmidt P et al. Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung von Pankreastumorzellen. 11.-13. November **1999, Marburg**, 3. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Eisold S**, Klar E, Schmidt J et al. Adeno-assoziierte Viren (AAV-2) zur Chemosensibilisierung von Pankreastumorzellen. 16.-18. September **1999, Ulm**, 87. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen

**Eisold S**, Klar E, Schmidt J et al. Adenoviraler p53-Gentransfer (Adp53) in der Therapie des Pankreaskarzinoms. 16.-18. September **1999, Ulm**, 87. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen

**Eisold S**, Ridder R, Klein-Bauernschmidt P et al. Improved efficacy of 5-FU-chemotherapy by AAV-2 mediated sensitization of pancreatic tumor cells. 28.-31. July **1999, Lüneburg**, XXXI. Meeting of the European Pancreatic Club

**Eisold S**, Klar E, Schmidt J et al. Efficacy of p53 adenovirus mediated gene therapy against pancreatic cancer cells. 28.-31. July **1999, Lüneburg**, XXXI. Meeting of the European Pancreatic Club

## **1.6 Preise und Auszeichnungen**

- 2002 Abstract Award, State of the art: Liver and Pancreas Tumors, Dachau, Germany
- 2001 Scholarship, American Pancreatic Association, Chicago, USA
- 2000 Poster prize, Digestive Disease Week, San Diego, USA
- 1999 Posterpreis, Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen, Ulm, Germany
- 1999 Poster prize, XXXI Meeting of the European Pancreatic Club, Lüneburg, Germany
- 1998 Research grant, St. George's Hospital Medical School, UK, London

## **2. Tabellarischer Lebenslauf**

### **Persönliches**

Name: **Dr. med. Eisold**

Vornamen: Christian Sven

Geburtstag: 11.04.1965

Geburtsort: Großröhsdorf

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, mit Claudia Eisold,  
geb. Saurbier

Kinder: Laurent Eisold, geb. 13.05.2001  
Etienne Eisold, geb. 18.01.2003  
Geraldine Eisold, geb. 14.04.2005

### **Berufsausbildung - / tätigkeit**

1981 - 1983 Fachschule Dresden, Facharbeiter für  
Kaminbau

1984 - 1986 Handwerkskammer Dresden,  
Handwerksmeister für Kaminbau

1981 - 1986 Lehrling, Geselle, Handwerksmeister

### **Hochschulstudium**

1988 Immatrikulation für Humanmedizin an der Georg - August -  
Universität Göttingen

1990 Abschluss des Physikums ( vorklinischer Teil )

1991 Absolvierung des I. Staatsexamens

1994 Absolvierung des II. Staatsexamens

1994 Praktisches Jahr (Phoenix, Arizona, USA)

1995 Absolvierung des III. Staatsexamens

### **Promotion**

1995 Promotion zum Doktor der Medizin an der Georg - August - Universität Göttingen mit dem Thema:

*„Symptomatische und asymptomatische Myokardischämien vor und nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie“*

### **Approbation**

1997 (Voll)- Approbation als Arzt

### **Berufstätigkeit als Arzt**

1995 Arzt im Praktikum ( AiP ) an der Chirurgischen Klinik der Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Ch. Herfarth)

1996 Assistenzarzt an der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Ch. Herfarth)

1998 – 2000 Forschungstätigkeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (Leiter: Prof. Dr. M. von Knebel-Doerberitz)

2002 Facharzt für Chirurgie an der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. MW Büchler)

2004 Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Rostock (Direktor: Prof. Dr. E. Klar)

### **Mitgliedschaften**

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie (DGCH),

Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Molekulare Diagnostik und Therapie (CAMO)

Deutsche Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (DACED)

European Pancreatic Club Association (EPC)

American Association of Cancer Research (AACR)

### **3. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass die vorliegende Habilitationsschrift von mir selbst verfasst und dabei keine fremden, nicht erwähnten Hilfen verwendet wurden.

Diese Habilitationsschrift wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Habilitation vorgelegt.

An keiner anderen Fakultät wurde bisher ein Habilitationsverfahren eingeleitet.

Rostock, 14.07.2005

Dr. med. Sven Eisold

#### **4. Sonderdrucke der Publikationen zum Thema**