

## **Institut für Molekulare Pathologie**

Dalibor Antolović  
Dr. med.

### **Generierung eines rekombinanten Adenovirus zur Pro-Drug-Gentherapie mit dem Cytosin Desaminase/5-Fluorcytosin-System beim experimentellen Pankreaskarzinom**

Geboren am 10.10.1971 in Zagreb/Kroatien  
Reifeprüfung am 11.06.1991 in Villingen/Schwarzwald  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis WS 2001  
Physikum am 10.09.1996 in Freiburg/Breisgau  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 05.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz

Krebs ist nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Prinzipiell stehen derzeit drei klassische therapeutische Ansätze zur Behandlung maligner Erkrankungen zur Verfügung: Chirurgische Resektion, Chemotherapie und Strahlentherapie. Zur Verbesserung und Erweiterung der Therapieoptionen bei malignen Neoplasien wird in jüngerer Zeit das Augenmerk auch auf sogenannte gentherapeutische Verfahren gerichtet. Einen solchen Ansatz- die Behandlung des experimentellen Pankreaskarzinoms mit Hilfe eines adenoviralen Vektors- verfolgt die vorgelegte Arbeit.

Rekombinante adenovirale Vektoren können verschiedene Gewebearten infizieren und ermöglichen so einen effektiven Gentransfer. Dabei ist die Expression des transduzierten Fremdgens transient; auch findet keine Integration in das Wirtsgenom statt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein rekombinantes Adenovirus generiert, das das Cytosin Desaminase-Gen (CD) aus *E. coli* trägt. Dabei wurde zusätzlich ein neues PCR-Verfahren zum schnelleren und einfacheren Screening auf rekombinante DNA entwickelt. Die CD kann das niedrigtoxische Substrat 5-Fluorcytosin (5-FC) zum toxischen 5-Fluoruracil (5-FU) desaminieren. 5-FU, ein Antimetabolit, wird u.a. zur chemotherapeutischen Behandlung von Magen-, Brust- und Pankreaskarzinomen verwendet und ist für Säugerzellen hochtoxisch. Mit dem CD/5-FC-Suizidsystem ist es möglich, CD-exprimierende Tumorzellen durch Zugabe der Substanz 5-FC effektiv abzutöten. Das rekombinante Adenovirus dient bei diesem Ansatz als Genfährer für die CD in Tumorzellen. Dabei ist es ausreichend, nur einen Teil der Tumorzellen zu infizieren. Durch das lokale Erreichen hoher 5-FU-Konzentrationen werden ohne schwerwiegende systemische Nebenwirkungen auch benachbarte Zellen abgetötet („Bystander-Effekt“).

Die Expression der transduzierten CD wurde mit Hilfe von Western Blots in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen; die Funktionalität der CD wurde *in vitro* durchflusszytometrisch (FACS-Analyse) bestimmt.

In einem *in vivo*-Tiermodell an männlichen Lewis-Ratten wurde diesen subkutan Pankreaskarzinomzellen inokuliert; die Behandlung nach 6 Wochen begonnen und über einen Zeitraum von 8 Wochen mit jeweils 2 Therapiezyklen pro Woche durchgeführt. In der

Behandlungsgruppe wurde das rekombinante AdCD intratumoral, 5-FC intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppen erhielten entweder nur AdCD intratumoral, nur 5-FC intraperitoneal oder PBS intratumoral. Bis zum 9. Behandlungszyklus wurde -im Gegensatz zu den Kontrollgruppen- in der Behandlungsgruppe kein Fortschreiten des Tumorwachstums beobachtet („stable disease“). Dieser Effekt war jedoch zeitlich limitiert, d.h. die Wirksamkeit der Therapie liess ab dem 9. Zyklus nach und schliesslich konnte auch in der Behandlungsgruppe ein fortschreitendes Tumorwachstum beobachtet werden.

Nach Abschluss der in vivo-Versuche wurde zur Evaluierung der Wirkungsweise der Therapie ein Test auf Zytotoxizität gegen Tumorzellen durchgeführt. Dieser zeigte keine gesteigerte Aktivität der präparierten peripheren Blutlymphozyten der Tiere gegen die inokulierte Tumorzelllinie DSL6A. Mit angefertigten Tumorschnitten wurde einerseits eine TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen, andererseits eine immunhistochemische Färbung auf tumorinfiltrierende CD8+ T-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe der TUNEL-Färbung konnte der Nachweis erbracht werden, dass das CD/-FC-System auch in vivo apoptosenduzierend wirkt. Die Immunhistochemie zeigte in der Behandlungsgruppe den grössten Anteil CD8+ T-Zellen, ohne dass dieser Befund einen Rückschluss auf den Aktivitätszustand oder die Subpopulationen der CD8+ Zellen innerhalb des Tumorgewebes zulässt.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass adenovirale Vektoren und das CD/5-FC-System potentiell eine neue Therapieoption bei der lokalen Behandlung von Malignomen darstellen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle des Immunsystems bei der Applikation von viralen Vektoren zu verstehen und das Behandlungsregime, d.h. Dosisfindung und Applikationsarten, zu optimieren.