

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades
doctor rerum naturalium im
Fach Biochemie

Untersuchung zur Verbesserung der Tumorspezifität
onkolytischer Adenovektoren sowie
Entwicklung von Adenovektoren mit pharmakologisch regulierbarer
Expression von Fas-Ligand

vorgelegt von
Almudena Hurtado Picó
aus
Valencia, Spanien

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin 2007

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2003 bis Juni 2007 in der Arbeitsgruppe von Dr. Fechner in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie von Prof. W. Poller des Universitätsklinikums *Benjamin Franklin* des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Poller
Prof. Dr. Erdmann
Prof. Dr. Knaus
Prof. Dr. Haag
Dr. Engel

Tag der Disputation: 29. April. 2008

Summary

This study aims to analyse the cause of the leaky activity of the tumor- and tissue-specific promoters (ttsPs) after its integration in an adenoviral vector genome and how this affects the viral replication. We demonstrate which impact cause several viral and nonviral factors. Based on these findings, we were able to optimize the specificity of the virus replication.

Furthermore the development of an replication deficient adenoviral vector (rdAdV) which express a proapoptotic Dox-controlled gene was proved to be a trend-setting for a new strategy approach in tumor therapy.

1. By the insertion of the ttsPs (CEA Promoter, SPB Promoter, hTyr2E/P Promoter or [HRE]AFP Promoter) into a luciferase-expressing rdAdV shown the ttsP just a conditional cell specificity (expression also in non target cells) while its endogenous homologue kept the specificity. The analysed elements listed below influenced the ttsP activity:

The 5'-terminal adenoviral E1A enhancers fused to the ttsP affected their leakiness.

The insertion of transcriptional regulator elements in the ttsP region carried in part to a modification on the promoter activity. On the one hand increased the murine tyrosinase enhancer (2mE-Tyr) the tyrosinase promoter activity, on the other hand didn't show the human tyrosinase enhancer (2hE-Tyr) any effect. The transcriptional element [HRE] inhibited the AFP promoter activity. All these effects affected to the same degree the ttsP-AdV replication.

The restricted replication competent adenovirus (Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} and Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}) expressed through the leaky ttsP activity the E1A(13S) protein. This protein mediate the transactivation of the ttsP and induce via autoactivation feedback loop an increased E1A(13S) expression and virus replication.

2. Based on these cognitions was introduced a tetracyclin-controlled system in the ttsP-AdV which enables a extrinsic transgene expression regulation. Through this system succeeded the control of the ttsP activity and ttsP-RRCA replication. Substantial findings of this work consist in the confirmation that the doxycyclin (Dox)-

controlled transcriptional silencer (tTS) can inhibit the *ttsP*-RRCA replication through the blocking of the leaky *ttsP* activity and through the arresting of the E1A(13S) transactivation. The tTS showed itself as an universal inhibitor of the *ttsP* activity. As long as is not possible a complete blocking of the leaky *ttsP*-RRCA replication, offers the use of a tetracyclin system in the *ttsP*-RRCA only a limited security for its use in tumor therapy.

3. Another therapy approach was tested by the insertion of the proapoptotic FasL gene in an adenoviral genome. Through the modified Dox-controlled gene expression system (Tight-system) succeeded an optimized regulation in the FasL expression. The new developed replication deficient adenoviral vector Ad5Tight-FasL caused effective apoptosis via FasL expression under Dox induction in the cell line HeLa, whereas was not detect in non induction conditions, in contrast to the original TRE-system.

By the trials in lung cancer cells (H441, BEN and DMS53) it was possible to detect apoptosis by the application of Ad5Tight-FasL, however was the effectivity 200 to 400 fold lower than in HeLa cells. In this respect possess lung cancer cells a relative resistance against FasL-induced apoptosis. The insertion of the FasL gene in an oncolytic adenovector may remedy this problem. Further research on the basis of FasL-expressed oncolytic adenovectors could demonstrate its applicability for cancer therapy.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Adenoviren	6
1.1.1	Taxonomie	6
1.1.2	Morphologie	7
1.1.3	Genom und Genomaufbau	8
1.1.4	Replikationszyklus	13
1.1.5	Adenovirale Vektorsysteme	14
1.2	Adenovirus für Tumorgentherapie	16
1.2.1	Bedingt replikationskompetente Adenoviren (RRCA) in der Tumorgentherapie	19
1.2.2	Adenovirale Onkolyse in Kombination mit anderen Therapien	21
1.3	Tetrazyklininduzierbare Transgenexpressionssysteme	22
1.3.1	Tet-Off-System	23
1.3.2	Tet-On-System	24
1.3.3	Tetrazyklinkontrollierter transkriptionaler Silencer	25
1.4	Promotoren in der Tumorgentherapie	25
1.4.1	Tumorassoziierte Promotoren	26
1.4.2	Gewebespezifische Promotoren	29
1.4.3	Induzierbare Promotoren	32
1.5	Molekulare Mechanismen des Zelltodes	33
1.5.1	Das Fas/FasL-System	35
1.5.1.1	Das Fas/FasL-System in Tumorzellen	37
1.5.1.2	Expression von FasL als Antitumorstrategie	39
2	Material und Methoden	41
2.1	Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien	41
2.1.1	Bakterienstämme	41
2.1.2	Plasmide	41
2.1.3	Zelllinien	42
2.2	Kulturmedien für Bakterienstämme	43
2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44

2.4	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	45
2.5	DNA-Präparation.....	45
2.5.1	Plasmid-Präparationen aus <i>E. coli</i>	45
2.5.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	45
2.5.1.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	46
2.5.2	Präparation von genomischer DNA und Adenovektor-DNA aus transduzierten Zellen.....	46
2.5.3	Präparation von Adenovektor-DNA aus Adenovektorpräparationen	47
2.5.4	Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese	47
2.5.5	Analyse von Nukleinsäuren.....	48
2.5.5.1	Agarosegelelektrophorese	48
2.5.5.2	Restriktionsverdaue	48
2.5.5.3	Restriktionsfragment-Analyse	49
2.5.5.4	DNA-Sequenzierung	49
2.6	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	50
2.7	Plasmidklonierung in <i>E.coli</i>	51
2.7.1	Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Promotor.....	51
2.7.2	Tyrosinase (Tyr)-Promotor	52
2.7.3	Surfactant protein-B (SPB)-Promotor	52
2.7.4	Alfa fetoprotein (AFP)-Promotor.....	53
2.8	Plasmidtransfektion in Zelllinien.....	54
2.9	RNA-Präparation.....	54
2.10	RNA- und DNA-Quantifizierung und Reinheit.....	55
2.11	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	55
2.12	Quantitative kompetitive PCR	56
2.12.1	Konstruktion eines verkürzten DNA-Längenstandards.....	56
2.12.2	Kompetitive PCR.....	58
2.12.3	Nachweis der Produkte mittels <i>GeneScan</i> -Analyse	58
2.12.3.1	Ermittlung der in der quantitativen PCR einzusetzenden Menge an Luciferase- und GAPDH-Standard	59
2.12.3.2	Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die quantitative PCR.....	60
2.13	Transfertechniken	60
2.13.1	Northern-Blot.....	60
2.13.2	Southern-Blot.....	62

2.14	Hybridisierung	63
2.14.1	Herstellung von DNA-Sonden mittels PCR- <i>like</i> -Markierung.....	63
2.14.2	Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte	65
2.15	Viruskonstruktion und Präparation	65
2.15.1	In vitro-Ligationssystem.....	65
2.15.2	Transfektion von HEK293-Zellen und Propagation von Adenovirus.....	68
2.15.3	Isolation der viralen DNA mittels Sorianalyse.....	72
2.15.4	PCR-screening der Vektor-DNA.....	73
2.15.5	Vektorscreening mittels Restriktionsanalyse	73
2.16	Adenovirale Transduktion von Zellen	74
2.16.1	Adenovirale Vektoren.....	74
2.16.2	Transduktion	75
2.17	Plaque Essay	76
2.18	Transgenexpressionsnachweis	77
2.18.1	Nachweis der GFP-Expression	77
2.18.2	Nachweis der Luciferase-Expression	77
2.18.3	Cell killing assay.....	77
2.18.4	Nachweis der Apoptose (DNA-Fragmentierung).....	78
2.18.4.1	DAPI-Färbung	79
2.19	Doxyzyklin-Anwendung.....	79
3	Ergebnisse	80
3.1	Übersicht über den Weg der Ergebnisfindung.....	80
3.2	Untersuchung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren	81
3.2.1	Analyse der Endogen-Promotoren	81
3.2.2	Analyse der konstruierten Adenovektoren.....	83
3.2.2.1	Nachweis der spezifischen cDNAs und der RCA-Freiheit.....	83
3.2.3	Aktivität der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren im Adenovirusgenom	86
3.2.3.1	Spezifität der ttsP	88
3.2.3.2	Stärke der ttsP	89
3.2.4	Einfluss der transkriptionalen Elemente auf die ttsP-Aktivität.....	90
3.2.4.1	Linksseitige Adenovirussequenz	91

3.2.4.2	ttsP fusionierte transkriptionale Elemente	91
3.2.5	E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der ttsP auf Plasmidebene.....	92
3.2.5.1	Einfluss der Tyrosinase-Enhancer-Elemente auf die E1A (13S)-vermittelte Transaktivierung.....	93
3.2.6	E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren auf Virusebene	94
3.2.7	ttsP-RRCA-Replikation als Folge unspezifischer Promotoraktivität.....	97
3.2.7.1	Bestimmung der Virusreplikation.....	97
3.2.7.2	Bestimmung der Zytotoxizität	99
3.3	Das Tet-regulierbare adenovirale Genexpressions-System.....	101
3.3.1	rtTA-M2-Transaktivierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren	101
3.3.2	tTS-Inhibierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren	102
3.3.3	Regulierbarkeit der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren durch das tet-regulierbare adenovirale Genexpressionssystem.....	103
3.3.4	Hemmung der E1A-vermittelte Transaktivierung der ttsP	105
3.3.5	tTS-Blockierung der unspezifischen ttsP-RRCA-Replikation.....	106
3.4	Tet-regulierbare adenovirale Genexpressionssystem für die Kontrolle von FasL-induzierter Apoptose	112
3.4.1	Dox-abhängige Zytotoxizität durch rekombinanten FasL-Regulation in HeLa-Zellen.....	112
3.4.2	Dox-abhängige FasL-mRNA-Expression in HeLa-Zellen	113
3.4.3	Proapoptotische Aktivität durch Ad5TRE-FasL und Ad5Tight-FasL in HeLa-Zellen.....	115
3.4.4	Proapoptotische Aktivität durch Ad5Tight-FasL in Lungenkarzinomzellen.	117
3.4.4.1	Expression der Endogen-Fas-mRNA in Lungenkarzinomzellen.....	117
3.4.4.2	Nachweis der FasL-mRNA in transduzierten Lungenkarzinomzellen.....	119
3.4.4.3	Funktionsanalyse des rekombinanten FasL-Proteins.....	120
3.4.4.4	Dox-abhängige Ad5Tight-FasL-Zytotoxizität in Lungenkarzinomzellen.....	122
4	Diskussion.....	124
4.1	Untersuchung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren	125
4.2	Einsatz des Tet-Systems zur Kontrolle der ttsP-RRCA-Replikation	131

4.3	Regulation der FasL-Expression durch verbessertes Dox-induzierbares Genexpressionssystem in vitro	134
5	Zusammenfassung.....	138
6	Summary.....	140
7	Literaturverzeichnis	142
8	Anhang.....	162
8.1	Tabelle der verwendete Primer	162
8.2	Liste der verwendete Plasmide und Darstellung der darin enthaltenden Kassetten	164
8.3	Plasmidkarte zur Konstruktion der Adenovektoren	166
8.4	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	168
8.5	Verwendete Geräte	171
	Danksagung	172
	Eidesstattliche Erklärung	173
	Lebenslauf.....	174
	Liste der eingereichten Veröffentlichungen.....	176