

1 Einleitung

1.1 Adenoviren

1.1.1 Taxonomie

1953 isolierten W. P. Rowe und Mitarbeiter Adenoviren aus Tonsillen sowie adenoidem Gewebe und vermehrten sie in Kultur (ROWE *et al.* 1953). Heute sind über 40 verschiedene humane Adenovirustypen bekannt. Sie verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, infizieren aber auch den Gastrointestinalbereich und die Bindehaut des Auges. Nutztiere (v.a. Kalb, Lamm, Fohlen) zeigen respiratorisch-enterale Symptome, während es bei Hunden nach einer Infektion mit dem caninen Adenovirus Ad1 zu einer akuten septikämischen Erkrankung mit bevorzugter Manifestation in Gefäßen, Leber und dem Zentralnervensystem kommt (Hepatitis contagiosa canis).

1962 zeigten J. J. Trentin und Mitarbeiter, dass das humane Adenovirus Typ 12 bei Nagetieren maligne Tumorerkrankungen hervorrufen kann. Dies war der erste Hinweis, dass es auch humanpathogene Viren mit karzinogenem Potential gibt. Neben den humanen Adenoviren wurden eine große Anzahl weiterer Adenoviruspezies in Säugetieren und Vögeln entdeckt (TRENTIN *et al.* 1962).

Die Familie der Adenoviridae ist in die Genera Mastadenoviridae (Adenoviren der Säugetiere) und Aviadenoviridae (Adenoviren der Vögel) eingeteilt. Die Mastadenoviren beinhalten wiederum zahlreiche Subgenera, die neben den humanen Adenoviren (Ad) auch bovine, porcine, ovine, canini, equine, caprine, murine und simiane Viren umfassen. Die humanen Ad sind in 6 Subgruppen (A bis F) unterteilt, denen 49 Serotypen (Horwitz 1996) nach ihrer genetischen Variabilität, dem onkogenen Potential, dem G- und C-Gehalt ihrer DNA und der Resistenz gegen neutralisierende Antikörper zugeteilt werden (Wadell *et al.* 1980; Wadell *et al.* 1987). Des Weiteren erfolgt eine Subklassifikation der Subgruppen aufgrund des Hämagglutinationsmusters (z.B. BI und BIII, DI bis DIII, (Hierholzer 1973; Mei and Wadell 1996; Eiz and Pring-Akerblom 1997).

Die humanen Ad können in 2 phänotypische Gruppen eingeteilt werden (Bailey and Mautner 1994), wobei Vertreter der Subgruppen A und F der gastrointestinalen Gruppe zugeordnet werden (z.B. Infektionen der Darmkrypten durch Ad 12 (A),

Gastroenteritis durch Ad 40 und 41 (F) (Wadell *et al.* 1987), während Vertreter der Subgruppe B (z.B. Ad 3), C (z.B. Ad 2 und 5) und E (z.B. Ad 4) der respiratorischen Gruppe angehören und v. a. eine Infektion der oberen Luftwege bewirken, von der hauptsächlich Kleinkinder betroffen sind. Adenoviren der Subgruppe C wurden jedoch auch in Myokard von Kindern und Erwachsenen mit Myokarditis bzw. dilatativer Kardiomyopathie (DCM) nachgewiesen (Martin *et al.* 1994; Pauschinger *et al.* 1999). Ad der Subgruppe D (z.B. Ad 8, 9, 19, 37) können eine epidemische Konjunktivitis verursachen (Curtis *et al.* 1998; Viswalingam 1993).

1.1.2 Morphologie

Adenoviren sind unverhüllte Viren mit einem Durchmesser von 70 bis 90 nm (Nemerow and Stewart 1999), die ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 36 Kb besitzen, dessen Molekulargewicht 150×10^6 Da beträgt (Stewart *et al.* 1991). Sie sind Capside, die eine ikosaedrische Struktur mit 20 Seitenflächen und zwölf Ecken aufweisen (Abb. 1-1). Zudem bestehen sie aus 252 Capsomeren, 240 sog. Hexonen, die als Trimer des Hexonproteins (II, 120 kD) vorliegen und deren hervorstehende Schlaufe die Hauptepitope für neutralisierende Antikörper (Ak) darstellen (Shenk T. 1996) sowie aus zwölf sog. Pentonen. An den Kontaktstellen der einzelnen Capsomere findet man die Proteine IX, X, XI und XII, an den Innenseiten des Capsids die Polypeptide VI und VIII. Die Ecken werden von Pentonen gebildet, die aus einer Pentonbasis und einem antennenartigen Fiberproteinanteil, dessen Länge zwischen den einzelnen Serotypen variiert, bestehen. Die distale C-terminale Domäne des Fiberproteins wird als Knob bezeichnet und agiert mit dem Rezeptor der Zielzelle (Bergelson *et al.* 1997).

Adenoviren enthalten 11 Strukturproteine, von denen sieben das Capsid bilden und die übrigen vier (Protein V, VII, μ und terminales Protein) gemeinsam mit der DNA als Core bezeichnet werden (Stewart *et al.* 1991). Die römischen Ziffern II bis XII, mit denen man die Strukturproteine der Adenoviren bezeichnet, richten sich nach der Laufgeschwindigkeit, die man bei ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen beobachtet (van Oostrum and Burnett 1985; Russell 2000). Protein I fehlt, da sich später herausstellte, dass es sich um einen Komplex von zwei Proteinen handelte.

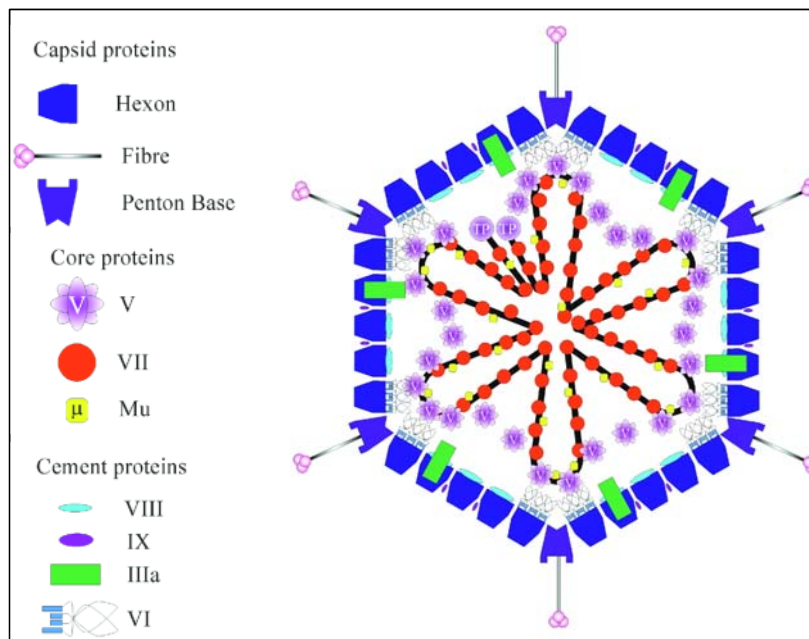


Abb. 1-1. Partikel eines Adenovirus nach Russell, 2000. An den 12 Ecken des ikosaedrischen Partikels befinden sich Fiberproteine (IV, *spikes*), die von der Oberfläche hervorragen. Sie sind mit den Pentonbasisproteinen (III) assoziiert, die sich an den Ecken des Ikosaeders befinden. Die Seitenflächen werden von Hexonproteinen (II) gebildet. Im Inneren des Partikels befindet sich das lineare doppelsträngige DNA-Genom, das mit den Proteinen V, VII und X zu einer Core-Struktur verbunden ist. Die römischen Ziffern sind die international gebräuchlichen Bezeichnungen für die Strukturproteine

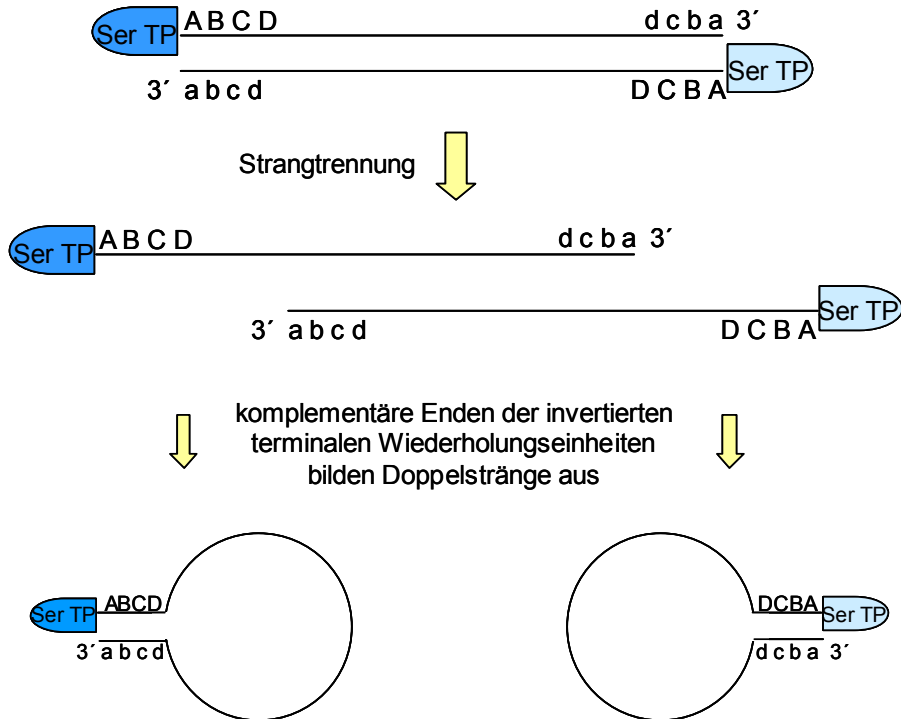
1.1.3 Genom und Genomaufbau

Das adenovirale Genom besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA dessen Größe von ca. 36000 bis 38000 Basenpaaren (bp) innerhalb der sechs Gruppen variiert (Hitt and Graham 1990). Die Genomsequenzen der humanen Ad5 (35935 bp) und Ad2 (35937 bp) sind bekannt (Chroboczek *et al.* 1992) und zeigen eine Homologie von 94.7%.

An den Genomenden findet man invertierte Sequenzwiederholungen (ITRs, *inverted terminal repeats*), dessen Länge abhängig vom jeweiligen Virustyp ist (102 und 103 nt jeweils für Ad2 und Ad5 (Steenbergh *et al.* 1977; Arrand and Roberts 1979). Die DNA als Einzelstränge weisen eine im Elektronenmikroskop darstellbare

„pfannenstiel“-ähnliche Struktur auf, da die Enden über die invertierten Wiederholungseinheiten doppelsträngige Regionen ausbilden können (Abb. 1-2A).

A)



B)

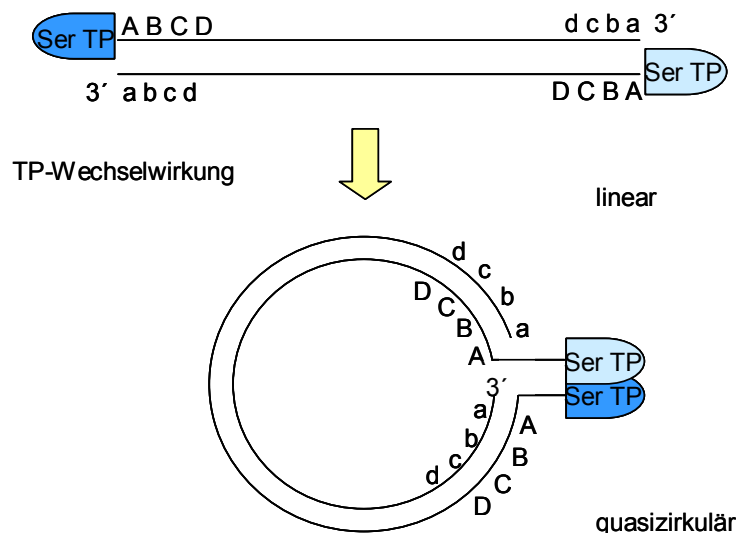


Abb. 1-2. Genomaufbau der Adenoviren. A) Das Adenovirusgenom enthält an seinen Enden wiederholte Sequenzfolgen, die zueinander invertiert sind. Dies ist durch die großen und kleinen Buchstaben schematisch dargestellt. Überführt man das doppelsträngige Genom in DNA-Einzelstränge, können ihre Enden doppelsträngige Bereiche ausbilden. B) Das Genom der Adenoviren besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA. Je ein terminales Protein

TP ist kovalent über einen Serinrest mit den beiden 5'-Enden verbunden. Die Proteine interagieren miteinander und halten das Genom so in einem quasizirkulären Zustand

Das Genom beinhaltet eine cis-funktionierende Verpackungssignalsequenz (Ψ), die neben der 5'-ITR platziert ist und sich für das Ad5-Genom von dem nt 194 bis 380 erstreckt (Grable and Hearing 1990; Ostapchuk and Hearing 2003). An die beiden 5'-Enden des Genoms ist über einen Serinrest je ein terminales Protein (TP, 55 kD) kovalent gebunden. Beide TP-Komponenten können über nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander interagieren und halten so das DNA-Genom in einem quasizirkulären Zustand (Abb. 1-2B).

Die Replikation viraler DNA beginnt durch die Bindung von dem Protein TP an das 5'-Ende von dem DNA-Genom, das als Primer zur Initialisierung der unidirektionalen Replikation dient (de Jong *et al.* 2003). Die virale Replikation benötigt außerdem die virale RNA-Polymerase II, das DNA-bindende-Protein (DBP) und andere zelluläre Faktoren.

Beide DNA-Stränge kodieren über 50 Polypeptide, wobei Gengruppen, deren Produkte sich funktionell ergänzen und zur gleichen Zeit im Infektionszyklus benötigt werden, in enger räumlicher Nachbarschaft vorliegen (Shenk T. 1996). Die Genprodukte werden durch alternative Spleiß und in einigen Fällen durch die Anwendung unterschiedlicher poly(A)-Sequenzen transkribiert (Shaw and Ziff 1980; Adami and Nevins 1988).

Die Einteilung der Gene erfolgt in fünf Transkriptionseinheiten (E1A, E1B, E2, E3 und E4), die zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aktiviert werden. Daneben bestehen die beiden verzögerten Transkriptionseinheiten (IX, IVa) und die Gruppe der spät exprimierten Gene (L, major late), die für die Synthese der viralen Strukturproteine (Capsidbildung) verantwortlich ist (Shenk T. 1996). Unter der L-Gruppe werden 5 Familien von spät mRNAs (L1-L5) unterteilt (Russell 2000). Das Adenovirusgenom enthält auch Gene für kleine, nicht Proteinkodierende-RNA-Moleküle, die virusassoziierten RNA-Spezies VA-I und VA-II. Sie umfassen etwa 160 Nukleotide, werden von der zellulären RNA-Polymerase III transkribiert und haben einen hohen GC-Gehalt sowie eine ausgeprägte Sekundärstruktur. VA-RNAs erhöhen die Translationseffizienz der viralen spät Polypeptide in Kooperation mit der *tripartite leader sequence* (TPL) (Kaufman 1985).

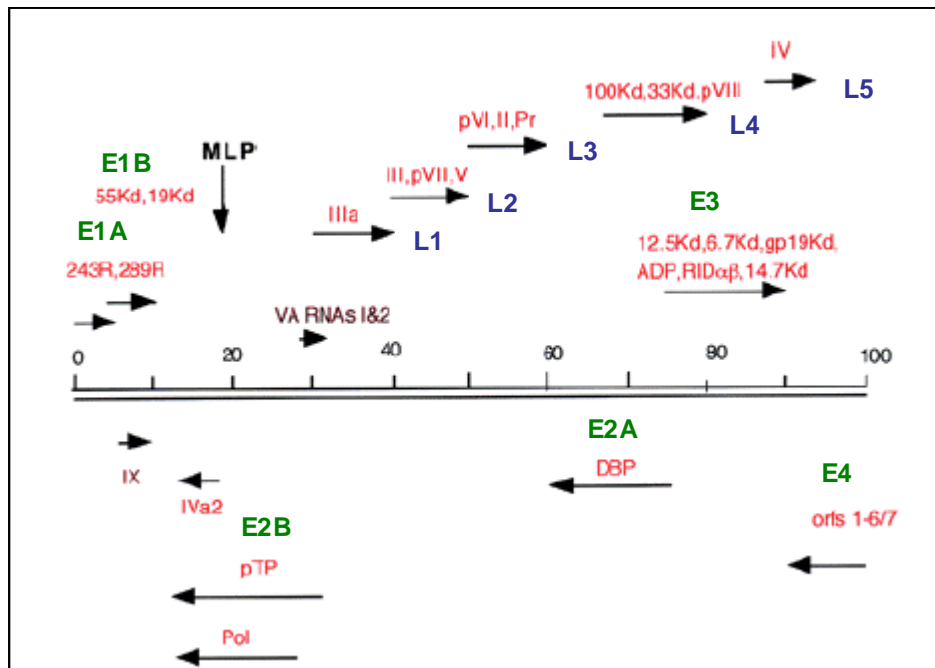


Abb. 1-3. Transkription von Adenovirusgenom. Die doppelsträngige DNA des Virusgenoms ist durch die doppelten Linien in der Mitte der Zeichnung dargestellt und in Genomeinheiten unterteilt. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an, die römischen Ziffern die entsprechenden viralen Strukturproteine. Die grüne Farbe steht für die frühen Transkripte, die blaue für die spät im Infektionszyklus gebildeten mRNAs (Russell, 2000)

Die E1-Gene werden frühzeitig transkribiert und fördern die Expression zellulärer Gene für die DNA-Replikation sowie die Transkription der anderen frühen Virusgene. Sie umfassen etwa 4000 bp, das entspricht elf Prozent des Genoms. E1A-Proteine wirken vor allem transaktivierend, sie induzieren die Transkription der E2-, E3- und E4-Gene. E1A bindet sich nicht direkt an die DNA, sondern übt seine transaktivierende Aktivität durch Wechselwirkung mit Wirtsproteinen aus, die im Promotorbereiche der Gene gebunden sind (Kebulusek *et al.* 1999; Arany *et al.* 1995). E1B-Genprodukte (19 kD und 55 kD) blockieren den Apoptoseweg und gewährleisten damit den zeitlichen Rahmen für eine produktive Virusinfektion. Diese Funktion erklärt sich aus der Wechselwirkung des E1B mit dem zellulären Protein p53, einem zellulären Antionkogen. Eine weitere wichtige Funktion des 55 kD-E1B-Proteins ist die Exportförderung der späten, für Strukturproteine kodierende mRNA-Spezies.

Die E2-Proteine (72 kD, 80 kD und 140 kD) sind direkt in die DNA-Replikation involviert. Das E2-Protein ssDBP (*single stranded DNA binding protein*) ist im aminoterminalen Bereich stark phosphoryliert und kann sich an einzelsträngige DNA binden. Es lagert sich bei der Replikation der viralen DNA an die Stränge, die durch die Neusynthese verdrängt werden und verhindert, dass diese Einzelstränge eine doppelsträngige Struktur ausbilden können oder von Nukleasen abgebaut werden (Hay *et al.* 1995). Die virale DNA-Polymerase, das ssDBP-Protein und das terminal Protein werden in der E2B-Region kodiert (Gooding *et al.* 1990).

Das E3-Gen ist für die eigentliche Virusvermehrung ohne substanzielle Bedeutung, übernimmt jedoch eine wesentliche Rolle bei der Immunüberwachung *in vivo* (Wold and Gooding 1991). So kodiert es Proteine mit immunsuppressiven Funktionen und behindert die MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation an der Zelloberfläche (Bennett *et al.* 1999). Der Mangel an MHC-Klasse-I-Proteinen auf den Zelloberflächen verhindert also, dass die infizierten Zellen von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und eliminiert werden. Durch das 14.7 kD-E3-Protein entwickeln die infizierten Zellen eine Unempfindlichkeit hinsichtlich einer durch TNF- α vermittelten Lyse. Ein anderes E3-Polypeptid (10.4 kD) wird von den infizierten Zellen sezerniert und bindet sich in einem autokrinen Mechanismus an den EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*) an der Oberfläche. Damit erhalten die Zellen das Signal zur Proliferation, d. h. es beginnt der Teilungszyklus (Tollefson *et al.* 1998).

Das E4-Gen ist ebenso wie E1 und E2 unerlässlich für die virale Genomreplikation, da die kodierten Proteine die selektive Expression von viralen Genen auf Kosten der zellulären Gene fördern (Hackett N.R. and Crystal R.G. 2000). Das 34 kD-E4-Protein fördert in Wechselwirkung mit dem E1B-Protein den Transport später viraler mRNA-Spezies aus dem Zellkern in das Cytoplasma (Goodrum and Ornelles 1998) und hemmt gleichzeitig den der zellulären Transkripte (Halbert *et al.* 1985). Das 14 kD-E4-Protein wirkt als Proteinkinase und beeinflusst das Ausmaß der Phosphorylierung einiger zellulärer Proteine (z.B. c-Fos und AP-1) sowie der viralen E1A-Proteine (Boyer *et al.* 1999; Weiden and Ginsberg 1994).

1.1.4 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Die erste oder frühe Phase ist gekennzeichnet durch die Virusaufnahme in die Zelle und den Übergang von dem Adenovirusgenom in den Zellkern. Die späte Phase beginnt mit der Expression der Spätproteine und der Morphogenese sowie der DNA-Replikation. Die erste Phase ist nach der selektiven Transkription und Translation der frühen Gene nach sechs bis acht Stunden abgeschlossen. Die Dauer des Infektionszyklus in HeLa-Zellen beträgt zwischen 20 bis 24 Stunden, dabei erfolgt eine Freisetzung von ca. 10000 viralen Partikeln pro Zelle (Hitt and Graham 1990).

Die Adsorption des Adenovirus in die Zielzelle schließt sich an nach der Bindung des C-terminalen Endes des Fiberproteins (Knob) an den Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997). Ist ein Erstkontakt mit der Zelloberfläche hergestellt, wandert der Rezeptor mit dem gebundenen Virus zu clathrinreichen Regionen in der Zytoplasmamembran, die endozytotische Vesikel bilden und das Virus in das Zytoplasma aufnehmen (Bergelson 1999; Nemerow 2000). Es besteht die Vermutung, dass eine Ansäuerung in den Endosomen einen Strukturwechsel des Pentonbasisproteins verursacht und so das Virion durch Endoplasmolysis freigesetzt wird (Greber *et al.* 1993). Die freien Viruspartikel gelangen durch Assoziation mit den Mikrotubuli der Wirtszelle zum Zellkern (Saphire *et al.* 2000; Lai *et al.* 2002). Während des Transports zu den nukleären Poren verursacht die viruskodierte Protease eine Zerstörung des Capsids durch die Proteolyse des Proteins VI (Greber *et al.* 1996), das die Verbindung zwischen Capsid und den Core-Komponenten darstellt. Im Zellkern erfolgt die Transkription der viralen Gene und die Neusynthese der DNA. Die eigentliche Replikation des viralen Genoms findet semikonservativ ohne die Synthese von DNA in Okazaki-Fragmenten statt (Shenk T. 1996).

Das adenovirale E1-Gen wird, sobald die virale DNA den Zellkern erreicht hat, zunächst von der RNA-Polymerase II transaktiviert. Nach der Expression der frühen Gene (E1-, E2-, E3- und E4-Gen) beginnt die virale DNA-Replikation mit der Veresterung eines dCMP-Moleküls mit der β -Hydroxylgruppe eines Serinrestes des terminalen Proteinvorläufers pTP. Der so entstandene Komplex wirkt über die 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose des dCMP als Primer für die Initiation der DNA-Synthese.

Für die Verlängerung ist die Topoisomerase-I-Aktivität des Kernfaktors NF-II nötig. Nach der Genomvermehrung ändert sich das virale Transkriptionsmuster. Die späten Genombereiche werden aktiviert und die mRNA-Spezies für die viralen Strukturproteine gebildet (Tribouley *et al.* 1994; Rosa-Calatrava *et al.* 2001).

Die ersten Prozesse der Morphogenese finden im Cytoplasma statt: Aus den Hexon-, Pentonbasis- und Fiberproteinen entstehen die Capsomere (Morin and Boulanger 1984; Shenk T. 1996). Im Zellkern entwickelt sich mit den Hexon- und Penton-Capsomeren und den Proteinen VI, VIII und IX eine Vorläuferform des Capsids, das mit den viralen Strukturproteinen (L4-100 kD, 50 kD, 39-40 kD und 32-33 kD) ein leeres Capsid bildet (Morin and Boulanger 1984; D'Halluin 1995). Die virale DNA mit den an beiden Enden gebundenen TP-Proteinen assoziiert mit Core-Proteinen (V, VII sowie MU) und bildet das Chromatin für die Encapsidation (Dery *et al.* 1985; Weber *et al.* 1985). Für die Encapsidation ist nachgewiesen, dass das adenovirale IVa2-Protein (spät Protein) sich an die Verpackungssequenz in dem Chromosom bindet und mit dem viralen 52/55 kD-L1-Protein (spät Protein) interagiert, danach dringt das virale Chromatin in das leere Capsid ein (Zhang and Imperiale 2000; Zhang *et al.* 2001). Als Folge der Infektion stirbt die Zelle ab. Dabei werden die Virionen freigesetzt.

1.1.5 Adenovirale Vektorsysteme

Adenoviren (AdV) sind ideale Vektoren für die *in vivo*-Transduktion in verschiedenen Zelltypen, in denen eine höhere Transgenexpression erwünscht ist. Sie besitzen, im Gegensatz zu den Retroviren, die Fähigkeit in einem weiten Spektrum Tumorzellen infizieren zu können (u.a. ruhende Zellen). Zum anderen sind sie für den Menschen nicht onkogen und übertragen ihr Genom effizient in die Zielzellen. Sie können Fremd-DNA ohne signifikante Einbußen ihrer Stabilität und Infektiosität inkorporieren, wobei der Gesamtstrang 105% der nativen Genomgröße betragen kann. Für die Entwicklung adenoviraler Vektoren werden häufig die Serotypen 2 und 5 eingesetzt, deren Genom komplett definiert ist (Horwitz 1996). Ihr Genom ist einfach zu handhaben und kann in höheren Titer stabiler viraler Stocks produziert werden (Hitt and Graham 2000; Lai *et al.* 2002; Green *et al.* 2002). Dabei bleibt das AdV-Genom als Episomal-Molekül im Zellkern und interagiert nicht mit dem Chromosom der Zelle

(Harui *et al.* 1999). Adenoviren haben hingegen einige Nachteile: Die Transgenexpression findet aufgrund der schnellen Reaktion des Immunsystems auf die viralen Capsidantigene und auf das Transgen in der Regel nur vorübergehend statt (Russell 2000). Darüberhinaus sind die nativen AdV nicht zellspezifisch (Hitt and Graham 2000; Lai *et al.* 2002).

Drei Adenovektortypen wurden in der Gentherapie entwickelt: Die erste und zweite Generation sowie die helferabhängigen Vektoren. Sie sind durch die Deletion von viralen Proteinen replikationsdefizient (Kochanek 1999; Danthinne and Imperiale 2000). Bei Adenovektoren der ersten Generation wurde die E1-Region vom Adenovirusgenom deletiert. Durch die E1-Deletion bildete sich eine Lücke in der Sequenz für die Insertion vom heterologen Gen. Von einigen Vektorgenomen wurde zudem die E3-Region deletiert, um die Verwendung einer Transgenkassette bis zu 8 Kb zu ermöglichen (Abb. 1-4A, (Sadeghi and Hitt 2005). Die Entwicklung der Adenovektoren zweiter Generation erfolgte, um die Induktion der unerwünschten Immunreaktion zu verhindern. Diese Vektoren enthalten, außer der E1-Deletion, Mutationen oder Deletionen der adenoviralen frühen Gene, die eine virale Expression in infizierten Zellen vermindern. Daraus resultierte eine Unterdrückung der Immunreaktion (Amalfitano *et al.* 1998). Als Alternative zu den oben genannten Vektoren wurde der helferabhängige (HD) Adenovektor entwickelt, um die Klonierungskapazität zu vergrößern und die Toxizität sowie die Immunreaktion zu unterdrücken (Imperiale and Kochanek 2004). Bei dem HD-Adenovektor sind alle viralen kodierenden Sequenzen entfernt und durch andere nichtkodierende Sequenzen ersetzt worden (Abb. 1-4B). Die ITRs (*inverted terminal repeats*) und das Verpackungssignal (Ψ) sind belassen worden, da sie für die *in cis* Viruspropagation notwendig sind. Alle anderen viralen Funktionen wurden durch einen *in trans* Adenovektor der ersten Generation ersetzt (Muruve *et al.* 2004).

Neben diesen Vektorviren wurden Hybrid-Vektoren einerseits aus AdV und einem Adeno-assoziierten Virus (AAV) (Lieber *et al.* 1999; Recchia *et al.* 1999; Sandalon *et al.* 2000), andererseits aus AdV und Retrovirus wie z.B. Lentivirus (Kubo and Mitani 2003), Moloney-Leukämie-Virus (Zheng *et al.* 2000) und Epstein-Barr-Virus (Caplen *et al.* 1999; Tan *et al.* 1999) entwickelt.

A)



B)



Abb. 1-4. Adenovektorkarten. Rote Boxen an den Enden von dem Genom zeigen die ITRs (*inverted terminal repeats*). Das Verpackungssignal wird durch das Symbol Ψ dargestellt. Die Transgenexpressionkassette (Promotor, Transgen und polyA-Signal) ist farblich hervorgehoben. A) Karte von Adenovektoren der ersten Generation. Die Deletionen der E1- und E3-Region sind als $\Delta E1$ und $\Delta E3$ bezeichnet. B) Karte von helferabhängigen Adenovektoren. Die weißen Boxen sind nichtkodierende Sequenzen

1.2 Adenovirus für Tumorgentherapie

Die Tumorgentherapie unter Einsatz viraler Vektoren ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieverfahren gegen Krebs. Die Nutzung adenoviraler Vektoren können ein weites Spektrum von Tumorzellen infizieren und ermöglichen relativ hohe Gentransferraten sowie eine hohe Expression der transduzierten Gene. Weitere Vorteile sind die hohe Aufnahmekapazität für Fremdgene und die Möglichkeit zur Präparation hoher Virustiter (Flotte 1993). Die Forschung mittels Virustherapie basiert auf der effizienten Virusinfektion humaner Zellen, die Vermehrung des Virus und die Zellyse mit der Freisetzung und Verbreitung der neuen Virione (Kanerva and Hemminki 2005).

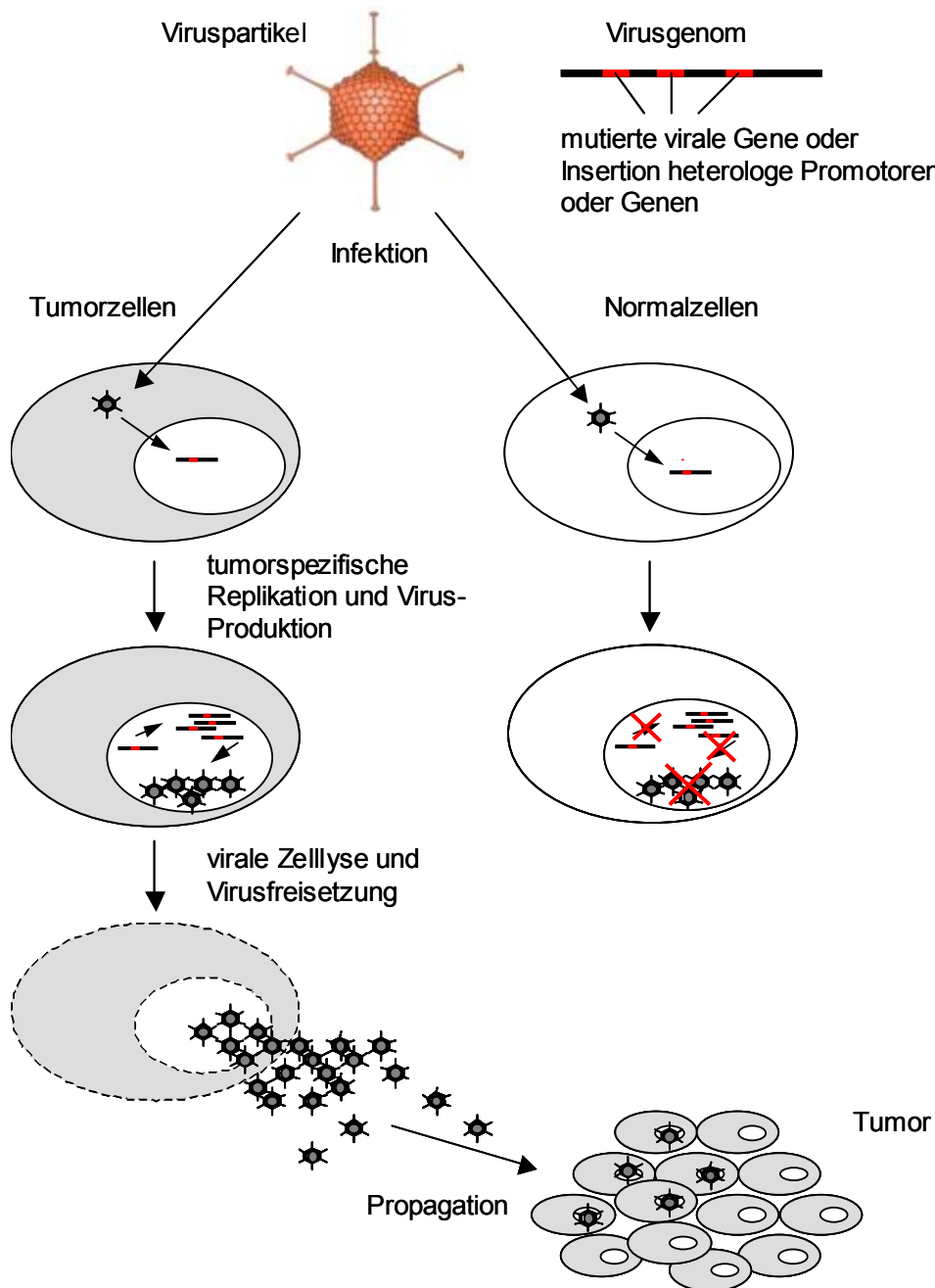


Abb. 1-5. Adenovirale Onkolyse. Onkolytische Adenoviren sind genetisch veränderte humane Adenoviren. Die Veränderungen umfassen die Mutation oder Deletion viraler Gene sowie die Insertion heterologer Gene oder Promotoren. Onkolytische Adenoviren infizieren die Tumorzellen, das Adenovirusgenom wird repliziert, verpackt und die Gastzelle lysiert. Ca. 10000 Viruspartikel werden von einer infizierten Zelle freigesetzt. Die neue Virusgeneration verbreitet sich und beginnt einen neuen viralen Replikationszyklus. Genetische Veränderungen des Adenovirus ermöglichen eine Verstärkung und/oder Zellspezifität in dem viralen Lebenszyklus, wobei die Infektion und/oder Replikation onkolytischer Adenoviren in Normalzellen eingeschränkt wird

Erste klinische Virustherapieversuche basierten auf der zufälligen Entdeckung des Tumorrückgangs bei virusinfizierten Patienten (Webb and Smith 1970). Heute werden rekombinante Viren für die Tumorthherapie eingesetzt (Kirn and McCormick 1996; Ring 2002; Nemunaitis and Edelman 2002). Sie sind bereits eingehend analysiert und wurden als Gentransfervektoren zur Entwicklung onkolytischer Viren eingesetzt (Alemany *et al.* 2000b; Curiel 2000).

Eine Bedingung für die Tumorthherapie ist die Tumorspezifität. Anders als herkömmliche Wirkstoffe sind Viren biologische Mittel, die helfen können Krankheiten auf molekularer Ebene zu behandeln. Ein bedeutsames Forschungsgebiet besteht in der Optimierung von Vektoren mit dem Ziel den Gentransfer effizienter und gezielter zu steuern (Nettelbeck 2003).

Die selektive Replikation von AdV in Tumorzellen wird auf verschiedenen Ebenen angestrebt. Zum einen werden mutierte Varianten der Replikationsgene reintegriert (Bischoff *et al.* 1996; Heise *et al.* 2000; Heise *et al.* 2000). Zum anderen werden gewebe- bzw. tumorselektive Promotoren zur Steuerung der viralen Replikationsgene, insbesondere von E1A, verwendet. In einigen Studien wurde zusätzlich das E1B- oder E4-Gen durch tumorspezifische Promotoren gesteuert, mit der Folge, dass die virale Replikation teilweise spezifischer erfolgte (Hernandez-Alcoceba *et al.* 2000; Hernandez-Alcoceba *et al.* 2002; Hsieh *et al.* 2002; Hsieh *et al.* 2002; Hernandez-Alcoceba *et al.* 2002).

Bis vor wenigen Jahren wurden fast ausnahmslos replikationsdefiziente Adenovektoren (rdAdV) verwendet, die als Träger für tumortoxische Gene dienten. *In vivo*-Studien mit rdAdV zeigten allerdings eine relativ geringe Inhibierung des Tumorwachstums. Dieses Merkmal ließ sich zurückführen auf die Zerstörung von nur primär rdAdV-infizierten Tumorzellen (Alemany *et al.* 2000a).

Durch den Einsatz bedingt replikationskompetenter Adenovektoren (RRCA) sollte diese Einschränkung umgangen werden, da RRCA sich aufgrund der Replikationskompetenz in den Tumorzellen ausbreiten und den Tumor durch Viroonkolyse zerstören konnten (Chu *et al.* 2004).

1.2.1 Bedingt replikationskompetente Adenoviren (RRCA) in der Tumor-Gentherapie

Bedingt replikationskompetente Adenoviren (RRCA) sind, aufgrund der verschiedenen eingesetzten Mutationen, Deletionen und Substitutionen im Genom, insbesondere in der E1-Region, nur unter bestimmten Bedingungen replikationsfähig. Die Expression der adenoviralen E1A- und E1B-kodierten Proteine ist für eine effiziente adenovirale Replikation unerlässlich (Leong *et al.* 1990), wobei eine alleinige Deletion des E1B-Gens in Abhängigkeit vom Zelltyp lediglich zu einer Reduzierung der Adenovirusreplikation führt (Goldsmith *et al.* 1998). Der Einsatz von RRCA ist jedoch nicht ohne Risiko. Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass diese RRCA sich in normalen menschlichen Körperzellen replizieren und die Zellen zerstören können.

Die Entwicklung verschiedener RRCA hatte zum Ziel, eine selektive Replikation in Tumorzellen, basierend auf unterschiedlichen Grundmechanismen der viralen Physiologie, zu ermöglichen. Zwei Hauptstrategien wurden hierbei verfolgt: i) vollständige oder partielle Deletion viraler Gene, die in Tumorzellen für die Aktivierung des Zellzyklus durch p53- oder pBR-Bindungen überflüssig waren (Typ 1) und ii) die Transkription der viralen Gene durch den Austausch des nativen Promotors für tumorspezifische Promotoren (Typ 2) (Alemany *et al.* 2000a; Nettelbeck 2003).

Die Ähnlichkeit der durch Adenovirusinfektion ausgelösten zellulären Stoffwechsel in normalen Zellen mit dem in Tumorzellen war der Anlass für die Entwicklung von RRCA Typ 1. Hierbei zeigte sich, dass die virale Replikation in Tumorzellen (im Gegensatz zu Normalzellen) nicht durch die Deletion einiger viraler Funktionen blockiert wurde. Das erste RRCA, genannt dl1520 oder ONYX-015, wurde von Bischoff und Kollegen im Jahr 1996 veröffentlicht. Das Virus ONYX-015 besitzt die Eigenschaft E1B-55 kD nicht zu exprimieren und ist das inzwischen am häufigsten in der experimentellen Forschung und das einzige bisher beim Menschen eingesetzte RRCA (Bischoff *et al.* 1996; Ganly *et al.* 2000; Heise *et al.* 1997; Khuri *et al.* 2000; Nemunaitis *et al.* 2001; Rogulski *et al.* 2000). Das 55 kD-E1B-Protein hat die Funktion, sich an das Tumorsuppressorprotein p53 zu binden und zu inhibieren. In den Tumorzellen befindet sich das Protein bereits inaktiviert. Der Vektor war in der

Lage sich im Tumor auszubreiten (anders als in Normalzellen). *In vivo*-Experimente zeigten, dass der ONYX-015-Vektor sich ineffizient erwies und es bestand die Vermutung, dass das 55 kD-E1B-Protein durch weitere Funktionen als die Inaktivierung von p53 gekennzeichnet war (Nettelbeck 2003).

Weitere RRCA Typ 1 entstammen der Mutation von E1A. E1A induziert die Expression viraler Gene und fördert den Eintritt der Zelle in die S-Phase für die Virusreplikation. E1A-Mutanten wie z.B. Ad Δ 24 (dl 922-947), KD1 oder CB016 beinhalten spezifische Deletionen in bestimmten Proteindomänen (Fueyo *et al.* 2000; Heise *et al.* 2000; Doronin *et al.* 2000; Balague *et al.* 2001). Der Ansatzpunkt dieser Strategie war die Hemmung der viralen Induktion, welche die Zelle in den Teilungszyklus bringt. Durch eine punktuelle Mutation behält das Gen die anderen Transaktivierungsfunktionen, die möglicherweise bedeutsam für die virale Genexpression sind. Die Tumorzellen befinden sich bereits im Teilungszyklus, wenn das Virus mit einer E1A-Mutation die Tumorzellen infiziert. Das Virus wäre noch in der Lage sich zu vermehren, jedoch nicht in Normalzellen.

Die erste RRCA Typ 2 (CV 706) wurde von Rodriguez *et al.* im Jahr 1997 beschrieben (Rodriguez *et al.* 1997). Sie enthält den prostataspezifischen Antigen-Promotor (PSA), der sich stromaufwärts von dem E1A-Gen befindet. Der PSA-Promotor sorgt für eine spezifische E1A-Expression und einen spezifischen zytopathischen Effekt in Prostatatumorzellen. Wichtig für die RRCA-Entwicklung ist die Fähigkeit der Promotorfragmente, ihre spezifische Aktivität im Adenovirusgenom und während der adenoviralen Replikation zu bewahren. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehrere RRCA Typ 2 durch Verwendung spezifischer Promotoren entwickelt: ein Promotor vom kodierenden *alpha fetoprotein* (AFP) (Hepatozellulärkarzinom(Hallenbeck *et al.* 1999; Li *et al.* 2001; Ohashi *et al.* 2001), kodierende Kallikrein 2 (Prostatatakrebs(Yu *et al.* 1999b), Probasin (Virus CV 787; Prostatatakrebs(Yu *et al.* 1999a), kodierende Osteocalcin (Prostatatakrebs(Matsubara *et al.* 2001), kodierende Tyrosinase (Melanom(Nettelbeck *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002b), kodierende Uroplakin II (Blasenkrebs(Zhang *et al.* 2002a), kodierende flk-1 sowie Endoglin (Endotheltumor(Savontaus *et al.* 2002). Mittels Einsatz von hypoxi- und östrogenresponsiven Promotoren (Brustkrebs(Hernandez-Alcoceba *et al.* 2000; Hernandez-Alcoceba *et al.* 2002), von Tcf-bindenden Sequenzen (Colonkrebs(Brunori *et al.* 2001; Fuerer and Iggo 2002) sowie von induzierten transkriptionalen Faktoren (Chong *et al.* 2002) sind weitere RRCA entwickelt worden.

Der selektive Zelltod konnte durch die gezielte Expression des E1B-Gens (Li *et al.* 2001; Yu *et al.* 1999b; Zhang *et al.* 2002a; Savontaus *et al.* 2002; Fuerer and Iggo 2002; Chong *et al.* 2002), des E2-Gens (Fuerer and Iggo 2002; Chong *et al.* 2002) oder des E4-Gens (Johnson *et al.* 2002) unterstützt werden (Hernandez-Alcoceba *et al.* 2000; Hernandez-Alcoceba *et al.* 2002; Fuerer and Iggo 2002).

Durch die Variation der transkriptionalen Regulation entwickelte man daneben das Adenovirus RRCA Typ 1/2 (Nettelbeck *et al.* 2002; Doronin *et al.* 2001). Die Strategien, die durch die Entwicklung der RRCA Typ 1 und Typ 2 verfolgt wurden, hatten aufgezeigt, dass tumorspezifische Virusreplikation und adenovirale Onkolyse *in vitro* möglich war. Als Problem erwies sich hierbei die ungenügende RRCA-Spezifität *in vivo*. Dies könnte in der adenoviralen speziesgebundenen Replikation begründet sein (Nettelbeck 2003).

Klinische Studien für die RRCA Typ 1 und Typ 2 begannen nur wenige Jahre nach ihrer Entwicklung. Erste Experimente basierten auf der Applikation onkolytischer Adenovektoren *intratumoral* in den Patienten (ONYX-015 für Kopf-, Nacken- und Lungentumor, später auch bei anderen Krebserkrankungen). Die Studie zeigte, dass eine gute Verträglichkeit der Adenovirusinfektion auch nach wiederholter höherer Dosis bestand. Das Virus erreichte den Tumor nach systemischer Applikation, die Antikörper konnten dazu die biologische Wirkung nach der Virusinjektion nicht blockieren. Adenovirale Onkolyse wurde *in vivo* durch spezifische virale Replikation und Tumorzelltod nachgewiesen (Ganly *et al.* 2000; Ganly and Singh 2003). Der Nachteil der Verwendung von Adenovektoren war deren lediglich vorübergehende Wirkung. In der aktuellen Forschung finden RRCA insbesondere Verwendung in Tests von Therapiekombinationen, in denen eine synergistische Wirkung von Viroonkolyse und Chemotherapie oder Radiotherapie untersucht wird.

1.2.2 Adenovirale Onkolyse in Kombination mit anderen Therapien

Therapien gegen bösartige Gewebe sind differenziert nach der Wirkung von aussen (extrinsec) oder von innen (intrinsec) (Faulk *et al.* 1989). Zu den extrinsec wirkenden Therapien gehören Chirurgie, Bestrahlung und Wirkstoffapplikation. Zu den intrinsec wirkenden Therapien gehören die gezielte Transduktion (Vektoraufnahme) und die gezielte Transkription (Transgenexpression).

Da Chemotherapie und Bestrahlung als Therapiekonzepte aufgrund nicht ausreichender Wirksamkeit und/oder zu hoher Toxizität weder allein noch in Kombination mit anderen Therapieverfahren keine hinreichenden Ergebnisse bei der Therapie dieser Tumorerkrankungen erbracht haben (Reid *et al.* 2002b), ist die Erprobung weiterer Therapieverfahren von wachsender Bedeutung. Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf die Verbesserung der synergistischen Wirkungen von Kombinationstherapien, wie z.B. der Strahlentherapie oder der Chemotherapie mit Viroonkolyse.

Die Coapplikation von RRCA mit tumortoxische Transgene exprimierende AdV, wie sie in jüngster Zeit für die Behandlung von Pankreaskarzinomen im Tiermodell erfolgreich eingesetzt wurde, könnte sich auch für die Behandlung anderer Tumore als wegweisend erweisen (Nettelbeck 2003).

Durch die Therapiekombination ergibt sich eine Sensibilisierung der Tumorzellen auf wirkstoff- oder bestrahlungsinduzierte Apoptose durch Virusinfektion oder *viceversa*, auf eine erhöhte Virusfreisetzung durch wirkstoff- oder strahlungsinduzierte Stoffwechsel. Die Suche nach möglichst kompatiblen Wirkstoffen für den molekularen Mechanismus der Adenovirusreplikation und die Frage in welcher Phase der adenovirale Lebenszyklus die höchsten Synergieeffekte besitzt, dies sind die Hauptinhalte aktueller Untersuchungen (Nettelbeck 2003).

Eine weitere Perspektive besteht in der Einsetzung therapeutischer Gene in das RRCA-Genom. Therapeutische Gene können dabei verschiedene Prozesse hervorrufen: genetische Immunopotential, Apoptoseinduktion oder Angiogenese (Liu *et al.* 2005; Gomez-Navarro *et al.* 1999).

1.3 Tetrazyklininduzierbare Transgenexpressionssysteme

Die Basis dieser Regulationssysteme sind zwei regulatorische Elemente, die vom Tetrazyklin-Resistenz-Operon des *E. coli* Tn10-Transposons stammen: das Tet-Repressor-Protein (TetR) und die Tet-Operator-DNA-Sequenz (tetO), welche TetR binden kann. Von diesen beiden Komponenten ausgehend wurden die Tet-Regulationssysteme jeweils mit einem Regulatorplasmid und einem Zielplasmid entwickelt.

1.3.1 Tet-Off-System

In diesem originären System kodiert das Regulatorplasmid ein Hybridprotein, welches als tetrazyklinabhängiger Transaktivator (tTA) bezeichnet wurde (Abb. 1-6, (Gossen and Bujard 1992). Dieser Tet-Off-Transaktivator setzt sich zusammen aus der Tet-Repressor-Bindungsdomäne (tetR) und der Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus (VP16). Letztere fungiert als eine transkriptionsaktivierende Domäne und wandelt, fusioniert mit dem TetR, das Hybridprotein in einen Transaktivator um. Dieser Transaktivator (tTA) tritt als Dimer mit dem Zielplasmid in Wechselwirkung.

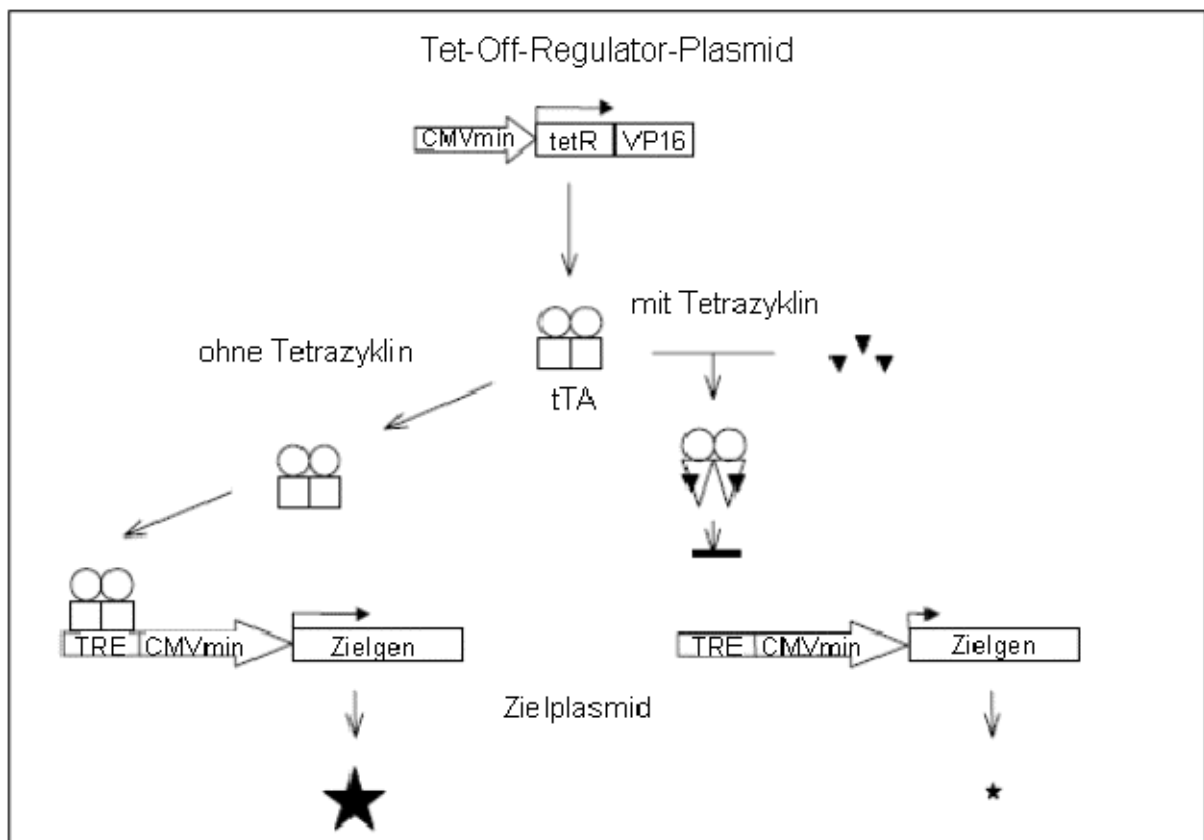


Abb. 1-6. Schematische Darstellung der Genregulation durch das Tet-Off-System. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der tTA an die tetO₇-Sequenz und die Transkription des Zielgens wird aktiviert. Mit Tetrazyklin ändert sich die Konformation des tTA und kann sich an die tetO₇-Sequenz nicht mehr binden, die Transaktivierung findet nicht statt

Das Zielplasmid enthält das Zielgen unter der Kontrolle des TRE (*tet responsive element*)-Promotors, der wiederum aus sieben Kopien der tetO-Sequenz (tetO₇) und einem Minimalpromotor des Zytomegalie-Virus (CMV_{min}) aufgebaut ist. Diesem

Minimalpromotor fehlt der Enhancer, der normalerweise mit dem CMV-IE-Promotor assoziiert ist. Deshalb sollte ohne deren Aktivierung von diesem Element keine Expression ausgehen. In Abwesenheit des Effektormoleküls Tetrazyklin bindet sich der Tet-Off-Transaktivator an das TRE, die Transkription ist aktiviert mit der Folge der Zielgen-Expression. Wird jedoch Tetrazyklin (Abb. 1-6, ▼) dem System zugefügt, bindet sich diese Substanz an den TetR, es kommt zu einer Konformationsänderung. Diese verhindert eine Bindung des Tet-Off-Transaktivators an die tetO₇-Sequenzen, die Expression des Zielgens ist somit unterbunden.

1.3.2 Tet-On-System

Das Tet-On-System basiert auf einem *reverse* TetR (rTetR), der durch den Austausch von vier Aminosäuren entstanden ist (Gossen *et al.* 1995).

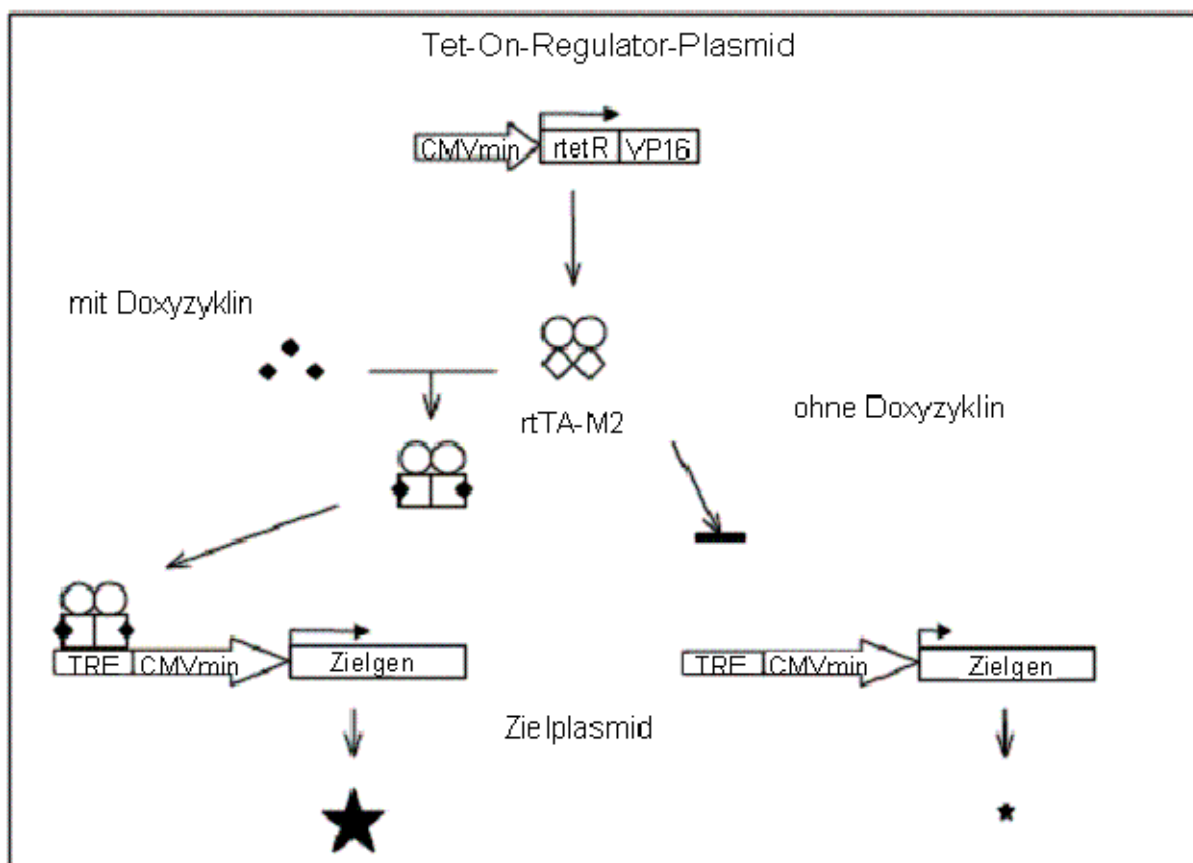


Abb. 1-7. Schematische Darstellung der Genregulation durch das Tet-Off-System. Bei Verwendung von Doxyzyklin bindet sich der rTA-M2 an die tetO₇-Sequenz und die

Transkription des Zielgens wird aktiviert. Ohne Doxyzyklin kann sich der Transaktivator rtTA-M2 an die tetO₇-Sequenz nicht mehr binden und die Transaktivierung findet nicht statt

Fusioniert mit dem VP16-Protein ergibt sich daraus der *reverse* Transaktivator (rtTA-M2). Bei diesem *reverse* Phänotyp kommt es durch die Zugabe von Doxyzyklin (Abb. 1-7, ♦), einem für dieses System effizienteren Tetrazyklinderivat, zur Expression des Zielgens. Erst aufgrund der durch Doxyzyklin bewirkten Konformationsänderung kann sich rtTA-M2 an die tetO₇-Sequenz binden und die Transkription initiieren. Ohne Doxyzyklin findet hingegen keine Transkription statt.

1.3.3 Tetrazyklinkontrollierter transkriptionaler Silencer

Der Tetrazyklinkontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) ist ein Fusionsprotein, das aus dem Tn-10 abgeleiteten Tet-Repressor-Protein (TetR) von *E. coli* und der *Kruppel associated Box* (KRAB-AB)-Silencer-Domäne des Kid-1-Proteins (SDKid) besteht (Freundlieb *et al.* 1999). In Abwesenheit von Dox bindet er sich mit der TetR-Domäne an die tetO₇-Sequenz und verhindert die Transkription eines tetO₇-kontrollierten Transgens. Durch Applikation von Dox in das Kulturmedium oder in das entsprechende Versuchsmodell dissoziiert der tTS von der tetO₇-Sequenz und hebt die transkriptionale Suppression auf. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass der tTS in der Lage ist, basale und aktivierte Transkriptionsaktivität zu inhibieren (Pengue and Lania 1996).

1.4 Promotoren in der Tumorgentherapie

Neben der transduktionalen Regulation folgte die Erprobung zellspezifischer regulatorischer Elemente zur Kontrolle der Transgenexpression in den Adenoviren (AdV). Die Verwendung eines spezifischen Promotors führt nur unter spezifischen intrazellulären Bedingungen zu einer gezielten Transgentranskription. Die regulatorischen Signale sind konstitutiv oder induzierbar, nativ oder fremd, aber sie sind notwendig, um tumorgewebespezifische Aktivität hervorzurufen (Miller and Whelan 1997). Dabei reagieren einige Promotoren gewebespezifischer

(prostata-spezifisches Antigen (PSA), Tyrosinase (Tyr)) als andere (*carcinoembryonic*-Antigen (CEA)). Die drei wichtigen Kriterien für die Auswahl eines Promotors sind dessen Stärke, Gewebespezifität und Größe. Adäquate Promotoren beinhalten regulatorische Elemente, die schon bei den Tumorzellen exprimiert werden und in von außen induzierbaren oder gewebespezifischen Sequenzen bestehen (Vile 1994; Nettelbeck *et al.* 2000). Bei diesen Promotoren erwies sich jedoch ein Mangel an ausreichender Aktivität und/oder Spezifität. Um eine Verstärkung der Promotoraktivität zu erzielen, können Promotoren mit Enhancer kombiniert werden. Die Kombination eines Promotors mit einem Transaktivator kann auf diese Weise u.U. zelltypspezifische Funktionen hervorrufen. Der Einsatz eines gewebespezifischen Promotors für die Expression eines GAL/VP16-Fusionsproteins, das wiederum einen minimalen synthetischen Promotor (GAL/TATA) aufwärts von dem Transgen transaktiviert, bewirkte zum Beispiel die Verstärkung der gewebespezifischen Transgenexpression (Koch *et al.* 2001).

Die Promotoren für die Tumorthherapie können in drei Gruppen eingeteilt werden: Tumorassoziierte Promotoren, gewebespezifische Promotoren und induzierbare Promotoren (Nettelbeck 2003).

1.4.1 Tumorassoziierte Promotoren

Die hochkomplexe Natur der Tumorgewebe kann zur Verhinderung der Tumorspezifität der in Frage kommenden Promotoren führen (Tab. 1-1). Deshalb werden die Verläufe für die Tumorigenese untersucht, um Vektoren für die Gentherapie zu entwickeln. Eine wichtige Komponente in dem Prozess der zellulären Selbstod und Krebsverbreitung bildet das Telomerase-Protein. Höhere Expressionsraten von diesem Enzym werden in bösartigen Tumoren, nicht jedoch in Normalzellen, mit Ausnahme von Stammzellen und Germinalzellen, gefunden. Es wird vermutet, dass Telomerase essentiell für die Verbreitung von 90% der Tumoren ist. Auf dieser Erkenntnis basiert ein neues Forschungsgebiet in der Antikrebs-therapie (Wirth *et al.* 2005). Die *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) ist auf transkriptionaler Ebene regulierbar (Takakura *et al.* 1999), der Promotor zeigte eine ausgeprägte Stärke und Tumorspezifität (Sadeghi and Hitt

2005). Der hTERT-Promotor induziert die Reporter- und apoptotische Genexpression in Tumorzellen, nicht jedoch in normalem Gewebe (Gu *et al.* 2000).

Die Behandlung der TumorgefäÙe hat sich als weiteres bedeutendes Forschungsgebiet in der Tumorthherapie entwickelt. Die Vorteile sind die Zugänglichkeit für eine systemisch applizierte Therapie und die vergleichsweise Homogenität zwischen soliden Tumortypen (Jaggar *et al.* 1997). Die Aktivität des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wird durch zwei Rezeptoren mit hoher Affinität vermittelt. Die ligandstimulierte Tyrosin-Kinase, VEGFR-1/flt-1 und VEGFR2/flk-1, sind in einer Tumorstadiumsphase induziert und werden nur in den Endothelzellen der TumorgefäÙe exprimiert (Xie *et al.* 1999). Die transkriptionale Krebsbehandlung von Endothelzellen in dem GefäÙsystem nutzt die Stärke der 939 bp Flk-1-Promotorfragmentaktivität (Tab. 1-1) und dem in einem 2.3 kb-Fragment stromaufwärts von dem Promotor positionierten Enhancer-Element. Dieser Promotor wurde eingesetzt, um die Expression eines tumorendothelspezifischen Reportergens in transgenische Mäuse zu induzieren (Heidenreich *et al.* 2000). Der humane prepro-endothelin-1-Promotor könnte zudem eine Spezifität für Endothelzellen in BrustgefäÙen bei der β -Galactosidase-Expression durch einen rekombinanten Retrovirusvektor gewährleisten (Jager *et al.* 1999).

Die Zelladhäsion spielt eine wichtige Rolle im GefäÙsystem sowie in Tumormetastasen und wird teilweise durch *E-selectin* bzw. seine Kohlenhydrat-Liganden, Le(a) und Le(x), vermittelt. Die *E-selectin*-Expression in den BlutgefäÙen von Erwachsenen findet auf sehr niedrigem Niveau statt. In neu gebildeten TumorgefäÙen erreicht sie erheblich höhere Werte. Der *E-selectin*-Promotor (Tab. 1-1) zeigte transkriptionale Spezifität in der Expression eines Reportergens in TumorgefäÙen (Walton *et al.* 1998) und in der TNF- α -Expression durch Retrovirus in Endothelzellen von Mäusen. Die Transaktivierung des *E-selectin* durch TNF- α könnte zu einem selbst aktivierenden Metabolismus führen (Jaggar *et al.* 1997).

Letzte Untersuchungen zeigten, dass Heparanase (Vlodavsky *et al.* 1999) sowie RhoC, Fibronectin und Thymosin β 4 (Clark *et al.* 2000) mit metastatischem Potential assoziiert sein könnten. Endoglin (CD 105), ein Glycoprotein, das zu der Rezeptor-Wachstumsfaktor-Familie β (TGF-beta) gehört, ist hauptsächlich in sich vermehrenden humanen Endothelzellen vorhanden. Somit zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem metastatischen Potential (Li *et al.* 2000; Kumar *et al.* 1999) und dem lokalen Angriff (Henriksen *et al.* 1995).

Transkriptionaler Mechanismus	Promotor	Zieltumor	Transgen
abweichende Tumorbiologie	Telomerase	Blasen- und hepatozellulärer Karzinom	Diphtheria Toxin
	FLK-1	Melanom-, Fibrosarkom- und Brusttumorgefäß	Reporter gen
	E-Selectin	Tumorgefäßsystem	TNF- α
	VEGF	Lungenkarzinom	HSV-TK
	Hexokinase II	Lungenkarzinom	HSV-TK
	c-erb B2	Brust- und Bauchspeicheldrüse-krebs	CD
	c-Myc	Kleinzell Lungenkrebs	CD
	L-Plastin	Eierstockkarzinom	Reporter gen
	SLPI	Lungen und Eierstockkrebs	HSV-TK

Tab. 1-1. Transkriptionale Regulation der Tumorgentherapie basierend auf abweichender Tumorbiologie

Viele Gene in der Tumorbiologie werden durch Sauerstoff kontrolliert (Hypoxia-induzierte Gene). Von besonderer Bedeutung sind die Hypoxia-response Transkriptionsfaktoren, weil sie die Expression von diesen Genen beeinflussen können. Zellen unter Hypoxia-Bedingungen haben eine niedrige Transkriptionsrate und hypoxia-aktivierbare Promotoren könnten die Transkriptionseffizienz in diesen Zellen erhöhen. *Hypoxi inducible factor-1* (HIF-1) vermittelt die transkriptionale Aktivierung der Zielgene als Reaktion auf den Sauerstoffmangel. HIF-1 hat eine spezifische Wirkung auf verschiedene Gene, die in zellulärem Wachstum und Metabolismus involviert sind. HIF-1 ist ein regulatorisches Molekül, welches die Sauerstoffzugabe in den Tumorgefäßen und damit das Wachstum und die Metabolismusenergie reguliert (O'Rourke *et al.* 1997). Auf transkriptionaler Ebene stellt es den zellulären Gegensatz auf Hypoxia dar, das in den meisten Tumoren hochreguliert wird. Unter diesem Aspekt wurde die HSV-TK-Expression mit der Promotorregion von dem VEGF-Gen (Tab. 1-1) aus Mäusen neben dem *hypoxi response element* (HRE) gesteuert. Unter Hypoxia-Bedingungen besteht die

Möglichkeit, dass die konstruierte Kasette eine hoch effiziente Zerstörung metastatischer Lungenkarzinomzellen hervorruft (Koshikawa *et al.* 2000).

Ein defekter Glukose-Stoffwechsel ist zudem ein charakteristisches Merkmal von Tumoren. Das Enzym Hexokinase Typ II (HK II) katalysiert im ersten Schritt die Glikolyse und ist in Tumoren überexprimiert. Dieses Merkmal wurde genutzt, um ein Reporter-gen unter der Kontrolle von HK II in Lungenkarzinomzellen (Tab. 1-1) selektiv zu exprimieren und die Herpes-Simplex-Thymidinkinase (HSTK) in einem replikationsdefizienten Adenovirus mit selektiver Toxizität zu induzieren (Katabi *et al.* 1999).

1.4.2 Gewebespezifische Promotoren

Die Nutzbarkeit von gewebespezifischen Promotoren (Tab. 1-2) ist aufgrund der auch in normalen Zellen bestehenden Aktivität limitiert. Einige Gewebe sind jedoch erlässlich, so dass Promotoren, die in diesen Organen aktiv sind, für die Aktivierung von therapeutischen Transgenen eingesetzt werden können. Ideale Gewebe hierfür sind Melanozyten, Prostata-, Brust-, Endokrine- und Exokrinegewebe. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des Tyrosinase-, CEA, SPB und AFP-Promotors.

Die Transduktion von Plasmiden mittels Tyrosinase-Promotor (Tab. 1-2) führte zu einer selektiven Transgeninduktion sowie zur vollständigen Tumorrückbildung von Melanom *in vitro* und *in vivo* (Sadeghi and Hitt 2005; Vile and Hart 1993; Bateman *et al.* 2000). In gleicher Weise wirkte ein Konstrukt, das einen 209 bp humanen Tyrosinase-Promotor, verbunden mit zwei humanen Enhancer-Elementen (2hE-TyrP) enthielt. Hiermit gelang eine melanomspezifische Reporter-gen-Expression in einem adenoviralen Vektor der ersten Generation (Lillehammer *et al.* 2005). Die Hintergrundexpression in Nicht-Melanomzelllinien bestätigte die Gewebespezifität (Lillehammer *et al.* 2005). Durch die Verwendung des Tyrex2-Systems, bestehend aus zwei melanozytenspezifischen Enhancern von Mäusen sowie dem Tyrosinase-Promotor, bestand die Möglichkeit, das Luciferase-, das *purine nucleoside phosphorylase* (PNP)- und das adenovirale E1A-Gen zu regulieren. Die melanomspezifische adenovirale Luciferase- und PNP-Expression wurde mit dem

Konstrukt Tyrex2 erreicht, eine melanomspezifische Adenovirusreplikation blieb aber erfolglos.

Transkriptionaler Mechanismus	Promotor	Zieltumor	Transgen
Gewebe-Spezifität	PSA, Kallikrein	Prostata	Reportergen oder Nitroreduktase
	Tyrosinase	Melanom	Reportergen
	Tyrosinase	Melanom	IL-2
	CEA	HCC	CD
	CEA	Bauchspeicheldrüse	<i>negative ras-Mutant</i>
	AFP	HCC	HSK-TK
	c-erb B2	Bauchspeicheldrüse	CD
	Amylase	Bauchspeicheldrüse	Reportergen
	SPB	Lungenkarzinom	Adenovirale E4
	GRP	Kleinzelliges Lungenkarzinom	HSV-TK
	AVP	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Reportergen
	Immunoglobulin-Kette	B-Lymphomas	<i>diphtheria toxin</i>
	AP-2	Brustkrebs	CD
	A-lactalbumin	Brustkrebs	CD
	Osteocalcin	Osteosarkom	HSV-TK
Prolactin	Prolactinom	HSV-TK	

Tab. 1-2. Transkriptionale Regulation der Tumorgentherapie basierend auf gewebespezifischen Promotoren

Ein weiterer Tumormarker ist das *Carcinoembryonic*-Antigen (CEA) (Tab. 1-2). Es wird in Darm-, hepatischen-, Speicheldrüsen- und Lungenkarzinomen exprimiert, zudem kann CEA auch unter gutartigen Entzündungsbedingungen in niedrigen Mengen nachweisbar sein. Die transkriptionalen regulatorischen Elemente von CEA schließen zwei Enhancer-Elemente sowie einen Promotor in der 5'-flankierenden Region vom CEA-Gen ein. Eine Verwendung dieser Elemente fand in

unterschiedlichen Kombinationen statt, um die Reporterexpression und die Adenovirusreplikation in verschiedenen Zelllinien zu regulieren (Li *et al.* 2003). Es wurde eine optimale Kasette entwickelt, die zur Kontrolle der Genexpression und der viralen Replikation in Kolonkarzinomzellen diente. Der CEA-Promotor wurde verwendet, um selektiv einen dominant-negativen *ras*-Mutanten in CEA-positiven Bauchspeicheldrüsen-Tumorzelllinien zu exprimieren. Die Apoptose konnte so induziert und das Tumorstadium gehemmt werden (Takeuchi *et al.* 2000).

Der *surfactant protein B* (SPB)-Promotor (Tab. 1-2) ist aktiv in *alveolar* Epithelzellen Typ II und bronchialen Epithelzellen von Erwachsenen (Bohinski *et al.* 1993). Hat der SPB-Promotor die Expression vom E4-Gen in einem replikationskompetenten Adenovirus reguliert, konnte die virale Replikation und Zellyse in den Lungentumorzellen begrenzt werden. Diese Erkenntnis basiert auf der Aktivität des SPB-Promotors, der zur Verhinderung des vektoronkolytischen Effektes in Lebertumorzellen führte (Doronin *et al.* 2001).

Das *gastrin releasing peptide* (GRP) ist in vielen Typen von kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) exprimiert (Tab. 1-2). Das adenovirale Konstrukt mit dem Herpes-Simplex-TK-Gen unter Einsatz des GRP-Promotors besitzt die Eigenschaft in GRP-exprimierenden SCLC-Zellen eine Reaktion auf Gancyclovir hervorzurufen. Daneben induzierte es nach intraperitonealer Gancyclovir-Applikation die SCLC-Tumorrückbildung (Morimoto *et al.* 2001). Der *cyclooxygenase-2* (COX-2)-Promotor entfaltet zwar in A549-Lungentumorzellen seine Aktivität, nicht jedoch in Leberzellen (Yamamoto *et al.* 2001). Er kann durch IL-1- β induziert und durch Methasone inhibiert werden (Newton *et al.* 1998).

Alfa fetoprotein (AFP) ist in hepatozellulären Karzinomen ein spezifisch exprimiertes Gen. Der Promotor wurde mit Erfolg zur Kontrolle des Thymidin-Kinase (TK)-Gens in einem Retrovirusvektor eingesetzt und konnte spezifisch Hepatomzellen infizieren und lysieren (Tab. 1-2, (Kanai *et al.* 1997). Takahashi und Kollegen konstruierten im Jahr 2002 einen rekombinanten replikationskompetenten Adenovirus, der eine Steuerung des E1A (13S)-Gens mittels AFP-Promotor ermöglichte. Der Vektor konnte AFP-produzierende HCC-Zellen (HuH7, HepG2, PLC/PRF/5(P5)) mit höherer Spezifität und Effizienz lysieren (Takahashi *et al.* 2002).

1.4.3 Induzierbare Promotoren

Ein allgemeines Problem bei den gewebe- und tumorspezifischen Promotoren ist deren relative Schwäche. Diesbezüglich besteht die Notwendigkeit, die Effizienz der Transgene zu erhöhen. Unter Stressbedingungen wie z.B. Hitze, Hypoxia, Glukosemangel, Bestrahlung oder Zugabe chemotherapeutischer Wirkstoffe werden einige Gene aktiviert. Die Promotoren dieser Gene sind deshalb von besonderem Interesse für die Tumorgentherapie.

Die Stressgene, die unter diesen Bedingungen hochreguliert werden, sind u.a. die Promotoren folgender Gene: *multidrug resistance gene* (MDR-1), das humane Hitze-Schock-Protein (HSP), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), das bestrahlungsinduzierbare Egr-1-Gen (*early growth response gene*) und der Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tpa) (Tab. 1-3).

Die Anwendung des ersten induzierbaren Promotorsystems basierte auf einem kombinierten Einsatz von Bestrahlung und Genterapie. Verwendet wurde der Egr-1-Promotor in Zusammenhang mit dem radioempfindlichen Cytokin TNF- α oder TK. Die kombinierte Therapie erwies sich als effizienter im Vergleich zur ausschließlichen Bestrahlungstherapie *in vitro* (Joki *et al.* 1995) und *in vivo* (Staba *et al.* 1998).

Die Chemotherapie induziert weitere Mechanismen für einen Wirkstoffwiderstand, einerseits durch Aktivierung des Glutathion-Detoxifikation-Systems, andererseits durch Änderung der Apoptose-Kontrollgene (insbesondere p53 und bcl-2). Eine Vielzahl von wirkstoffverbundenen Genexpressionssystemen ist vor allem durch die Nutzung kleiner Moleküle für den Einsatz geeignet und ermöglicht so die Kontrolle der Gentranskription. Die Verwendungsmöglichkeit der Systeme wurde *in vitro* und in transgenischen Mäusen bereits nachgewiesen. Jedoch besteht die Erforderlichkeit weiterer Versuche, um die Systeme für die Anwendung in der Genterapie beherrschbarer zu machen (Harvey and Caskey 1998).

Bei der Wirkstoffapplikation erfolgt eine Dimerisation zwischen der DNA-bindenden Domäne und einer aktivierenden Domäne, wodurch die Transgentranskription erfolgt (Haviv and Curiel 2001). Die Verwendung des Tet-Systems erfolgte, um die Expression von zytotoxischen- sowie Reporter genen zu hemmen und zu induzieren (Imhof *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2000). Die maximalen Transgenexpressionswerte nach

der Induktion erreichten vergleichbare Werte wie die mit dem CMV-Enhancer/Promotor erzielten Ergebnisse (Abruzzese *et al.* 1999).

Transkriptionaler Mechanismus	Promotor	Zieltumor	Transgen
Induktion	EGR-1	Gliomakrebs	TNF- α oder TK
	Hsp70	Prostatakrebs	CD und HSV-TK
	Hsp70	Brustkrebs	HSV-TK
	Hsp70	Melanom	IL-12 oder TNF- α
	Grp78	Fibrosarkom	HSV-TK
	MDR-1	Brustkrebs	TNF- α

Tab. 1-3. Transkriptionale Regulation von auf Induktion basierter Tumorgentherapie

1.5 Molekulare Mechanismen des Zelltodes

Das Absterben von Zellen kann durch verschiedene molekulare Mechanismen erfolgen und über eine Reihe unterschiedlicher Signaltransduktionswege eingeleitet werden. Durch welchen dieser Mechanismen der durch Suizidgentherapie induzierte Tod von Tumorzellen bewirkt wurde, ist bisher noch nicht bekannt. Für die Aufklärung dieser Frage existiert neben dem theoretischen auch ein klinisches Interesse, da die Art des Zelltodes die immunmodulatorische Wirkung der Suizidgentherapie beeinflussen kann (Melcher *et al.* 1998). Außerdem kann eine Abhängigkeit des Suizidgeneffektes von einzelnen Signaltransduktionswegen der Zelltodinduktion Hinweise auf mögliche Mechanismen einer Therapieresistenz liefern.

Zellen können grundsätzlich durch zwei verschiedene Mechanismen absterben, die einerseits als Nekrose (*nekr-*: Abgestorben; *-osis*: Krankhafter Zustand) und andererseits Apoptose (*apo-*: Ab-; *-ptosis*: Fall) bezeichnet werden (Majno and Joris 1995). Während die Nekrose eine passive Reaktion der Zelle auf eine Schädigung darstellt, ist die Apoptose ein von der Zelle aktiv gesteuerter Prozeß. Die beiden Vorgänge werden deshalb auch als unfallverursachter Zelltod (*accidental cell death*), bzw. programmierter Zelltod (*programmed cell death*) beschrieben. Beide Arten des

Zelltodes unterscheiden sich hinsichtlich der molekularen und morphologischen Veränderungen der betroffenen Zellen (Abb. 1-8). Die Nekrose wird durch physikalisch-chemische Einflüsse wie Verletzung, Verbrennung, Verätzung, Ischämie und toxische Substanzen induziert. Diese verursachen einen Ausfall der membranständigen Ionenpumpen, der zum osmotischen Anschwellen des Zellkerns, der Mitochondrien und der Zelle als Ganzem führt. Im weiteren Verlauf wird der Zellkern aufgelöst (*Karyolyse*) und die DNA degradiert. Schließlich geht die Integrität der Zellmembran verloren und es kommt zur Lyse der Zelle. Dabei werden Arachidonsäurederivate und andere zelluläre Bestandteile freigesetzt, die eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen. Durch diese inflammatorische Komponente sowie durch die Freisetzung von antigenen Peptiden aus den lysierten Zellen kann die Induktion einer antitumoralen Immunantwort begünstigt werden (Melcher *et al.* 1998). Die Apoptose dagegen ist ein physiologischer Vorgang, der u. a. im Rahmen der Embryonalentwicklung, der Geweberegeneration, der Beendigung einer Immunantwort und der Beseitigung genetisch geschädigter Zellen auftritt. Mikroskopisch lässt sich im Gegensatz zur Nekrose eine Schrumpfung und Verdichtung der Zelle und des Zellkerns mit einer Kondensation des Chromatins beobachten (*Pyknose*). Die DNA wird von speziellen DNasen internukleosomale gespalten und der Zellkern zerfällt schließlich (*Karyorrhexis*). Die Zelle bricht die Kontakte zu ihren Nachbarzellen ab und löst sich aus dem Zellverband heraus. Es kommt zu Ausstülpungen der Zellmembran (*Zeiose* oder *budding*) und zur Abschnürung von Vesikeln, den sog. Apoptosekörpern. Die Apoptosekörper sowie der verbliebene Zellrest werden aufgrund spezifischer Membranveränderungen wie der Exposition von Phosphatidylserin umgehend von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt im gesamten Verlauf der Apoptose die Zellmembran intakt, so dass eine Entzündung durch freigesetzte Zellbestandteile verhindert wird.

Die Apoptose ist ein energieabhängiger, genetisch regulierter Vorgang (White 1996). In seinem Verlauf kommt es zur Aktivierung eines Netzwerks von proteolytischen Enzymen, die als Caspasenkaskade bezeichnet wird (Thornberry and Lazebnik 1998). Die Caspasen bewirken den Tod der Zelle, indem sie u. a. die Zerstörung von Zytoskelettkomponenten wie Lamin A, die Spaltung von DNA-Reparaturenzymen wie PARP (Kaufmann *et al.* 1993) sowie die Aktivierung der für die DNA-Fragmentierung verantwortlichen Endonukleasen (Enari *et al.* 1998) bewirken. Die Auslösung der

Caspasenkaskade kann über verschiedene molekulare Mechanismen erfolgen, die in stressinduzierte und rezeptorvermittelte Signaltransduktionswege unterteilt werden. Der Signaltransduktionsweg der stressinduzierten Apoptose wird vor allem durch DNA-Schädigung z. B. nach Bestrahlung oder Zytostatikatherapie ausgelöst und involviert das Tumorsuppressorprotein p53. Die rezeptorvermittelte Apoptose ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von sog. Todesrezeptoren (z. B. Fas-Rezeptor) durch die die weitere Signaltransduktion eingeleitet wird.

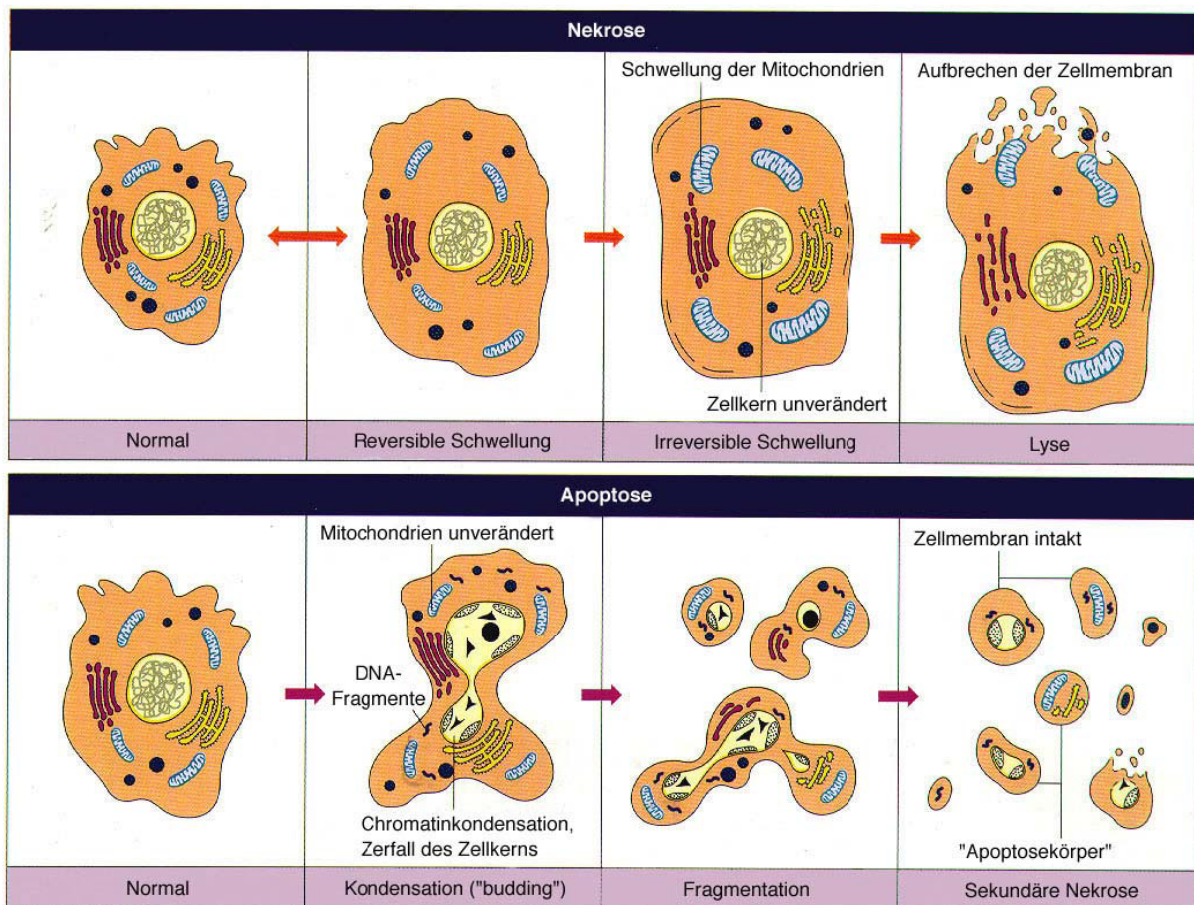


Abb. 1-8: Zellmorphologische Veränderungen bei Apoptose und Nekrose (modifiziert übernommen aus Wyllie AH, 1998)

1.5.1 Das Fas/FasL-System

Im Gegensatz zur stressinduzierten Apoptose kann die rezeptorvermittelte Apoptose über eine Reihe verschiedener Signaltransduktionswege induziert werden (Nagata

1997; Ashkenazi and Dixit 1998). Alle diesen Signaltransduktionswegen haben jedoch gemeinsam, daß sie durch die Aktivierung eines Todesrezeptors ausgelöst werden. Dies kann *auto* oder *parakrin* durch die betroffenen Zellen selbst oder durch eingewanderte zytotoxische T-Zellen geschehen. Die meisten Todesrezeptoren gehören der TNF-Rezeptorenfamilie an. Deren gemeinsames und maßgebliches Merkmal für die Signaltransduktion ist die intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*, DD).

Ein bedeutender Todesrezeptor der TNF-Rezeptorenfamilie ist Fas (CD95, APO-1), der unter anderem im Lebergewebe eine wichtige Rolle spielt (Galle and Krammer 1998). Fas wird von Hepatozyten konstitutiv exprimiert und ist an ihrer physiologischen Apoptose beteiligt. Eine Deregulierung des Fas-Systems ist bei einer Vielzahl von Lebererkrankungen involviert, wie z. B. der viralen Hepatitis und dem hepatozellulären Karzinom. Der Signaltransduktionsweg des Fas-Rezeptors ist bereits detailliert charakterisiert (Abb. 1-9, Nagata 1997; Ashkenazi and Dixit 1998). Bei der Aktivierung von Fas durch seinen Liganden FasL wird der Rezeptor trimerisiert. Dadurch kann sich intrazellulär das Adapterprotein FADD mit seiner Todesdomäne an die Todesdomäne des Rezeptors anlagern. FADD besitzt außerdem eine sog. Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED), die mit der Todeseffektordomäne der proenzymatischen Caspase 8 interagieren kann. Der Komplex aus Todesrezeptor, Adapterprotein und Caspase wird als todinduzierender Signalkomplex (*death inducing signaling complex*, DISC) bezeichnet. Die Zusammenlagerung des DISC führt zur proteolytischen Aktivierung der Caspase 8 und damit zur Auslösung der Caspasenkaskade.

Das Fas/FasL-System ist am zytotoxischen Effekt einer Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika in humanen und murinen Hepatomzellen beteiligt (Muller *et al.* 1997; Muller *et al.* 1998; Jiang *et al.* 1999). Ein Funktionsausfall des Fas/FasL-Systems kann in humanen Tumorzellen zur Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie führen (Fulda *et al.* 1997; Fulda *et al.* 1998). Daneben konnte bereits eine Abhängigkeit der Wirkung des Suizidgens TK vom Fas/FasL-System in murinen und humanen Tumorzelllinien demonstriert werden (Beltinger *et al.* 1999; Wei *et al.* 1999). Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um die Frage einer generellen Beteiligung des Fas/FasL-Systems an der Suizidgenwirkung auf humane Tumoren zu klären.

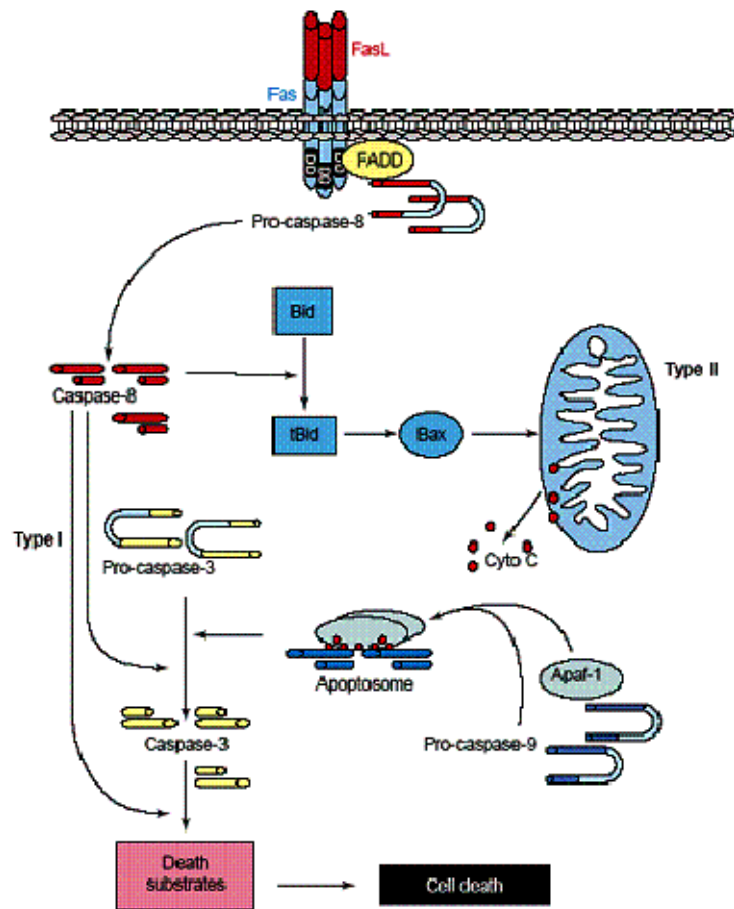


Abb. 1-9. Signaltransduktionsweg des Fas-Rezeptors. Wenn sich FasL an Fas bindet, wird die Rekrutierung von FADD und Pro-Caspase-8 zu dem zyttoplasmatischen Teil vom Fas induziert und DISC gebildet. In dem DISC wird Caspase-8 aktiviert. Bei den Zellen Typ I wird ausreichend Caspase-8 generiert, die Pro-Caspase-3 kann direkt aktiviert werden. Bei den Zellen Typ II erfolgt die Aktivierung der Caspase-3 indirekt durch die Bindung und Inaktivierung von Bid. tBid (*truncated Bid*) löst die freigesetzten proapoptotischen Moleküle des Membranzwischenraums der Mitochondria heraus. Das Zytochrom C (cyto C) wird freigesetzt, interagiert mit Apaf-1 und Pro-Caspase-9 unter Einbindung von ATP, die Caspase-9 wird aktiviert. Die aktivierte Caspase-9 bindet und aktiviert Caspase-3, dies löst eine Caspase-Kaskade aus, die im Zelltod endet (übernommen aus Houston *et al.* 2004)

1.5.1.1 Das Fas/FasL-System in Tumorzellen

Die Balance zwischen Zellteilung und Apoptose stellt eine Grundvoraussetzung für die biologische Homöostase dar. Tumorzellen besitzen eine Vielzahl an zellulären

Defekten sowie Onkogenaktivierungen, die in gesunden Zellen zur Induktion der Apoptose führen würden. Im Zuge der Selektion während der Tumorentstehung überleben jedoch insbesondere solche Tumorzellklone, die gegenüber den Apoptosesignalen weitgehend resistent sind. Diese Apoptoseresistenz zu durchbrechen ist ein Hauptanliegen neuer Ansätze in der Krebstherapie.

FasL wird in Zellmembranform (mFasL) oder in löslicher Form (*soluble*, sFasL) exprimiert. sFasL entwickelt sich aus mFasL und der Bindung mit Metalloproteasen (Kayagaki *et al.* 1995; Mariani *et al.* 1995). Tumorzelllinien reagieren auf den Fas-Reiz in unterschiedlicher Weise, je nach Zelltyp und Art der Fas-Stimulation (Algeciras-Schimmich *et al.* 2003). Mit einem in löslicher Form bestehenden FasL, charakterisiert von Nagata und Kollegen (Tanaka *et al.* 1995), wurden 58 Zelllinien vom *screening panel NCI160* getestet. Annähernd ein Drittel besaß die Fähigkeit den Apoptoseprozess zu aktivieren (Algeciras-Schimmich *et al.* 2003). Von diesen 22 Zelllinien erwiesen sich 11 Zelllinien (Typ II) als durch sFasL apoptoseempfindlich. Die überwiegende Anzahl der anderen 11 Zelllinien des Typs I entwickelte eine auf dem zytotoxischen Effekt von sFasL basierende Widerstandsfähigkeit (Algeciras-Schimmich *et al.* 2003). Diese Studie hat aufgezeigt, dass einige Tumoren auch dann keine effiziente Apoptose induzieren, wenn FasL hinzugegeben wurde.

Die Apoptoseinduktion durch Fas konnte in Tumorzellen erfolgen, die Nachweise konnten *in vitro* und *in vivo* erbracht werden (Trauth *et al.* 1989). Ein Tumor besitzt normalerweise Mechanismen, um die Apoptose, die den Tumor zerstört, zu eliminieren. Diese Mechanismen könnten in der Mutation von p53 oder der Blockierung der Expression von Genen, die in der Todessignalkaskade involviert sind, bestehen (Bullani *et al.* 2002; Reichmann 2002; Muschen *et al.* 2000a; Tschopp *et al.* 1998; Yang *et al.* 2003). Die Tumorzellen verhindern daneben die Expression der Caspase-8 durch die Methylierung der Promotorregion. Dadurch wird der Apoptoseweg durch Caspase-8 blockiert (Teitz *et al.* 2000).

Die Mutationen im Fas-Gen sind mit einer bestimmten Häufigkeit in humanen Tumoren aufgetreten (Muschen *et al.* 2000b). Es gelang der Nachweis, dass Zellen mit einer punktuellen Mutation im Fas-Gen eine Bindung mit FasL verhindern und sich deshalb eine Apoptoseresistenz entwickelten (Kischkel *et al.* 1995). In andere Tumorzellen ist die Fas-Expression blockiert. Dies ist in vielen Fällen ausreichend, um eine Apoptoseinduktion zu verhindern (Bullani *et al.* 2002).

Es kann auch vor soliden Tumoren mit einer erhöhten Expression von FasL, parallel mit einer Herabsetzung von Fas. Unter diesen Bedingungen sind Tumore widerstandsfähig gegen den Immunangriff von Lymphozyten (Viard-Leveugle *et al.* 2003).

1.5.1.2 Expression von FasL als Antitumorstrategie

Die Entscheidung über Apoptose oder Überleben der Tumorzelle beruht aber auf der Balance diverser pro- und antiapoptotischer Signale, so dass eine Apoptoseresistenz durch starke proapoptotische *Stimuli*, wie sie z. B. durch die direkte Expression der Todesliganden in den Tumorzellen darstellt, durchbrochen werden kann (Rubinchik *et al.* 2003; Nakanishi *et al.* 2003; Eberle *et al.* 2003).

Trotz der tragenden Bedeutung der Todesliganden bei der Abwehr von Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten sprachen einige Befunde der letzten Jahre in verschiedenen Tumorzelllinien für die Möglichkeit einer Umkehrung der Situation. Die Hypothese des sog. *tumor counter attack* basiert auf der Expression des CD95-Liganden durch die Tumorzellen bei gleichzeitiger Herabregulation des Rezeptors, was zur Eliminierung tumorinfiltrierender Lymphozyten und so zum Immunprivileg des Tumors führen kann (O'Connell *et al.* 1999; Hahne *et al.* 1996; Irmeler *et al.* 1997). In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass humane Melanomzelllinien sowie primär kultivierte Melanome keine Expression des CD95-Liganden aufwiesen. Zudem gab es in der Mehrzahl der Melanomzelllinien Hinweise auf eine Herabregulation des CD95-Rezeptors im Vergleich zu kultivierten normalen Melanozyten (Strater *et al.* 2001). In überzeugender Weise ließ sich ein *tumor counter attack* von Melanomzellen auch durch Transfektionsexperimente widerlegen: Die exogene Überexpression des CD95-Liganden löste in allen darauf untersuchten Melanomzelllinien Apoptose aus, während die Überexpression des Rezeptors ohne Effekt blieb (Eberle *et al.* 2003). Es bestehen also nach aktuellen Erkenntnissen für den *tumor counter attack* in Melanomzellen keine überzeugenden Indizien. Vielmehr stellen der CD95-Ligand und andere Todesliganden hochaktive Werkzeuge für Antitumorstrategien dar. Ein hohes proapoptotische Potential exogener CD95L-Expression wurde bereits für verschiedene maligne Zellpopulationen demonstriert:

- In Maus-Nierenkarzinomzellen konnte erstmals demonstriert werden, dass induzierte Expression eines CD95L-Apoptose *in vitro* sowie eine Tumorregression *in vivo* auslöst. Darüber hinaus gab es Hinweise auf eine weitere Bedeutung des CD95L als Immunmodulator durch Anziehung von Neutrophilen (Arai *et al.* 1997).
- Für Prostatakarzinomzellen ließ sich ihr malignes Wachstum in Nacktmäusen durch adenovirale Expression des CD95-Liganden effektiv verhindern bzw. Tumorregression induzieren (Hedlund *et al.* 1999).
- In Gliomzellen zeigte die Kombination von AdV-p53 und AdV-CD95L synergistische Effekte, was auch auf eine Kombination von CD95L mit Chemotherapeutika hoffen läßt, die über den p53-Weg ihre Wirkung entfalten (Shinoura *et al.* 2000).
- Für subkutan wachsende Leukämiezellen führte die Infektion mit AdV-CD95L zu reduziertem Tumorwachstum sowohl in CD95 exprimierenden als auch in CD95⁻ defizienten Tumoren. Dies deutet auf eine zusätzliche Anziehung von Entzündungszellen durch CD95L hin (Igney *et al.* 2003).
- In Gliomzelllinien erbrachte der Vergleich von CD95L und TRAIL hinsichtlich ihrer zytotoxischen Effektivität die besten Ansprechraten bei Kombination beider Todesliganden (Rubinchik *et al.* 2003).
- Für humane Melanomzellen konnten wir erstmals zeigen, dass die Expression des CD95L effizient Apoptose *in vitro* auslösen sowie im Mausmodell Melanomwachstum verhindern kann. Nach der Expression des CD95-Liganden zeigte sich eine weitreichende Sensibilisierung der Melanomzellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (Eberle *et al.* 2003).

Die bestehenden Untersuchungen zu FasL stellen ihre hohe Effektivität gegen Tumorzellen heraus. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass sie unabhängig vom p53-Apoptoseweg agieren, der in den meisten Tumoren blockiert ist (Satyamoorthy *et al.* 2001). Dies läßt darauf hoffen, dass sich die Effektivität replikationskompetenter Adenoviren in Tumorzellen durch die Expression von Todesliganden in entscheidender Weise verstärken läßt.