

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Ursachen, die zum Verlust der Spezifität der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren (ttsP) nach deren Integration in ein Adenovirusgenom führen und in welcher Form dadurch die Virusreplikation beeinflusst wird. Basierend auf dem Nachweis der unterschiedlichen Einwirkung viraler und nicht viraler Faktoren, konnte die Spezifität der Virusreplikation optimiert werden.

Weiterhin erwies sich die Entwicklung eines replikationsdefizienten Adenovirus (rdAdV), welches durch zusätzliche Insertion eines proapoptotischen Dox-regulierbaren Gens Tumortoxizität erzielte, als vielversprechender Strategieansatz für die Tumorthherapie.

1. Nach dem Einsatz der ttsP in einem Luciferase-exprimierenden rdAdV zeigten die ttsP im Vergleich mit den entsprechenden zellulären Promotoren eine nur bedingte Zellspezifität (Expression auch in Nicht-Targetzellen). Die folgenden unterschiedlichen Elemente beeinflussten die ttsP-Aktivität:

Der sich in der *5'-terminal adenoviral sequence* befindliche virale E1A-Enhancer transaktivierte alle vier untersuchten Promotoren (CEA, SPB, Tyr und AFP).

Die Insertion von transkriptionalen Regulatorsequenzen in der ttsP-Region führte zum Teil zu einer Veränderung der Promotoraktivität. Einerseits erhöhte ein muriner Tyrosinase-Enhancer (2mE-Tyr-Enhancer) die Tyrosinase-Promotoraktivität, andererseits zeigte ein humaner Tyrosinase-Enhancer (2hE-Tyr-Enhancer) dagegen keine Wirkung. Das [HRE]-Element hemmte die AFP-Promotoraktivität. Diese Unterschiede wirkten sich in gleichem Maße auf die ttsP-AdV-Replikation aus.

Durch die unspezifische ttsP-Aktivität exprimierte das bedingt replikationskompetente Adenovirus (Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}) das E1A(13S)-Protein in Nicht-Targetzellen. Dieses Protein vermittelte die Transaktivierung der ttsP und führte durch Autoaktivierung zu einer verstärkten E1A(13S)-Expression sowie zu erhöhter Virusreplikation (Abb. 4-1).

2. Um eine externe Regulation der Transgenexpression im ttsP-AdV zu ermöglichen, wurde das Tetrazyklin-abhängige Genexpressionssystem (Tet-System) eingeführt.

Durch dieses System gelang die Steuerung der *ttsP*-Aktivität sowie die hiervon abhängige *ttsP*-RRCA-Replikation. Der gleichzeitige Einsatz von Transaktivator (rtTA-M2) und Silencer (tTS) bewirkte die höchsten Regulationsraten des Transgens. Der Doxyzyklin (Dox)-kontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) unterdrückte die unspezifische *ttsP*-Aktivität sowie die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der *ttsP*. Dadurch konnte die *ttsP*-RRCA-Replikation zwar begrenzt, jedoch nicht vollständig blockiert werden. Im Ergebnis bietet die Verwendung des Tet-Systems in der *ttsP*-RRCA eine nur begrenzte Sicherheit für die Nutzung in der Tumorthherapie.

3. Als weiteren möglichen Therapieansatz wurde die Anwendung des proapoptotischen FasL-Gens in einem Adenovektor getestet. Durch das Dox-induzierbare Tight-Genexpressionssystem (erzielt durch die Veränderung von Spacer-Sequenzen im tetO₇-Operon sowie Verkürzung des CMV_{min}-Promotors vom TRE-Genexpressionssystem) gelang eine optimierte Regulation der FasL-Expression. Der entwickelte replikationsdefizienten Adenovirus Ad5Tight-FasL verursachte nach der Dox-Induktion durch die FasL-Expression eine effektive Apoptose in der Zelllinie HeLa, wobei in nicht induzierten Bedingungen im Gegensatz zum TRE-System keine Apoptose nachzuweisen war.

In den Lungenkarzinomzellen H441, BEN und DMS53 gelang der Apoptosenachweis durch die Verwendung von Ad5Tight-FasL. Die Effektivität im Vergleich zu HeLa-Zellen war allerdings 200- bis 400-fache geringer. Insofern besteht eine relative Resistenz der untersuchten Lungenkarzinomzellen gegen FasL-induzierte Apoptose. Die Insertion des FasL-Gens in einen onkolytischen Adenovektor könnte dieses Problem beheben, weil sich durch Virusreplikation die Transgenmenge erhöht. Weiterführende Untersuchungen, die auf den spezifischen Eigenschaften des FasL-exprimierenden onkolytischen Adenovektors basieren, könnten somit die Eignung für die Krebstherapie erweisen.