

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin und
der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie des
Universitätsklinikums *Benjamin Franklin* des
Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

**Entwicklung und Evaluierung eines Doxyzyklin-abhängigen
adenoviralen Vektor-Replikations-Systems für den Einsatz
in der Tumorentherapie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Siemetzki
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2002

Journal-Nr.: 2652

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. M.F.G. Schmidt

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Ludwig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Poller

Dritter Gutachter: Prof. Dr. D. Ebner

Tag der Promotion: 6. Dezember 2002

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	8
2.1. Adenoviren	8
2.1.1. Taxonomie, Morphologie und Genom.....	8
2.1.2. Replikationszyklus	10
2.1.3. Adenovirale Vektorsysteme	14
2.2. Replikationskompetente Adenoviren (RCA)	15
2.2.1. Entstehung und Vorkommen	15
2.2.2. Kartierung und Bedeutung der E1-Region	16
2.3. Einsatz adenoviraler Vektoren in der Tumor-Gentherapie	20
2.3.1. Transgene und ihre Wirkung.....	20
2.3.2. Verwendung tumorzellspezifischer Promotoren.....	24
2.3.3. Vektorbindung an tumorzellspezifische Rezeptoren	27
2.4. Restricted-Replikationskompetente-Adenoviren (RRCA) in der Tumor- Gentherapie.....	29
2.4.1. Tumorzellspezifität und Effizienz der Therapie bei Verwendung unterschiedlicher RRCA-Varianten	29
2.4.2. Kombination von RRCA und AdV	38
2.5. Induzierbare Genexpressionssysteme	39
2.5.1. Tetrazyklin-induzierbare Transgenenexpression	41
2.5.1.1. Tet-On/Tet-Off	42
2.5.1.2. Tetrazyklin-kontrollierter transkriptionaler Silencer	47
2.5.2. Progesteron-induzierbares System.....	50
2.5.3. Ekdysol-induzierbares System	52
2.5.4. Rapamycin-induzierbares System	52

3. Material und Methoden	54
3.1. Untersuchungsmaterial	54
3.1.1. Versuchstiere.....	54
3.1.2. Zellkulturen	54
3.2. RNA- und DNA-Präparation	56
3.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit RNAClean™	56
3.2.2. Präparation von genomischer DNA aus Zellen	56
3.2.3. Quantifizierung der RNA- und DNA-Ausbeute	57
3.3. DNA-Analyse.....	57
3.3.1. Amplifikation spezifischer DNA durch die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	57
3.3.2. Agarose-Gelelektrophorese	58
3.3.3. Restriktionsfragment-Analyse	59
3.3.4. Quantitative PCR	60
3.3.4.1. Konstruktion eines verkürzten DNA-Längenstandards	60
3.3.4.1.1. Herstellen der benötigten Fragmente mittels PCR.....	61
3.3.4.1.2. Overlap-PCR und Analyse des Längenstandards	63
3.3.4.2. Kompetitive PCR	63
3.3.4.3. Nachweis der Produkte mittels GeneScan-Analyse.....	63
3.3.5. DNA-Sequenzierung.....	64
3.4. RNA-Analyse.....	65
3.4.1. Reinheit und Qualität der präparierten RNA	65
3.4.2. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden mittels „PCR-like“-Markierung..	65
3.4.3. Northern-Blot	66
3.4.4. Hybridisierung.....	67
3.4.5. Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte.....	69
3.5. Bestimmung der Transgenexpression.....	69
3.5.1. Luciferase-Assay	69

3.5.2.	Cell-Killing-Assay/Vitalitätstest.....	69
3.5.3.	Nachweis der GFP-Expression.....	70
3.6.	Gewinnung und Präparation der histologischen Gewebsschnitte.....	70
3.6.1.	Paraffineinbettung.....	70
3.6.2.	Herstellen der histologischen Gewebsschnitte	71
3.7.	Viruskonstruktion und -präparation.....	71
3.7.1.	PCR mit <i>Pwo</i> -Proof-Reading-Polymerase	71
3.7.2.	Plasmidkonstruktion.....	72
3.7.2.1.	Shuttle-Plasmide.....	72
3.7.2.2.	Ligation	75
3.7.2.3.	Transformation in <i>E. coli</i>	75
3.7.2.4.	Ausplattieren der Transformation und Picken der Klone.....	75
3.7.3.	Plasmidminipräparation	76
3.7.4.	Plasmidmidipräparation	76
3.7.5.	Ligation mit dem RR5-longarm	77
3.7.6.	Transfektion von HEK293 Zellen und Propagation der AdV	78
3.7.7.	Isolation der viralen DNA mittels Sorbianolyse	82
3.7.8.	PCR-screening	83
3.8.	Verwendete adenovirale Vektoren	83
3.9.	Adenovirale Transduktion von Zellen	84
3.10.	Plasmid-Transfektion.....	85
4.	Ergebnisse	86
4.1.	Übersicht über den Aufbau der Ergebnisfindung.....	86
4.2.	Analyse der konstruierten AdV.....	87
4.2.1.	Nachweis der spezifischen cDNAs und der RCA-Freiheit.....	87
4.2.2.	Nachweis der spezifischen mRNA-Expression der Transgene.....	89

4.3.	Molekulare Analyse der RCA-vermittelten <i>Trans</i> -Komplementierung replikationsdefizienter AdV <i>in vitro</i>	89
4.3.1.	Untersuchungen zur Genexpressionssteigerung durch RCAs.....	89
4.3.2.	Nachweis der RCA-vermittelten AdV-Replikation	91
4.3.2.1.	Evaluierung der Q-PCR	91
4.3.2.1.1.	Analyse und Sequenzierung des konstruierten Längenstandards	91
4.3.2.1.2.	Ermittlung der in der quantitativen PCR einzusetzenden Menge an Luciferase- und GAPDH-Standard.....	93
4.3.2.1.3.	Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die quantitative PCR	93
4.3.2.2.	Die RCA-vermittelte AdV-Replikation am Beispiel von EA.hy926.....	94
4.4.	Untersuchungen zur RCA-vermittelten Transgenexpressionssteigerung und den damit einhergehenden Pathomechanismus <i>in vivo</i>	95
4.4.1.	Nachweis der Luciferase-Expression.....	95
4.4.2.	Untersuchungen auf Gewebsschädigung und Entzündungsreaktionen mit Hilfe histopathologischer Schnitte.....	96
4.5.	Funktionalität des Ad5-pTRE-13S-bgh im Vergleich zum RCA.....	98
4.5.1.	Expression der E1A-13S-mRNA in verschiedenen Zelllinien.....	98
4.5.2.	Vergleich der Transgenexpressionssteigerung zwischen der Koinfektion des Ad5-pTRE-13S-bgh und einem RCAs in verschiedenen Zelllinien	99
4.5.3.	E1A-13S-vermittelte Induktion der Zelllyse	102
4.6.	Tet-regulierbare adenovirale Genexpressions- und Replikationssysteme....	104
4.6.1.	<i>Das AdV-rtTA-System</i>	104
4.6.1.1.	Mechanismus der Transgenexpression	104
4.6.1.2.	Dosis- und zellspezifische Regulierbarkeit der Transgenexpression	105
4.6.1.3.	ON-OFF-Mechanismus im AdV-rtTA-System	107
4.6.1.4.	Untersuchung zur Basalinduktion des AdV-Tet-On Systems.....	108
4.6.1.5.	Vergleich von CMV-Promotor- und Tet-On-vermittelter Genexpression .	108
4.6.2.	<i>Das AdV-rtTA-RRCA-System</i>	109
4.6.2.1.	Fehlende Regulierbarkeit der Ad5-pTRE-13S-bgh-Transgenexpression	109
4.6.2.2.	Untersuchungen zur E1A-13S-Autoaktivierung des Systems	114

4.6.2.3.	Bedeutung der adenoviralen CR3-Domäne hinsichtlich der Aktivierung heterologer Promotoren	115
4.6.3.	<i>Das AdV-rtTA-tTS-RRCA-System</i>	116
4.6.3.1.	Suppression der Basalexpression im AdV-rtTA-System	116
4.6.3.2.	Suppression der Basalexpression im AdV-rtTA-RRCA-System	118
4.6.3.3.	Regulation der E1A-13S-mRNA-Expression nach Koapplikation des Ad5CMV-tTS	121
4.6.3.4.	Effekte des Ad5CMV-tTS auf die adenovirale DNA-Replikation	122
4.6.3.5.	Vergleich der Regulierbarkeit der Tumorzelldestruktion mittels Dox am Beispiel von EA.hy926 Zellen	126
4.6.3.6.	Dox-abhängige Kontrolle der AdV-Replikation (ON-OFF)	127
4.6.4.	Untersuchungen zur gewebsspezifischen Protektion unter Anwendung des Ad5hAAT-tTS	128
4.6.4.1.	Vergleich der Expression des hAAT-Promotor-kontrollierten tTS in verschiedenen Zelllinien	129
4.6.4.2.	Transaktivierung des leberzellspezifischen hAAT-Promotors durch Ad5-pTRE-13S-bgh	131
5.	Diskussion	139
5.1.	Bedeutung der Replikationsfähigkeit adenoviraler Vektoren im Einsatz in der Tumorgentherapie	139
5.2.	Externe Kontrollierbarkeit eines adenoviralen Vektor-Replikations-Systems	142
5.3.	Reduktion der Basalexpression mittels des Tetrazyklin-kontrollierbaren transkriptionalen Silencers (tTS) im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System	148
5.4.	Gewebsprotektion mittels spezifischer Promotoren	152
6.	Zusammenfassung	158
7.	Summary	160
8.	Literaturverzeichnis	162

9. Anhang	178
9.1. Verwendete Primer.....	178
9.2. Plasmidkarten.....	179
9.3. Verwendete Geräte	182
9.4. Verzeichnis der Abkürzungen.....	183
Danksagung	185
Selbstständigkeitserklärung	186
Lebenslauf	187
Eingereichte Veröffentlichungen	188

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ludwig und Herrn Prof. Dr. Poller danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft, besonders Herrn Prof. Dr. Poller für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas innerhalb seiner Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Benjamin Franklin des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. H. Fechner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Poller für die Überlassung des Themas und den Beistand bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit sowie Frau Xiaomin Wang für die enge Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte Hilfe bei chemischen und zellbiologischen Fragestellungen danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolph bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Anfertigung der histologischen Schnitte im Institut für Veterinär-Pathologie.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, die durch Geduld, hilfreiches Zuhören und beständige Unterstützung maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, Juli 2002

.....

(Ulrike Siemetzki)

Lebenslauf

Name: Ulrike Siemetzki
Geburtsdatum: 16.02.1975
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung:

a) Schulausbildung:

1981-1985 Besuch der Herz-Jesu Grundschule (Berlin-Charlottenburg)
1985-1994 Besuch des Canisius-Kollegs (Gymnasium) zu Berlin
14.06.1994 Allgemeine Hochschulreife

b) Studium:

Seit WS 94/95 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
05.09.1996 Physikum
06.10.1997 1. Staatsexamen
22.09.1998 2. Staatsexamen
09.03.2000 3. Staatsexamen

c) nach Abschluß des Studiums:

Juni-August 2000 Praktikum in der AG Prof. Dr. Poller am Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin-Steglitz

04.09.2000 Beginn der Arbeit an der Promotion

18.03.-31.07.2002 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin; FU Berlin, UKBF – Abt. für Kardiologie, AG Prof. Dr. Poller

Eingereichte Veröffentlichungen

nach freundlicher Genehmigung durch die Promotionskommission des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sind Teile dieser Dissertation vorab zur Veröffentlichung eingereicht worden:

Fechner, H., Wang, X., Srour, M., Siemetzki, U., Seltmann, H., Sutter, A., Scherübl, H., Zouboulis, C., Schwaab, R., Hillen, W., Schultheiss, H.-P., and Poller, W.

A Tetracyclin-Controlled, Tumor-Selective, Restricted Replication Competent Adenovirus Vector System for Improved Safety of Cancer Gene Therapy. *PNAS*, eingereicht 2002.

Srour, M., Fechner, H., Wang, X., Siemetzki, U., Albert, T., Oldenburg, J., Watzka, M., Hanfland, P., Poller, W., Brackmann, H.-H., and Schwaab, R.

Regulation of Expression of Human Factor IX Using an Adenovirus-Mediated Doxycyclin-Inducible Gene Expression System. *Blood*, eingereicht 2002.