

4 Diskussion

Adenoviren sind grundsätzlich einfache Lebensformen, die dennoch den effizienten Transfer genetischer Information ermöglichen. Sie besitzen eine hohe Aufnahmekapazität für Fremdgene und die Möglichkeit zur Präparation hoher Virustiter (Flotte 1993). Diese Merkmale bildeten den Ansatz für die Entwicklung rekombinanter viraler Vektoren zu Inhibierung des Wachstums von Krebszellen. Replikationsdefiziente Adenovektoren (rdAdV) wurden in der Tumorthherapie eingesetzt, in dem sie als *carrier* für tumortoxische Gene dienten. *In vivo*-Studien zeigten allerdings eine nur geringe Inhibierung des Tumorwachstums, was sich darauf zurückführen ließ, dass nur primär mit dem rdAdV infizierte Tumorzellen zerstört wurden, während nicht infizierte Tumorzellen überlebten (Alemany *et al.* 2000a). Der Einsatz bedingt replikationskompetenter Adenovektoren (RRCA) sollte diese Einschränkung umgehen, da RRCA sich aufgrund ihrer Replikationskompetenz auch auf primär nicht infizierten Tumorzellen ausbreiten und diese durch Viro-Onkolyse zerstören können (Chu *et al.* 2004). Ein entscheidender Schritt zur Entwicklung tumorselektiver RRCA ist die Steuerung adenoviraler Replikationsgene, insbesondere E1A, durch tumorzell- und gewebespezifische Promotoren (ttsP) (Alemany *et al.* 2000a; Hallenbeck *et al.* 1999; Post *et al.* 2003). Dadurch sollte eine auf Tumorzellen begrenzte selektive RRCA-Replikation erzielt werden. Einige Studien zeigten allerdings, dass RRCAs, deren Replikation durch ttsPs gesteuert wurde, sich auch in Nicht-Targetzellen vermehren konnten (Li *et al.* 2003; Huang *et al.* 2003). Die Gründe für die mangelnde Spezifität blieben dabei allerdings unklar.

In dieser Studie wurde deshalb zunächst der Frage nachgegangen, welche Faktoren einen Einfluss auf die unspezifische Aktivität der ttsP ausüben, und inwieweit dies ein Grund für die unspezifische Virusreplikation sein könnte.

Anschließend folgte die Erarbeitung einer Strategie zur Hemmung der unspezifischen ttsP-RRCA-Replikation mittels Tet-On-System. Vorangegangene Experimente anderer Untersucher hatten gezeigt, dass der Tetrazyklin-abhängige transkriptionale Silencer (tTS) die Hintergrundaktivität des Tetrazyklin response Element (TRE)-Promotors reduzieren konnte (Salucci *et al.* 2002). Fraglich war, ob sich dieser Effekt auch bei Verwendung von ttsPs zeigte und ob dadurch die unspezifische Replikation der ttsP-RRCA blockiert werden konnte.

Basierend auf den Erfahrungen mit dem Tet-System im Rahmen der oben erwähnten Untersuchungen wurde schließlich verschiedene neue TRE-Promotoren zur Expression des pro-apoptotischen Fas-Ligand in rdAdV inseriert und diese Vektoren im Rahmen eines therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Lungenkarzinomen *in vitro* getestet. Der Fas-Ligand (FasL) aktiviert bei der Bindung an seinen Rezeptor (Fas) eine Signalkaskade, die zur Apoptose der Zelle führt. Da sich die Fas-FasL-Interaktion als stöchiometrisch erwies, könnte sich die Effizienz des Vektors durch die Erhöhung der FasL-Expression in transduzierten Zellen verbessern. Eine Regulation der Genexpression des Todesliganden FasL im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes erscheint auch deshalb wünschenswert, um potentiell mögliche FasL induzierte Nebenwirkungen auf Normalgewebe zu minimieren.

Der Einsatz der von uns erstmals verwendeten neuen TRE-Promotoren (Tight- und TightTATA-Promotor) führte zu einer deutlich verringerten Basalaktivität des Tet-On-Systems im Vergleich zum originären Tet-On-System (Sipo *et al.* 2006). Mit dem neu entwickelten Tight-Promotor sollte die Hintergrundexpression des rekombinanten FasL-Gens vermieden und damit der Einsatz des Adenovirus mit dem proapoptotischen Gen sichergestellt werden.

4.1 Untersuchung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren

Die selektive Replikation von RRCA in Tumorzellen wird auf verschiedenen Ebenen angestrebt. ttsPs erwiesen sich einerseits für die spezifische RRCA-Replikation geeignet, andererseits zeigte sich jedoch eine begrenzte Selektivität der ttsP-RRCA-Replikation (Nettelbeck *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Huang *et al.* 2003). Beispielsweise ergab die Verwendung von Tyrosinase-Promotoren in RRCA zur selektiven Replikation in Melanomzellen unterschiedliche Ergebnisse: Während ein Konstrukt mit zwei murinen Enhancer-Elementen keine melanomspezifische Replikation vermitteln konnte (McCart *et al.* 2002), gelang die melanomspezifische Replikation bei Verwendung von zwei humanen Enhancer-Elementen (Nettelbeck *et al.* 2002). Auch die Verwendung eines hTERT-Promotors in RRCA führte zu einer unerwartet hohen unspezifischen ttsP-RRCA-Replikation, trotz der zuvor nachgewiesenen Promotorzellspezifität.

Um eine detaillierte Analyse möglicher adenoviraler Faktoren vornehmen zu können, die zu einer Beeinflussung der *ttsP*-Aktivität beitragen könnten wurden eine Reihe von *ttsP* in die E1 Region eines rdAdV inseriert. Dazu zählten folgende *ttsP*-Konstrukte: CEA-Promotor (Li *et al.* 2003), hTyr2E/P-Promotor (Lillehammer *et al.* 2005), SPB-Promotor (Bohinski *et al.* 1993) und der [HRE]AFP-Promotor (Takahashi *et al.* 2002). Die Aktivität der im Adenovirusgenom integrierten *ttsP* war deutlich geringer als die des ubiquitären CMV_{min}-Promotors. Ausschließlich der hTyr2E/P-Promotor in der Targetzelllinie MeWo erreichte die Stärke des CMV_{min}-Promotors in nicht induziertem Zustand (Abb. 3-4). Demnach würde wahrscheinlich die Effektivität der *ttsP*-rdAdV nicht für eine komplette Reduktion der Tumorgröße ausreichen. Mittels Nutzung von Enhancer-Elementen in der Promotorregion oder Verwendung eines RRCA könnte die Möglichkeit bestehen, dieses Problem zu umgehen. Als Ergebnis sollte eine Verstärkung der *ttsP*-Aktivität, eine Erhöhung der Menge des Transkriptes und dadurch eine Steigerung der Vektoreffizienz erreicht werden.

Mit Ausnahme des CEA-Promotors konnten die höchsten Aktivitäten der *ttsP* in den jeweiligen Targetzellen gemessen werden (Abb. 3-4). Die *ttsP* erwiesen sich somit als zelltypspezifisch. Trotz der strikten Selektivität der entsprechenden endogenen Promotoren (Abb. 3-1) ließen sich erhebliche Schwankungen der *ttsP*-Aktivität feststellen. Mit der Integration der Promotoren in das Adenovirusgenom ging die Spezifität teilweise verloren. Der mögliche Einfluss, der sich innerhalb des Adenovirusgenoms befindlichen Elemente wurde deshalb Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die unspezifische Aktivität des CEA-Promotors erwies sich in dieser Arbeit als ausreichend, um eine effektive virale Replikation und Zytotoxizität in der Nicht-Targetzelllinie HeLa zu induzieren (Abb. 3-9, Abb. 3-10, Abb. 3-11). In anderen Studien über den CEA-Promotor beinhaltende regulatorische Elemente oder multimerisierte CEA-Promotoren wurde eine höhere Spezifität gemessen (Richards *et al.* 1995). Der in diesen Versuchen verwendete unvollständige CEA-Promotor könnte dessen verringerte Spezifität begründen.

Der SPB-Promotor hatte eine 32-fach geringere Aktivität in HeLa-Zellen als der CEA-Promotor und der mit dem SPB-Promotor konstruierte RRCA induzierte als Folge eine bis zu 28-fach geringere RRCA-Replikation sowie eine 8-fach geringere Zytotoxizität als der mit dem CEA-Promotor konstruierte RRCA (Abb. 3-9, Abb. 3-10, Abb. 3-11). In H441-Zellen (Targetzelllinie des SPB-Promotors) erwies sich die SPB-

Promotoraktivität als 8-fach höher als in HeLa-Zellen und die Replikation des SPB-Promotorabhängigen RRCA stieg in gleichem Maße. Während der CEA-Promotor in der unspezifischen Aktivität und der CEA-promotorabhängige RRCA in der Replikation kaum Änderungen zeigte.

Aus dem Zusammenhang zwischen den Unterschieden in der Promotoraktivität und den Unterschieden bei der RRCA-Replikation bei CEA- und SPB-Promotor, könnte gefolgert werden, dass die unspezifische Promotoraktivität der maßgebliche Grund für die unspezifische RRCA-Replikation ist. Im Ergebnis wäre die Verwendung von *ttsP* mit minimaler unspezifischer Aktivität eine entscheidende Bedingung für eine effiziente Hemmung der *ttsP*-RRCA-Replikation in Nicht-Targetzellen.

Die beobachtete höhere Unspezifität des CEA-Promotors könnte auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen sein. Einer dieser möglichen Faktoren stellt dabei der adenovirale E1A-Enhancer dar. Um die Wirkung des E1A-Enhancers auf *ttsPs* näher zu charakterisieren wurde verschiedene *ttsP* an der Stelle des E1A-Promotors, d.h. zwischen dem adenoviralen Verpackungssignal (ψ , Nukleotiden 199 bis 316, (Hitt and Graham 1990)) und dem Translations-Start-Codon des E1A-Gens inseriert. Dadurch wurde der E1A-Promotor deletiert, jedoch nicht die E1A-Enhancer-Elemente, die in der Region um das Verpackungssignal vorkommen (Hearing and Shenk 1986). Andere Studien erbrachten den Nachweis, dass diese viralen Regulatorsequenzen die Aktivität von integrierten Promotoren beeinflussen können. Als Beispiel sei die Verstärkung der Aktivität eines heterologen metallinduzierbaren Promotors durch die E1A-Enhancersequenzen genannt (Steinwaerder and Lieber 2000). Hingegen blieb beim PSA- (Rodriguez *et al.* 1997) und MMTV-Promotor (Avvakumov and Mymryk 2002) die Aktivität unverändert.

Unsere Untersuchungen zeigten im Ergebnis diverse Steigerungen der unspezifischen Aktivität des CEA-, SPB-, Tyr-, und AFP-Promotors durch den adenoviralen E1A-Enhancer. Die Aktivität des CEA- und SPB-Promotors ließ sich deutlich erhöhen (jeweils um das 10- und 15-fache), während die Tyrosinase- und AFP-Promotoraktivität sich lediglich um das 3-fache steigerte (Abb. 3-6). Diese Resultate deuten darauf hin, dass bestimmte *ttsP* durch den E1A-Enhancer transaktiviert werden können, andere hingegen nahezu unbeeinflusst bleiben. Für eine erfolgreiche Therapie, ist eine selektive Virusreplikation jedoch von

maßgeblicher Bedeutung. Durch den Einsatz eines Poly(A)-Signals oder von spezifischen Insulatorsequenzen zwischen den E1A-Enhancer und der *ttsP* könnte dieses Problem umgegangen werden (Steinwaerder and Lieber 2000). Des Weiteren könnte ein größerer Abstand zwischen E1A-Enhancer und Promotor zusätzlich die transkriptionale Aktivität verringern. Diese Vermutung leitet sich aus unseren Beobachtungen beim Einsetzen einer Expressionskassette (in invertierter Richtung) zwischen den adenoviralen E1A-Enhancer und den SPB-Promotor in dem Adenovektor Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} ab. Die RRCA-Replikation erfolgte auf erheblich verringertem Niveau (Daten nicht gezeigt). So ist auszuschließen, dass allein durch die Reduzierung der Interaktion zwischen E1A-Enhancer und *ttsP* die unspezifische *ttsP*-RRCA-Replikation in Nicht-Targetzellen blockiert wird.

Die Ergebnisse zeigten zudem die Wirkung bestimmter in die Promotorregion eingeführter transkriptionaler Regulatorsequenzen auf die *ttsP*-Aktivität in Nicht-Targetzellen. Der mit dem Tyr-Promotor fusionierte murine Tyrosinase-Enhancer (2mE-Tyr-Enhancer) erhöhte die unspezifische Tyrosinase-Promotoraktivität um mehr als das 10-fache. Der humane Tyrosinase-Enhancer (2hE-Tyr-Enhancer) hingegen zeigte keine Wirkung auf die Promotoraktivität (Abb. 3-7). Diesbezüglich ist zu vermuten, dass sich diese Unterschiede in gleichem Maße auf die *ttsP*-RRCA-Replikation auswirken. Wie bereits von McCart *et al.* (2002) beschrieben, ließ sich die Virusreplikation des *ttsP*-RRCA, das den mit dem Tyr-Promotor fusionierten 2mE-Tyr-Enhancer enthielt, in Melanomzellen nicht begrenzen (McCart *et al.* 2002). Zudem gelang Nettelbeck und Kollegen der Nachweis, dass das *ttsP*-RRCA, welches den mit dem Tyr-Promotor fusionierten 2hE-Tyr-Enhancer enthielt, eine Spezifität für Melanomzellen zeigte (Nettelbeck *et al.* 2002).

Während die Verwendung eines Enhancer in Verbindung mit dem *ttsP* in *ttsP*-rdAdV notwendig sein könnte, um höhere Transgenexpressionsrate zu erreichen, ist dessen Nutzung in RRCA scheinbar nicht erforderlich. Im RRCA ist eine geringe *ttsP*-Aktivität offensichtlich ausreichend, um eine effiziente RRCA-Replikation zu bewirken (Doronin *et al.* 2001; Lanson, Jr. *et al.* 2003). Durch den Einsatz optimierter Enhancer besteht jedoch die Möglichkeit die Spezifität von *ttsP*-RRCA zu erhöhen (Li *et al.* 2003).

In unseren Versuchen zeigte sich, dass das mit dem AFP-Promotor fusionierte [HRE]-Element die unspezifische Aktivität erheblich hemmte (Abb. 3-5). Das [HRE]-

Element könnte zudem die Eigenschaft besitzen, die unspezifische *ttsP*-RRCA-Replikation zu reduzieren. Diese Folgerung bestätigte sich durch Untersuchungen von RRCA mit einem [HRE]-Element, das die TATA-Box in einem *rat prolactin*-Promotor (Cuevas *et al.* 2003) bzw. in einem CMV_{min}-Promotor (Post and Van Meir 2003) regulierte. Sofern sich das [HRE]-Element in nicht induziertem Zustand befand wurde die RRCA-Replikation gehemmt. Hingegen erfolgte die Replikation eines RRCA, der den CMV_{min}-Promotor ohne zusätzliche regulatorische Sequenzen enthielt, ähnlich wie die des Wildtyp Adenovirus (Fechner *et al.* 2003a).

Diese Ergebnisse lassen die Folgerung zu, dass sich die jeweils eingeführten transkriptionalen Elemente in der Promotorregion entweder aktivierend oder hemmend auf die Promotoraktivität auswirken können. Vor der Verwendung eines transkriptionalen Elementes in der Tumorthherapie ist deshalb zu untersuchen, welchen Einfluss das Element auf die Promotoren ausübt und ob dieser Effekt erwünscht ist.

In weiteren Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob und in welcher Form das E1A(13S)-Protein die *ttsP*-Transaktivierung vermittelt. Es ist bereits bekannt, dass das E1A(13S)-Protein sowohl virale als auch einige zelluläre Promotoren transaktivieren kann (Fechner *et al.* 2003b; Sassone-Corsi and Borrelli 1987; Rhoades *et al.* 1996). So wurde ein Preproendothelin-Promotor durch E1A(13S) transaktiviert, während ein homologer endogener Promotor unverändert blieb (Gaynor *et al.* 1984). Unsere Untersuchungen zeigten eine deutliche bis zu 147-fach E1A(13S)-induzierte Erhöhung der CEA-, SPB-, Tyr- und AFP-Promotoraktivität auf Plasmidebene (Abb. 3-6) und eine bis zu 88-fache auf der viralen Ebene (Tab. 3-3). Im Gegensatz dazu wiesen die homologen endogenen Promotoren keine Reaktion auf (Abb. 3-1). Die höchste Transaktivierung zeigte der AFP-Promotor, der bereits in mehreren *ttsP*-RRCA mit Erfolg eingesetzt wurde, da deren Zellspezifität erhalten blieb (Ohashi *et al.* 2001). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die E1A(13S)-vermittelte *ttsP*-Transaktivierung einen relevanten Grund für die unspezifische *ttsP*-RRCA-Replikation darstellt, es sei denn, der *ttsP* wies bereits vorher eine unspezifische Aktivität in Nicht-Targetzellen auf. In diesem Fall wird das E1A(13S)-Protein durch die *leaky*-Promotoraktivität von Anfang an exprimiert. Daraus folgt die Transaktivierung, die die eigene Expression durch Autoaktivierung-*positive feedback loop* steigert. Dieser Effekt führt zu einer unkontrollierten *ttsP*-RRCA-Replikation

(Abb. 4-1). Es zeigte sich eine 3-fach höhere E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung auf dem SPB-Promotor als auf dem CEA-Promotor. Dieser Unterschied entstand in gleicher Weise beim Einsatz der entsprechenden ttsP-RRCA in HeLa- und H441-Zellen. Die SPB-Promotoraktivität in H441-Zellen war 6-fach geringer als die CEA-Promotoraktivität. Die SPB-RRCA-Replikation steigerte sich dennoch bis auf das Niveau der CEA-RRCA-Replikation. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die E1A(13S)-Autoaktivierung für diese Inkongruenz verantwortlich ist. Die E1A(13S)-Autoaktivierung könnte auf der anderen Seite eine effiziente ttsP-RRCA-Replikation in Tumortargetzellen bewirken, sofern die ttsP die Selektivität behält. Die zunächst geringe E1A-Expression durch die in gleichem Maße geringe ttsP-Aktivität würde durch die Autoaktivierung deutlich erhöht. Diese Erhöhung würde eine effektivere ttsP-RRCA-Replikation in den Tumorzellen hervorbringen.

Die mit den ttsP fusionierten transkriptionalen Elemente beeinflussten daneben die E1A-vermittelte Transaktivierung. In gleicher Weise wie die transkriptionalen Elemente auf die Promotoren wirkten, beeinflussten sie die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung. In unseren Experimenten verursachte die Zugabe von E1A(13S) beim 2mE-Tyr-Promotor eine Steigerung der Aktivität um das 2.8-fache (Abb. 3-6). Sobald der Tyr-Promotor den 2hE-Tyr enthielt, war keine E1A(13S)-induzierte Transaktivierung nachzuweisen. Das [HRE]-Element konnte andererseits, sofern es vor dem AFP-Promotor platziert war, die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung blockieren (Abb. 3-6). Die Resultate der ttsP-Aktivität waren hinsichtlich der E1A(13S)-induzierten Transaktivierung sehr unterschiedlich. Allgemein ist zu schlussfolgern, dass eine Transaktivierung des ttsP im Adenovirusgenom erfolgte. Allerdings war eine verstärkte E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der ttsP in den Targetzelllinien nicht ersichtlich. Durch die Verwendung transkriptionaler Elemente konnte die Transaktivierung in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden.

Diese Untersuchungen belegten die Verwendbarkeit selektiver Promotoren in Tumorzellen, zeigten aber auch, wie kritisch unspezifische Promotoraktivitäten, auch in geringerer Stärke, zu bewerten sind und wie der Erfolg der komplexen Konstrukte von einer sorgfältigen vorausgehenden Analyse abhängt.

4.2 Einsatz des Tet-Systems zur Kontrolle der ttsP-RRCA-Replikation

Zur Vermeidung der unerwünschten unspezifischen ttsP-RRCA-Replikation ist die pharmakologische Kontrolle der Genexpression durch den Einsatz der sog. On/Off-Regulationssysteme getestet worden. Die Mehrheit dieser Systeme besteht aus zwei Expressionseinheiten: Eine enthält das zu untersuchende Gen unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, die andere beinhaltet ein konstitutiv exprimiertes Transaktivatorprotein, das an einen spezifischen Wirkstoff bindet und die Aktivierung oder Blockierung der induzierbaren Promotoraktivität vermittelt. Je nach Art des Induktors wurden bisher fünf verschiedene Systeme für den Einsatz in Säugetieren beschrieben: Das Tet-On/Off- (Gossen and Bujard 1992), das Pip-On/Off- (Fussenegger *et al.* 2000), das Antiprogestin- (Wang *et al.* 1997), das Ekdyson- (No *et al.* 1996) und das Rapamycinabhängige System (Rivera *et al.* 1996). Das Tet-On-System besitzt aus folgenden Gründen die besten Eigenschaften für den Einsatz an Patienten (Zabala *et al.* 2004): i) Der Induktor Doxzyklin (Dox) ist bei Menschen gut verträglich und wird bereits als Antibiotikum verwendet ii) Dox ist lipolöslich und besitzt eine gute Durchdringungsfähigkeit des Gewebes; iii) Die Einnahme von Dox ist oral möglich und erzielt eine schnelle dosisabhängige Gen-Induktion/Blockierung *in vivo* (Aurischio *et al.* 2001); iv) Dieses System ist in mehreren viralen und nicht viralen Vektoren bereits auf die Regulation der Genexpression untersucht worden (Kafri *et al.* 2000; Rubinchik *et al.* 2001; Lamartina *et al.* 2002; Unsinger *et al.* 2001); und v) Die Stärke der Genexpression in den Zellen steht in direktem Zusammenhang mit der Dosis des Induktors (Kringstein *et al.* 1998). Dieses Merkmal ermöglicht eine graduierte transkriptionale Expression.

Das primär entwickelte Tet-On-System wies eine z.T. starke Basalexpression (*leakiness*) auf (Freundlieb *et al.* 1997; Gossen and Bujard 1992). Diese konnte jedoch durch die zusätzliche Verwendung eines Tet-kontrollierten transkriptionalen Silencers (tTS) deutlich verringert werden (Urlinger *et al.* 2000). In Abwesenheit von Dox bindet tTS an TRE und inhibiert so eine Basalexpression des CMV_{min}-Promotors.

Auch in viralen Vektorsystemen, darunter rdAdV (Hu *et al.* 1997; Srour *et al.* 2003) und RRCA (Fechner *et al.* 2003a), lassen sich Tet-regulierte Expressionssysteme

verwenden. Inzwischen konnten sämtliche Regulationselemente (rtTA-M2-Transaktivator, tTS-Silencer, TRE) ohne Einschränkung der Regulierbarkeit in jeweils einen adenoviralen Vektor integriert werden (Mizuguchi *et al.* 2003; Salucci *et al.* 2002). Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass ein RRCA mit deletiertem E1B-Gen durch die Tet-On-Genexpression *in vitro* und *in vivo* reguliert werden konnte. Die Regulation erfolgte durch den CMV_{min}-Promotor, der die Expression vom E1A-Gen steuerte (Fechner *et al.* 2003a). Für die Evaluierung der Regulation der ttsP-Aktivität durch das Tet-System wurden die vier ttsP-rdAdV (Ad5tetO₇CEA-Luc, Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, Ad5tetO₇SPB-Luc und Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc) getestet. Bei allen Promotoren erfolgte mit Hilfe dieses Systems eine Transaktivierung der Transgenexpression nach der Zugabe des rtTA-M2-Transaktivators und der Dox-Induktion (Abb. 3-12). Die Transkription der einzelnen ttsP-AdV zeigte allerdings, abhängig von der Zelllinie und vom Adenovirus, deutliche Unterschiede. Der Grund dafür könnte das Vorhandensein bestimmter Transkriptionsfaktoren sein. Nicht alle Zelllinien besitzen die gleichen Transkriptionsfaktoren und die Promotoren reagieren nur auf bestimmte von diesen. In diesem Fall wird die Bindung der rtTA-M2 an dem Promotor begünstigt, und es können Unterschiede in der Transaktivierung hervorgerufen werden.

Die Applikation des tTS in ttsP-rdAdV-transduzierten Zellen zeigte in Abhängigkeit von der Zelllinie eine Reduzierung der Basalexpression um das bis zu 18-fache für den CEA-Promotor in MeWo-Zellen (Abb. 3-13). Bemerkenswert ist die Tatsache der Hemmung aller ttsP durch den tTS, unabhängig davon, ob ein anderes Element zwischen die tetO₇-Sequenz und die ttsP eingefügt wurde. Durch den Einsatz des tTS im Zusammenwirken mit einem ttsP-Plasmid und einem RRCA, der das E1A-Protein exprimiert, zeigte sich, dass hier in gleicher Weise die E1A-vermittelte Transaktivierung in Abwesenheit von Dox reduziert werden konnte (Abb. 3-15). Somit ist der Nachweis erbracht, dass der tTS sowohl die ttsP-Aktivität als auch die E1A(13S)-Transaktivierung hemmen kann.

Da Dox einerseits die Bindung von tTS an TRE verhindert und andererseits die des rtTA-M2-Transaktivator induziert, lassen sich beide Regulatoren parallel einsetzen (Rossi *et al.* 1998). Des weiteren konnte durch die zusätzliche Zugabe des rtTA-M2 mit dem tTS in die ttsP-rdAdV-transduzierten Zellen bei allen ttsPs eine Verbesserung der Regulation erreicht werden, wobei die Basalexpression des Systems ohne die Zugabe von Dox nicht bzw. kaum beeinträchtigt wurde (Abb.

3-14). Die Resultate stehen in Übereinstimmung mit denen von Fechner *et al.* (2003a), in jener Studie kam jedoch der Adenovektor Ad5TRE-Luc zur Anwendung (Fechner *et al.* 2003a).

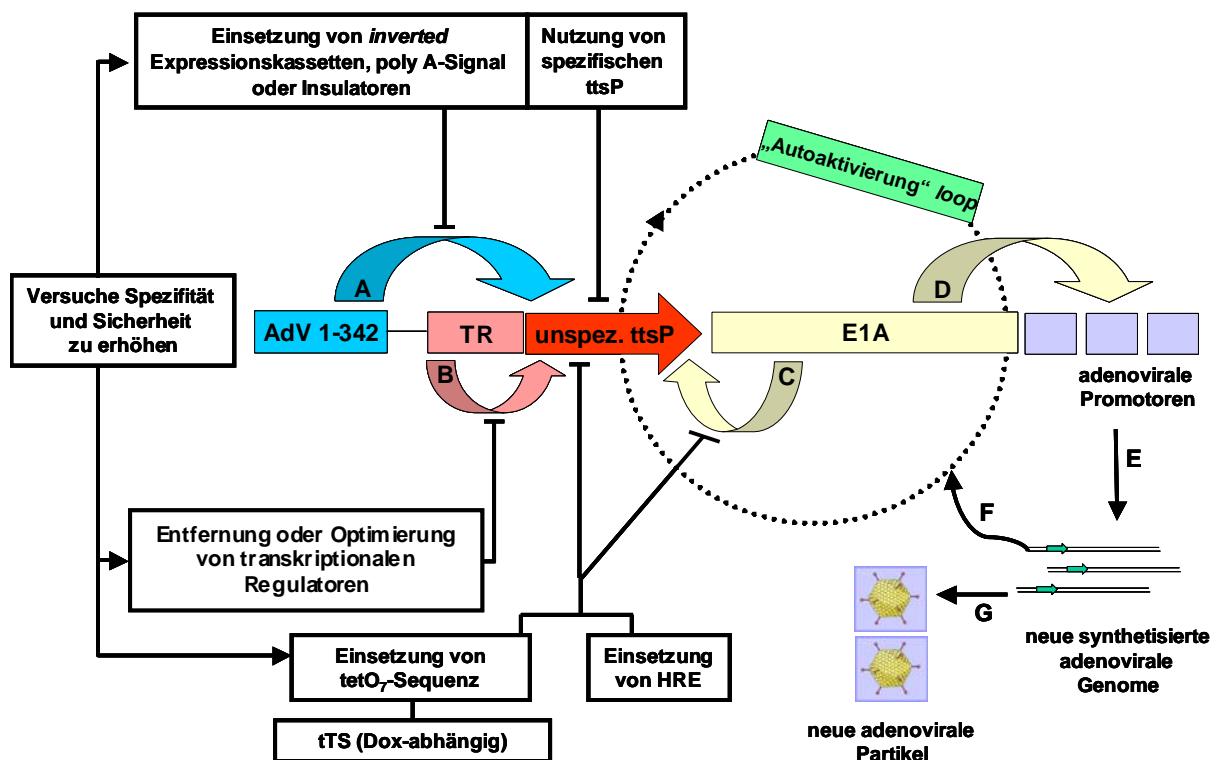


Abb. 4-1. Mechanismen unspezifischer *ttsP*-RRCA-Replikation in nicht Targetzellen. A) Verstärkung der *ttsP*-Aktivität durch E1A-Enhancer; B) Einfluss der transkriptionalen Regulatorsequenzen (TR) auf die *ttsP*; C) *feedback*-Transaktivierung der *ttsP* durch E1A; D) Transaktivierung adenoviraler Promotoren durch E1A; E) Amplifikation von *ttsP* durch neue adenovirale Genomsynthese; F) Verstärkung des Autoaktivierungs-loop; G) *ttsP*-RRCA-Replikation in Nicht-Targetzellen

Diese Arbeit dokumentiert erstmalig, dass der tTS die Replikation vom *ttsP*-RRCA (Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}) mittels Doxyzyklin hemmen kann (Abb. 3-17, Abb. 3-18), einerseits durch die Blockierung der *ttsP*-Aktivität (Abb. 3-13), andererseits durch die Unterdrückung der E1A-Transaktivierung auf die *ttsP* (Abb. 3-15). Dies bestätigt die Bedeutung der zwei Mechanismen für die unspezifische *ttsP*-RRCA-Replikation. Das *cell killing assay* am Beispiel von HeLa-Zellen veranschaulichte den Zusammenhang der Hemmung der *ttsP*-RRCA-

Replikation mit den Unterschieden in der Zytotoxizität und der Überlebensrate der hier untersuchten *ttsP*-RRCA (Abb. 3-16). Mittels eines *plaque assay* wurde nachgewiesen, dass die Zahl der neu entstandenen Partikel sich nach der *tTS*-Applikation verringerte (Abb. 3-18). Diese Ergebnisse bestätigen den direkten Einfluss der *ttsP*-Aktivität auf die *ttsP*-RRCA-Replikation.

Nachdem vorausgesetzt werden konnte, dass der *tTS* in der Lage ist, die Transkription von Promotoren stromabwärts von der *tetO₇*-Sequenz zu inhibieren (Yao *et al.* 1998), lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass der *tTS* in gleicher Weise die Transaktivierung der *ttsP* durch die E1A-Enhancer-Elemente, die sich stromaufwärts von dem *ttsP* befinden, inhibiert. Deshalb kann der *tTS* als universaler Inhibitor der *ttsP* betrachtet werden. Dies eröffnet eine Perspektive für die pharmakologische Regulation der *ttsP*-RRCA und damit für die Nutzung von onkolytischen Viren in der Tumortherapie. Obwohl bei den untersuchten *ttsP*-RRCAs eine Unterdrückung der Replikation in Primärzellen nachweisbar war und so die grundsätzliche Eignung für die Verwendung beim Menschen besteht, scheint eine zusätzliche pharmakologische Regulation des *ttsP*-RRCA von entscheidender Bedeutung für die Krebstherapie zu sein, weil eine hohe RRCA-Replikation im Tumorgewebe eine extensive Tumornekrose durch die Viro-Onkolyse auslösen könnte (Huang *et al.* 2003, Reid *et al.* 2002a). Als Folge würden neue Virionen im Blut freigesetzt. Dieser Prozess könnte eine starke systemische Immunantwort und ernsthafte Nebenwirkungen verursachen (Reid *et al.* 2002a). Die Fähigkeit der pharmakologischen Regulation der *ttsP*-RRCA-Replikation von außen, könnte daher zu einer Erhöhung der individuellen Sicherheit der RRCA-basierten Krebstherapie beitragen.

4.3 Regulation der FasL-Expression durch verbessertes Dox-induzierbares Genexpressionssystem *in vitro*

Aus den bisher vorliegenden Forschungsergebnissen erweist sich die onkolytische Aktivität von RRCA alleine als ungenügend und somit für den vollen therapeutischen Erfolg als nicht ausreichend. Eine erhebliche Steigerung der onkolytischen Effizienz könnte durch die zusätzliche Expression von zytotoxisch wirkenden Proteinen, wie z.B. des Todesliganden FasL erreicht werden. In Voruntersuchungen hat sich bereits

das hohe proapoptotische Potential von FasL in Tumorzellen unter Beweis stellen lassen (Arai *et al.* 1997; Hedlund *et al.* 1999; Igney *et al.* 2003; Rubinchik *et al.* 2003; Eberle *et al.* 2003). Zudem ist eine stringente Regulation über das Tet-System von besonderer Bedeutung, da bereits eine geringe Basalexpression von Todesliganden Apoptose induzieren (Rubinchik *et al.* 2005) und sich kontraproduktiv auf die Virusreplikation *in vivo* auswirken könnte. Deshalb wurde als zusätzliche Sicherheitstufe ein von uns optimiertes Tet-Regulationssystem für die Expression des Todesliganden eingesetzt, welches eine stringente Kontrolle über die Apoptoseinduktion garantiert. Ein Merkmal des ursprünglich verwendeten Tet-Regulationssystems besteht in der relativ hohen Basalexpression und damit in einer nur eingeschränkten Regulierbarkeit (Xu *et al.* 2003). In unserer Arbeitsgruppe gelang der Nachweis, dass die Deletion der CMV_{min}-Promotorsequenzen stromabwärts vom Transkriptionsstart oder der Ersatz des CMV_{min}-Promotors durch eine isolierte TATA-Box effiziente Mechanismen sind, um die Basalaktivität des TRE-Promotors zu reduzieren. Agha-Mohammed und Kollegen beschrieben, dass ausschließlich die Deletion der Sequenzen zwischen der ersten tetO-Sequenz und der TATA-Box, mit Ausnahme von 5 Random-Basen, die Expression des TRE-Promotors deutlich hemmen konnte (Agha-Mohammadi *et al.* 2004). Der Ersatz des CMV_{min}-Promotors durch ttsP oder durch die TATA-Box verursacht jedoch eine deutliche Verminderung der Transgenexpression nach Induktion mit Dox.

Zur Verbesserung der Regulierbarkeit in rdAdV überprüften wir zunächst drei verschiedene TRE/CMV-Promotorkonstrukte zur Steuerung der FasL-Expression in HeLa-Zellen:

TRE (Clontech): Ursprünglich beschriebenes Konstrukt mit tetO₇-Operon und CMV_{min} (Gossen and Bujard 1992).

Tight (Clontech): System mit veränderten Spacer-Sequenzen im tetO₇-Operon sowie weiter verkürztem CMV_{min}.

Tight-TATA: Ersatz des CMV_{min} durch eine TATA-Box im Tight-Promotorkonstrukt.

Die Ergebnisse der FasL-sensitiven Zelllinie HeLa zeigten, dass nach der Dox-induzierten FasL-Expression bei Ad5Tight-FasL in gleichem Maße wie bei Ad5TRE-FasL Zytotoxizität und Apoptose nachzuweisen war (Abb. 3-19, Abb. 3-21). Während bei Ad5Tight-FasL in nicht induziertem Zustand und bei einem MOI-Wert von 20

keine Zytotoxizität vorlag, konnte Ad5TRE-FasL bereits bei 5 MOI Zellyse auslösen (Abb. 3-19). Im Vergleich TRE-Promotor versus Tight-Promotor konnte, in Übereinstimmung mit den Reporter-gen-Experimenten (Sipo *et al.* 2006), eine durch den TRE-Promotor vermittelte signifikant erhöhte Apoptoseinduktion in den Zielzellen unter nicht induzierenden Bedingungen und eine vergleichsweise hohe Apoptosenrate unter induzierenden Bedingungen festgestellt werden (Abb. 3-21). Der Vektor Ad5TightTATA-FasL erwies sich unter nicht induzierten Bedingungen als untoxisch nach der Dox-Induktion aber auch als ineffizient. Die Ergebnisse verdeutlichen vor allem wegen der geringen Apoptoseraten die mangelnde Eignung von Ad5TightTATA-FasL für die Anwendung in der Krebsgentherapie.

Diese Unterschiede wirkten sich zudem bei der FasL-rdAdV-Amplifikation in 293-Zellen aus. Die Adenovektoren Ad5Tight-FasL und Ad5TightTATA-FasL konnten in höheren Titer als der Ad5TRE-FasL produziert werden. Auf der anderen Seite war der FasL-rdAdV-Titer niedriger als der üblicherweise im Labor erreichte. Die Transaktivierung der Promotoren durch das in 293-Zellen vorhandene E1A-Protein könnte die Ursache für die FasL-Expression sein und in der Folge eine Erhöhung der Zytotoxizität bewirken.

Im Ergebnis gelang der Nachweis, dass Veränderungen des TRE-Promotors eine deutliche Verbesserung des Tet-On-Systems bewirken können. Das Konstrukt Ad5Tight-FasL ermöglichte eine geringere Basalaktivität mit dennoch höherer Transgenexpression unter Verwendung des rtTA-M2 als Transaktivator unter induzierenden Bedingungen. Somit ließ sich eine differenziertere Dox-Regulierung der FasL-Genexpression erreichen.

Lungenkrebs ist eine der am häufigsten auftretenden Krankheiten in der Welt, die durchschnittliche Überlebensrate nach fünf Jahren liegt bei nur 15%. Trotz der unterschiedlichsten Anwendungen in der konventionellen Therapie haben sich die Heilungsmöglichkeiten in den letzten 25 Jahren kaum verbessert (Brown and DuBois 2004). Die Notwendigkeit neuer therapeutischer Ansätze und Verfahren ist offenkundig. In unseren Versuchen verwendeten wir den optimierten Adenovektor Ad5Tight-FasL, um Lungenkrebszellen zu zerstören und untersuchten die apoptotische und zytotoxische Effizienz des Adenovektors Ad5Tight-FasL in drei humanen Lungenkarzinomzelllinien: BEN, H441 und DMS53.

Die Transduktion mit Ad5Tight-FasL und die FasL-Induktion durch Dox löste bei allen drei Zelllinien Apoptose aus (Abb. 3-26). Dies bestätigt die empfindliche Reaktion von Lungenkarzinomzellen auf exprimierten rekombinanten-FasL und somit die Aussage, dass die Fas/FasL-Kaskade für die Apoptoseinduktion von maßgeblicher Bedeutung ist (Kawasaki *et al.* 2000). In den transduzierten Zellen ohne Zugabe von Dox erfolgte dagegen keine Apoptose. Die Resultate zeigen zudem eine enge Dox-abhängige Regulation von Ad5Tight-FasL. Bei einer Adenovektortransduktion von 25 MOI in den Lungenkarzinomzellen trat nach der Dox-Induktion 60-75% Zellyse auf (Abb. 3-27, Sudarshan *et al.* 2005). In diesem Fall war die verwendete Dosis in den Lungenkrebszellen 200- bis 400-fach höher, um vergleichbare Effekte wie bei der Verwendung von Ad5Tight-FasL in HeLa-Zellen zu erreichen. Dies deutet darauf hin, dass die Lungenkrebszellen eine relative hohe Resistenz gegen FasL-induzierte Apoptose im Vergleich zu HeLa-Zellen besitzen. Die geringe Empfindlichkeit der untersuchten Lungenzelllinien auf die Fas-vermittelte Apoptose könnte sich aus verschiedenen Ursachen herleiten: i) Expression vom löslichen Fas; ii) Expression des *decoy receptor 3*, der sich direkt an das FasL-Protein bindet und die Fas-vermittelte Apoptose inhibiert (Cheng *et al.* 1994); iii) Geringe Fas-Expression an der Zelloberfläche könnte die effiziente Apoptoseinduktion, die durch Fas erfolgt, verhindern (Nambu *et al.* 1998). Eine Studie zeigte, dass 90% von 121 getesteten Lungenkarzinomzellen eine deutlich geringere Fas-Expression aufwiesen und 24% keinen Fas-Rezeptor an der Zelloberfläche besaßen (Viard-Leveugle *et al.* 2003); iv) Die geringe Transduktionseffizienz des Adenovektors Ad5Tight-FasL könnte zudem ursächlich für die relative Resistenz von DMS53-Zellen sein. Aus diesen Gründen ist der therapeutische Nutzen konventioneller Adenoviren, die das FasL-Protein exprimieren, im Einsatz gegen Lungentumore, begrenzt.

Insgesamt konnten in unserer Arbeit eingehend definierte Bedingungen aufgezeigt werden, die auf der Basis von Tight-Promotor und rtTA-M2 eine stringente Regulation des Tet-Genexpressionssystems in AdV ermöglichen, und somit grundlegende Voraussetzungen für eine regulierte Expression von Todesliganden durch RRCA schaffen.