

2. Literaturübersicht

2.1. Adenoviren

2.1.1. Taxonomie, Morphologie und Genom

Adenoviren gehören zur Familie der Adenoviridae, die in zwei Genera, Mastadenoviridae (Adenoviren [Ad] der Säugetiere) und Aviadenoviridae (Adenoviren der Vögel), unterteilt ist. Die Mastadenoviren beinhalten wiederum zahlreiche Subgenera, die neben den humanen Ad auch bovine, porcine, ovine, canine, equine, caprine, murine und simiane Viren umfassen.

Die humanen Ad sind basierend auf ihrer Fähigkeit zur Agglutination roter Blutkörperchen in 6 Subgruppen (A bis F) unterteilt, denen 49 Serotypen (Horwitz, 1996) nach ihrer genetischen Variabilität, dem onkogenen Potential, dem G/C-Gehalt ihrer DNA und der Resistenz gegen neutralisierende Antikörper (AK) zugeteilt werden (Eiz and Pring-Akerblom, 1997; Hierholzer, 1973; Mei and Wadell, 1996; Wadell et al., 1987).

Ad verursachen in der Regel mild verlaufende Erkrankungen, wobei die Pathologie aus Entzündung und Schädigung epithelialer Zellen besteht. Die Viren der Subgruppen A und F werden dabei mit dem Auftreten gastrointestinaler Infektionen (Wadell et al., 1987), die der Subgruppen B, C und E hauptsächlich mit respiratorischen Infektionen, die zum Teil mit Konjunktividen einhergehen können, in Verbindung gebracht. Auch Ad der Subgruppe D können eine epidemische Konjunktivitis verursachen (Curtis et al., 1998; Viswalingam, 1993).

Nutztiere (v.a. Kalb, Lamm, Fohlen) zeigen respiratorisch-enterale Symptome, während es bei Hunden nach einer Infektion mit dem caninen Ad 1 zu einer akuten septikämischen Erkrankung mit bevorzugter Manifestation in Gefäßen, Leber und dem Zentralnervensystem kommt (Hepatitis contagiosa canis).

Ad der Subgruppe C wurden jedoch auch im Myokard von Kindern und Erwachsenen mit Myokarditis bzw. dilatativer Kardiomyopathie (DCM) nachgewiesen (Martin et al., 1994; Pauschinger et al., 1999).

Ad sind unbehüllte, ikosaedrische Partikel, die einen Durchmesser von 70 – 100 nm aufweisen (Nemerow and Stewart, 1999). Sie beinhalten eine lineare doppelsträngige DNA von ca. 36 kb, die zusammen mit 4 Strukturproteinen (Protein

V, VII, μ und terminales Protein) das Core bildet (Stewart et al., 1991). 7 weitere Strukturproteine bilden das Kapsid, das wiederum aus 252 Untereinheiten (Kapsomeren) zusammengesetzt ist – 240 Hexone und 12 Pentone, wobei die Pentone die Ecken des Ikosaeders bilden. Gleichzeitig bilden die Pentone die Base für das Fiberprotein, das antennenartig in die Peripherie reicht und dessen Länge zwischen den einzelnen Serotypen variiert (Norrby, 1969). Die distale C-terminale Domäne des Fiberproteins wird als Knob bezeichnet und agiert mit dem Rezeptor der Zielzelle. Die Hexone ihrerseits liegen als Trimere vor, deren hervorstehende Schlaufen die Hauptepitope für neutralisierende AK darstellen (Shenk T., 1996).

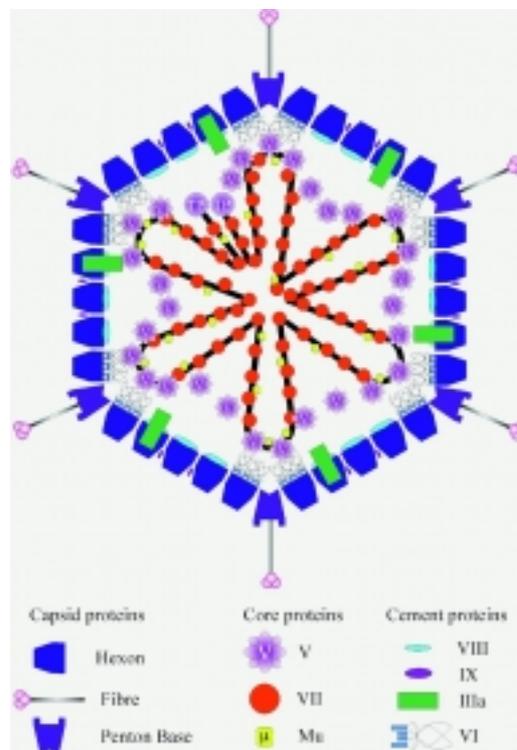


Abbildung 2.1: aus Russell, W. C. et. al.; 2000

Das etwa 36 kb große Genom der Ad enthält überlappende transkriptionale Einheiten auf beiden DNA-Strängen, die über 50 Polypeptide kodieren (Shenk T., 1996). Die Gene werden eingeteilt in die fünf frühen Transkriptionseinheiten (E1A, E1B, E2, E3, E4), die beiden verzögerten Transkriptionseinheiten (IX, IVa) und in die späte Transkriptionseinheit (L, major late), von der 5 mRNAs generiert werden und die die Synthese der viralen Strukturproteine (Kapsidbildung) kodiert (Shenk T., 1996). Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des viralen Genoms befinden sich die Inverted

Terminal Repeats (ITR), die als sich wiederholende Sequenzen die Termini des DNA-Stranges bilden und eine Rolle in der Anfangsphase der Replikation spielen (Shenk T., 1996).

Bei der Transkription werden beide DNA-Stränge abgelesen, wobei E1A, E1B, IX, E3 und die Major Late Region rechtswärts, E4, E2 und IVa dagegen in links ausgerichteter Richtung abgelesen werden (Russell, 2000).

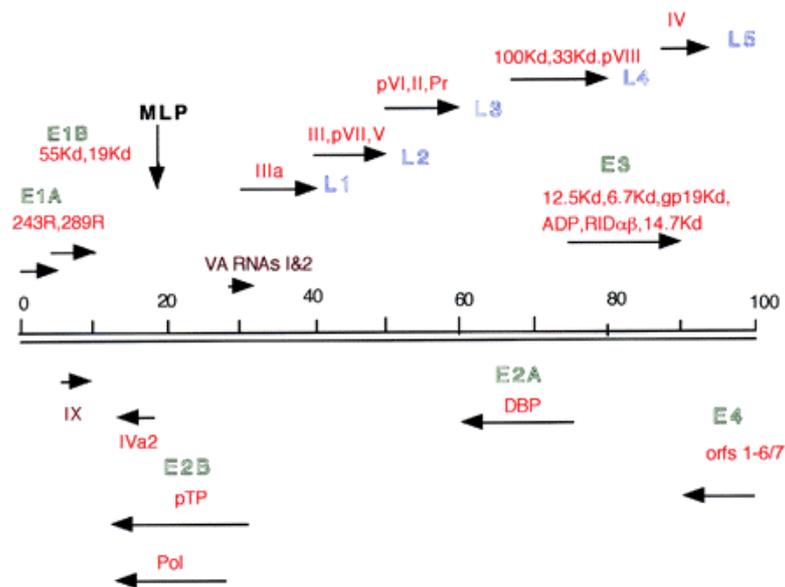


Abbildung 2.2; aus Russell, W. C. et. al.; 2000

2.1.2. Replikationszyklus

Nach Bindung des C-terminalen Endes des Fiberproteins (Knob) an den Coxsacki- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) der Zielzelle, wird das Virion durch Endozytose, welche durch die Interaktion des Pentonbasisproteins (RGD-Motiv) mit den $\alpha_v\beta_5$ - / $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen vermittelt wird, aufgenommen (Mathias et al., 1994). Eine weitere Interaktion der $\alpha_v\beta_5$ -Integrine mit anderen Zellfaktoren und dem Pentonbasisprotein ziehen die Zerstörung der Endosomenmembran nach sich (Cotten and Weber, 1995), und die freien Viruspartikel gelangen durch Assoziation mit den Mikrotubuli der Wirtszelle zum Zellkern (Saphire et al., 2000). Während des Transports zu den nukleären Poren verursacht die viruskodierte Protease eine Zerstörung des Kapsids durch die Proteolyse des Proteins VI (Greber et al., 1996), das die Verbindung zwischen Kapsid und den Core-Komponenten darstellt. Durch die Bindung des nun

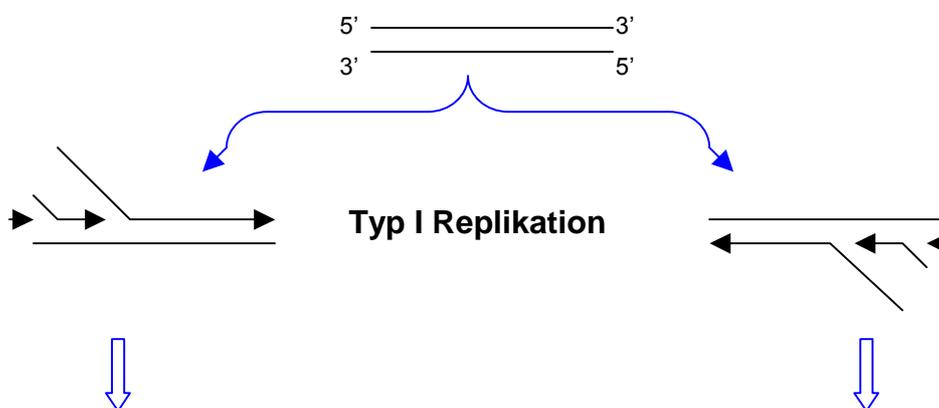
freien, an die virale DNA gekoppelten Terminalproteins an die Kernmatrix wird die Replikation initiiert (Angeletti and Engler, 1998).

Der Replikationszyklus beginnt mit der sofortigen Transkription des E1A-Gens (Shenk T., 1996).

Die E1A-Proteine binden an verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine (siehe 2.3.2.), wodurch sie die Transkription der weiteren frühen Gene der viralen DNA induzieren und die Bereitschaft der Zelle für die Virusreplikation erhöhen (Russell, 2000).

Aus der Transkription des E2-Gens resultiert das präterminale Protein und die DNA-Polymerase, die beide unter Komplexbildung an die ITRs des viralen Chromosoms binden (Hay et al., 1995), sowie das single-stranded-DNA-binding-Protein, das zusammen mit der Polymerase und dem zellulären Protein NFII die Elongation des Transkripts ermöglicht. Das präterminale Protein dient hierbei als Primer für die DNA-Replikation (Rekosh et al., 1977).

In der ersten Phase der Replikation dient nur einer der beiden DNA-Stränge als Template für die Synthese, so dass das Ergebnis der Replikation ein Duplex aus der originalen Matrix und einem Tochterstrang sowie ein separater Einzelstrang ist. Der Einzelstrang bildet hierauf eine Kreisform, in der die komplementären ITRs sich einander annähern („panhandle“) und somit die gleiche Struktur bilden wie die Termini der viralen Duplexform. Diese Struktur kann nun wie in der ersten Replikationsphase durch die Initiationsmaschinerie der DNA-Synthese erkannt werden, und der zweite Duplex, bestehend aus originaler Matrix und einem Tochterstrang wird generiert (Shenk T., 1996).



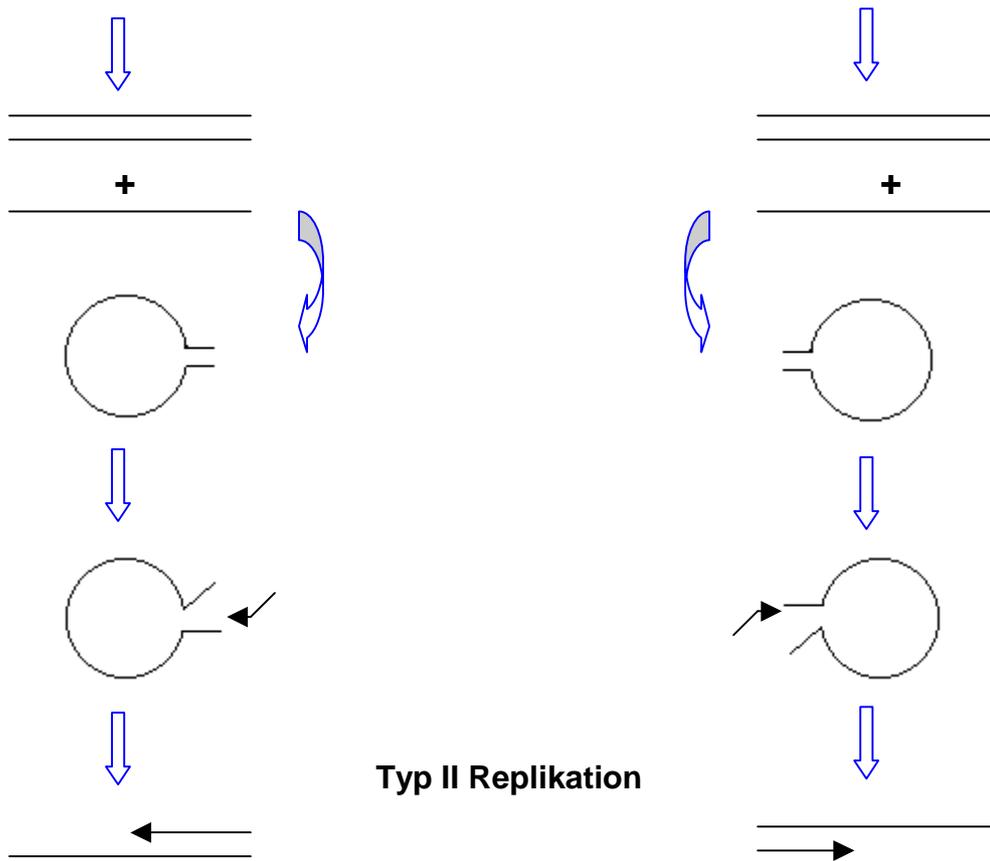


Abbildung 2.3: schematische Darstellung der adenoviralen Replikation

Die E3-Transkriptionseinheit kodiert immunsuppressive Funktionen, die auf zwei Mechanismen basieren. Das E3-19kDa-Protein verhindert die durch den Major-Histokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC-1) vermittelte Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche und damit die Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten gegen die viralen Antigene (Wold et al., 1995). Das E3-14.7kDa- und das RID $_{\alpha\&\beta}$ -Protein unterbinden die Apoptose infizierter Zellen durch Fas/Fas-Liganden und/oder den Tumornekrose-Faktor α (TNF α) (Lukashok et al., 2000; Tollefson et al., 1998). Ein weiteres wesentliches Produkt der E3-Region ist das Adenovirus Death Protein (ADP; 11.6 kDa-Protein), das die späte Zytolyse der infizierten Zelle fördert und damit die Effizienz der Freigabe der neu entstandenen Viruspartikel erhöht (Tollefson et al., 1996a).

Die E4-Region wird in sechs verschiedene transkriptionelle Einheiten eingeteilt (open reading frames (orf) 1–4; 6; 6/7) und spielt eine wichtige Rolle im viralen Zyklus durch Förderung der selektiven Expression viraler Gene auf Kosten der zellulären Gene (Halbert et al., 1985). Zum Beispiel verhindern die Proteine E4orf3 und E4orf6 den

Transport der zellulären Transkripte vom Zellkern zum Zytoplasma, während sie den Transport der späten viralen Transkripte unterstützen, indem sie die Stelle des zellulären Transportfaktors einnehmen (Ornelles and Shenk, 1991). Gleichzeitig aber konnte auch nachgewiesen werden, dass E4orf4 den E1A-regulierten Mechanismen zum Teil entgegenwirkt und somit ein negatives Feedback darstellt. Hierbei hemmt E4orf4 die E1A-Aktivierung des E2F-Promotors (Mannervik et al., 1999). E4orf6 nimmt zusätzlich direkten Einfluß auf das zelluläre p53-Protein, indem es dieses mittels einer Zink-Bindungsdomäne aus dem Komplex mit E1B-55kDa löst (siehe 2.3.2.) und es nachfolgend destabilisiert (Boyer and Ketner, 2000). E4orf3 relokalisiert das E1B-55kDa-Protein vom Zytoplasma in den Zellkern und unterbindet somit die Inaktivierung des p53 durch E1B-55kDa, wobei allerdings in Anwesenheit von E4orf6 die Liberalisierung des p53 durch E4orf3 außer Kraft gesetzt wird (Konig et al., 1999).

In gleichem Zusammenhang haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass p53 mit dem E1A-regulierten Transkriptionsfaktor p120-E4F interferiert und dadurch die Aktivität des E4-Promotors hemmt (Sandy et al., 2000).

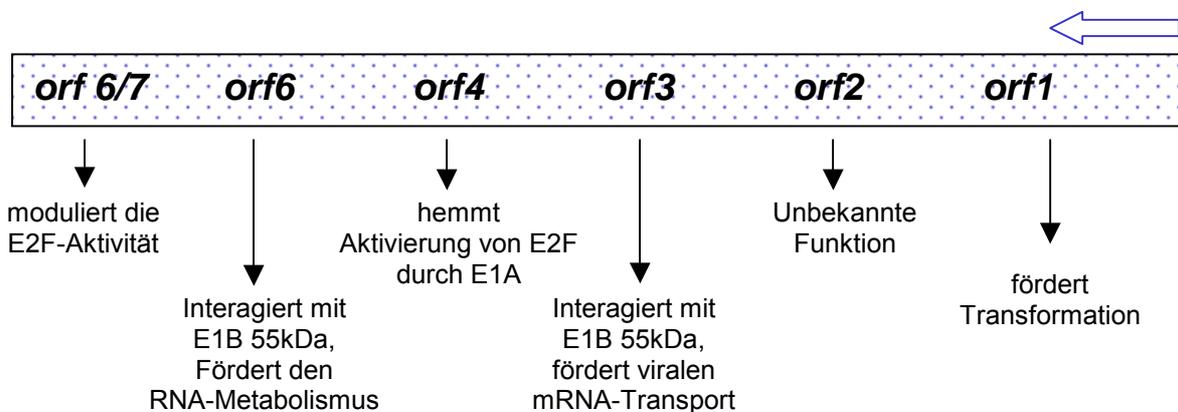


Abbildung 2.4: Übersicht über die Funktionen der E4-Region; orf = open reading frame

Die Expression der späten mRNAs, die aus komplexen Splicevorgängen resultieren und in fünf Familien (L1 – L5) eingeteilt werden, wird durch den Major-Late-Promotor (MLP) kontrolliert. Es entstehen hieraus die viralen Strukturkomponenten, und es folgt die Formation des vorerst leeren Kapsids (Philipson, 1984). Der Eintritt eines viralen DNA-Moleküls wird durch die Verpackungssequenz, ein AT-reiches DNA-Element, das ca. 260 Basenpaare vom linken Ende des Chromosoms entfernt

liegt, vermittelt (Hearing et al., 1987), und die reifen Viruspartikel reichern sich 20 bis 24 Stunden post infectionem (p.i.) im Zellkern an (Shenk T., 1996).

Es existieren mindestens zwei Komponenten, die zur Aktivierung des MLP beisteuern. Zum einen ermöglicht die Transformation des viralen Chromatins, die nach dem Beginn des Replikationszyklus durch E4orf1 bedingt stattfindet, die Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors USF (MLTF) an den MLP (Toth et al., 1992), zum anderen wird die Aktivierung durch die Transkriptionsfaktoren IVa2 und IX, die durch die verzögerte frühe Transkriptionseinheit kodiert werden, erreicht (Lutz et al., 1997; Lutz and Kedinger, 1996). IV2a bindet hierbei zusätzlich zu USF an alternative Bindungsdomänen stromabwärts der Major-Late-Startdomäne (Leong et al., 1990; Mansour et al., 1986), IX steuert zur Aktivierung des MLP über das TATA-Motiv bei.

Diese Vorgänge werden von Veränderungen der nukleären Infrastruktur und einer Permeabilitätserhöhung der Kernmembran begleitet (Rao et al., 1996; Tollefson et al., 1996a), und der Austritt der Viren in das Zytoplasma wird nach Zerstörung der Intermediärfilamente und Disintegration der Zellmembran gefolgt von der Freilassung der Viren in den Interzellularraum 5 bis 6 Tage p.i.

2.1.3. Adenovirale Vektorsysteme

Beim Einsatz viraler Vektoren in der Gentherapie nutzt man die Fähigkeit von Viren, Zellen zu infizieren. Sie können eingesetzt werden (i) für die Krebstherapie, um Gene zu übertragen, die zur Tumorsuppression und -elimination führen, (ii) für die Gentherapie, um z. B. durch die Übertragung von Genen defekte Gene im Gewebe zu substituieren und (iii) für die Supplementtherapie, um Gene zu übertragen, deren Expression Krankheitsprozesse bekämpfen sollen (Russell, 2000). Neben den zur Zeit gebräuchlichsten Vektorviren, den Retroviren und den Adenoviren, werden auch adenoassoziierte Viren (Muzyczka, 1992), Vacciniaviren (Pastoret and Brochier, 1992) und Herpes-simplex-Viren (Geller and Breakefield, 1988) zum Gentransfer eingesetzt.

Ad besitzen den Vorteil, dass sie zum einen zahlreiche Zellen infizieren können, ruhende Zellen im Gegensatz zu den Retroviren mit eingeschlossen, zum anderen sind sie für den Menschen nicht onkogen und übertragen ihr Genom effizient in die Zielzellen. Sie können bis zu 2 kb Fremd-DNA ohne signifikante Einbußen in ihrer

Stabilität und Infektiosität inkorporieren. Für die Entwicklung adenoviraler Vektoren werden am häufigsten die Serotypen 2 und 5 eingesetzt, deren Genom komplett definiert ist (Horwitz, 1996).

Adenoviralen Vektoren (AdV) der ersten Generation wurden komplett die E1- und/oder E3-Region deletiert, was eine Einklonierung von bis zu 6,5 kb fremder DNA unter der Kontrolle eines heterologen Promotors erlaubte. Die somit replikationsdefizienten Viren können in Helferzelllinien, die E1A und E1B stabil exprimieren, propagiert werden (z.B. HEK293 (Graham et al., 1977)). Es zeigte sich, dass die Expression des Transgens *in vivo* nur vorübergehend war (ca. 3 Wochen), hauptsächlich aufgrund der ausgeprägten Immunantwort auf die viralen Kapsidantigene und auf das Transgen selbst (Russell, 2000). Ein weiteres entscheidendes Problem war die Entstehung replikationskompetenter Adenoviren (RCAs) während der Vektorpropagation (siehe 2.2.), was den Einsatz der AdV stark limitierte. Ein Fortschritt war die Entwicklung von AdV der zweiten Generation mit kompletter oder partieller Deletion der E2-Gene, wodurch die Fähigkeit zu replizieren und somit die Generation von RCAs geschmälert werden konnte (Moorhead et al., 1999). Andere noch höher entwickelte AdV (dritte Generation) wurden durch die Deletion weiterer Virusgene geschaffen, darunter letztendlich solche, denen nahezu das gesamte Genom bis auf die ITRs und das Verpackungssignal entfernt wurde und die dadurch auf Helferviren angewiesen waren (Steinwaerder et al., 1999).

2.2. Replikationskompetente Adenoviren (RCA)

2.2.1. Entstehung und Vorkommen

Replikationskompetente Adenoviren (RCA) entsprechen im Aufbau des Genoms dem Wildtyp der Adenoviren, außer dass in den meisten Fällen die E3-Region fehlt. Das Auftreten von RCAs wurde erstmals von Lochmüller et. al. (1994) beschrieben, als gezeigt werden konnte, dass RCAs durch Rekombination zwischen Sequenzen des AdV und den stabil in das Genom von HEK293 Zellen integrierten adenoviralen Sequenzen der E1-Region entstehen. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von RCAs mit der Zunahme neu generierter AdV während des Produktionsprozesses kontinuierlich zu. Ein weiterer Faktor, der die RCA-Formation

begünstigt, stellt die Größe des in den AdV klonierten Transgens dar. E1-gendeletierte AdV haben eine maximale Verpackungskapazität, die 105% des Adenovirusgenoms ausmacht. Je weiter die Gesamtgröße des AdV an diese Grenze heranreicht, desto häufiger kommt es zum Auftreten von RCAs und Verlust des Transgen-tragenden AdV (Bett et al., 1993). Die absolute Menge der RCAs in AdV-Präparationen ist jedoch oft relativ gering und wurde mit unter 0,5% bezogen auf die Menge der AdV angegeben (Paielli et al., 2000). Bei weiterer Passagierung der RCA-enthaltenden AdV-Präparation kann diese allerdings auf über 25 % (Passage 19) steigen (Lochmuller et al., 1994).

Während nach diesen Erkenntnissen verschiedene Versuche unternommen wurden, das Auftreten von RCAs in Vektorpräparationen zu verhindern (Fallaux et al., 1998;Hehir et al., 1996), und neue adenovirale Vektorsysteme wie z. B. die Helfer-abhängigen AdV (HD-AdV) generiert wurden (Morrall et al., 1999;Morsy et al., 1998;Sandig et al., 2000;Steinwaerder et al., 1999), um zugleich die Immunantwort auf die Vektorinfektion zu verringern, wurde in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf die möglichen Vorteile, die die Replikationsfähigkeit eines AdV hinsichtlich des höheren Expressionsniveaus und der Ausbreitung im Tumorgewebe bietet, gelenkt (Curiel, 2000;Loser et al., 1998;Lusky et al., 1999).

2.2.2. Kartierung und Bedeutung der E1-Region

Die E1A-Region, welche als erstes virales Gen nach Eintritt in den Zellkern transkribiert wird, kodiert zwei mRNAs, die das gleiche 3'- und 5'-Ende aufweisen und durch unterschiedliche Splicevorgänge differenziert werden. Die mRNAs kodieren das 12S-Protein und das 13S-Protein, das lediglich um 46 Aminosäuresegmente größer ist (Shenk T., 1996). Beide Proteine sind hauptverantwortlich sowohl für die Transkription aller weiteren frühen viralen Gene als auch für die Stimulation der infizierten Zelle, in die S-Phase des Zellzyklus überzugehen, so dass durch das Fehlen der E1A-Region eine Virusreplikation nicht möglich ist.

Die Hauptrolle hierbei übernimmt das 13S-Protein, da es allein zu sämtlichen Funktionen, die durch die E1A-Region kodiert werden, befähigt ist. Das 12S-Protein dagegen ist ein weitaus schwächerer Aktivator, dem dabei durch das Fehlen der Conserved Region 3 Domäne (CR3) die Bindungsstelle zu bestimmten Faktoren,

unter anderem zu den Transkriptionsfaktoren für die verzögert frühen viralen Promotoren fehlt (Shenk T., 1996). Es stellt somit lediglich eine Helferfunktion, die den Beginn der Replikation begünstigt und unterstützt.

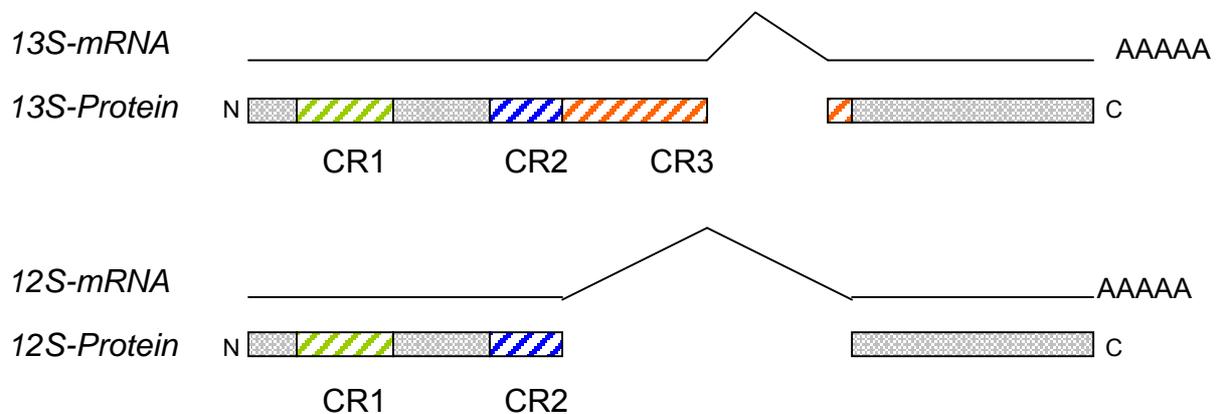


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Splicevorgänge der E1A-mRNA; CR = Conserved Region

Um die Transkription der frühen viralen Gene zu initiieren, interagiert das 13S-Protein über die CR3-Domäne mit dem TATA-Box-Binding-Protein (**TBP**), welches die DNA-bindende Untereinheit des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) darstellt (Lee et al., 1991). TFIID spielt eine zentrale Rolle in der Interaktion mit TATA-Box enthaltenden Promotoren, indem er den Initiationskomplex der Synthesemaschinerie auf der Template-DNA passend positioniert (Pugh and Tjian, 1992). Des Weiteren wird durch die Bindung des 13S-Proteins mit dem TBP der Komplex des zellulären Tumorsuppressorgens p53 mit TBP, welcher eine Repression transkriptioneller Vorgänge bewirkt, kompetitiv gehemmt, da die Bindungsdomänen beider Proteine auf überlappenden Einheiten positioniert sind (Horikoshi et al., 1995).

Im normalen Zellzyklus wird das Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein (**pRB**) von den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) phosphoryliert, wodurch sowohl der Fortschritt in die Mitose als auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F vermittelt wird (Lavia and Jansen-Durr, 1999). Für die negative Regulation der CDK Aktivität und damit der Aufrechterhaltung des ruhenden Stadiums des Zellzyklus sind die CDK-Inhibitoren (**CKI**) (u. a. **p21**, **p27**, **p16** und **p19**) verantwortlich, die mit den CDKs assoziieren und damit die Aktivität der CDKs unterbinden (Morgan, 1995). Die E1A-Proteine binden an p21 und seine verwandten CKIs und stimulieren so indirekt die Zellteilung und das Zellwachstum (Keblusek et al., 1999). Die Bindung von 12S

und 13S an pRB selbst über die CR1- und CR2-Domänen (Dyson et al., 1992) löst den Transkriptionsfaktor E2F aus dem E2F-pRB-Komplex. Durch freies E2F werden Transkriptionsvorgänge zusätzlich aktiviert und die Zellzyklusprogression gefördert (Johnson et al., 1993).

Gleichzeitig wird die ursprüngliche auf den Zellzyklus inhibitorische Wirkung der zur pRB-Familie gehörenden Proteine **p107** und **p130** durch eine Hyperphosphorylierung, die durch die Bindung der CR2-Domäne hervorgerufen und durch die CR1-Domäne stabilisiert wird, unterbunden (Wang et al., 1993), so dass ruhende Zellen unmittelbar nach der Infektion mit Ad mit der DNA-Synthese beginnen.

E1A aktiviert zudem die Transkription durch die direkte Bindung an weitere zelluläre Faktoren. Alle der adenoviralen frühen Promotoren mit Ausnahme des E1B-Promotors besitzen eine **ATF**-Bindungsdomäne (CREB) und werden somit durch die aktivierende Bindung zwischen der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors ATF-2 und dem CR3 der E1A-Region induziert (Abdel-Hafiz et al., 1993). Des Weiteren kann E1A an **YY1** Erkennungssequenzen binden, die in Abwesenheit von E1A die Aktivität von Promotoren, die YY1-Bindungsdomänen enthaltenden, gewöhnlich unterdrücken (Shi et al., 1991).

Der Transkriptionsfaktor **NF-κB** ist ein Schlüsselregulator in der initialen antiviralen Immunantwort, da er die Transkription von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen initiiert und somit zu einer Reihe von proinflammatorischen Prozessen und anderen Abwehrmechanismen führt (Ferreira et al., 1999). Durch Bindung der E1A-Produkte an Proteine der **p300/CBP**-Familie wird unter anderem die IκB-Kinase, die zur Aktivierung des NF-κB entscheidend ist, inhibiert (Shao et al., 1999). Weitere Regulations- und Abwehrmechanismen der Zelle werden durch die Bindung an p300/CBP beeinflusst. Somit werden auch die Fähigkeiten des p300 zur Transkriptionsaktivierung zellzyklus-regulierender Proteine (Eckner et al., 1994) und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT (s.u.) unterbunden.

Durch virale Infekte werden Interferone der Klassen I und II alarmiert und binden an Rezeptoren auf der Oberfläche infizierter Zellen. Zelluläre Komplexe (**Jak/STAT**) werden hierauf mittels p300 aktiviert, in den Zellkern transferiert und binden dort an Interferon-Response-Elemente (ISREs), wodurch verschiedene Proteinkinasen aktiviert werden, die die intrazellulären Aktivitäten invasiver Viren bekämpfen (Goodbourn et al., 2000). Infolge der Bindung der E1A-Proteine an das p300, bleibt die dadurch stark herabgesetzte Initiierung der STAT-Komplexe und somit die

Aktivierung der ISREs aus (Look et al., 1998;McDonald and Reich, 1999;Paulson et al., 1999) und eine gewisse Refraktivität gegenüber Interferonen ist hergestellt.

Die E1B-Region kodiert zwei große Proteine, E1B-19kDa und E1B-55kDa, die die E1A-induzierte Apoptose infizierter Zellen verhindern (White and Cipriani, 1990).

Das E1B-19kDa-Protein ähnelt in seiner Struktur dem zellulären antiapoptotischen Protein Bcl-2 und blockiert den programmierten Zelltod durch Interaktion mit Proteinen der **Bax**-Familie, die Apoptose und Nekrose induzieren (Pearson et al., 2000;Subramanian et al., 1995). Es bindet ebenso wie Bcl-2 an **Btf**, einen wichtigen Transkriptionsrepressor, der dem Zelltod durch Erhöhung der Permeabilität mitochondrialer Membranen, Ausschüttung von Cytochrom C und Initiierung der Caspase-Kaskade Vorschub leistet (Imazu et al., 1999;Kasof et al., 1999). Einen parallelen Mechanismus weist die (durch E1A-CR1) induzierte (Duerksen-Hughes et al., 1991) TNF α -vermittelte Apoptose auf, die durch Ausschüttung von Arachidonsäure, erhöhte Zellmembranpermeabilität und die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen gekennzeichnet ist (Wolf and Laster, 1999), wobei E1B-19kDa durch die Herabregulation der **I κ B**-Transkription die Reaktionskaskade negativ beeinflusst (de Moissac et al., 1999).

E1B-55kDa modifiziert die Zellzyklusprogression, indem es an das Tumorsuppressor-Protein **p53** bindet, das ähnlich wie pRB das Fortschreiten von der G₁- in die S-Phase und sowohl die virale als auch die zelluläre Replikation verhindert (Shenk T., 1996) und kollaboriert so mit den E1A-Proteinen, ruhende Zellen zu aktivieren. p53 reguliert gleichzeitig die Transkription verschiedener Gene, die in die Induktion der Apoptose involviert sind, unter anderem auch die Transkription der Vertreter der **Bax**-Familie (s.o.) (Pearson et al., 2000), ein Vorgang der ebenfalls durch die Bindung mit E1B-55kDa verhindert wird. In verschiedenen Zelllinien scheint p53 auch in die Initiierung der Apoptose durch den TNF α involviert zu sein (Ladiwala et al., 1999), dessen Blockierung allerdings hauptsächlich auf die E3-Genprodukte zurückzuführen ist (Lukashok et al., 2000). Eine weitere wichtige Funktion des E1B-55kDa ist der Transport der späten viralen Transkripte, wobei es als Synergist mit dem E4-34kDa (orf6) einen Komplex bildet (Goodrum and Ornelles, 1999).

Einige der wichtigsten Funktionen der adenoviralen frühen Gene sollen in folgender Grafik veranschaulicht werden.

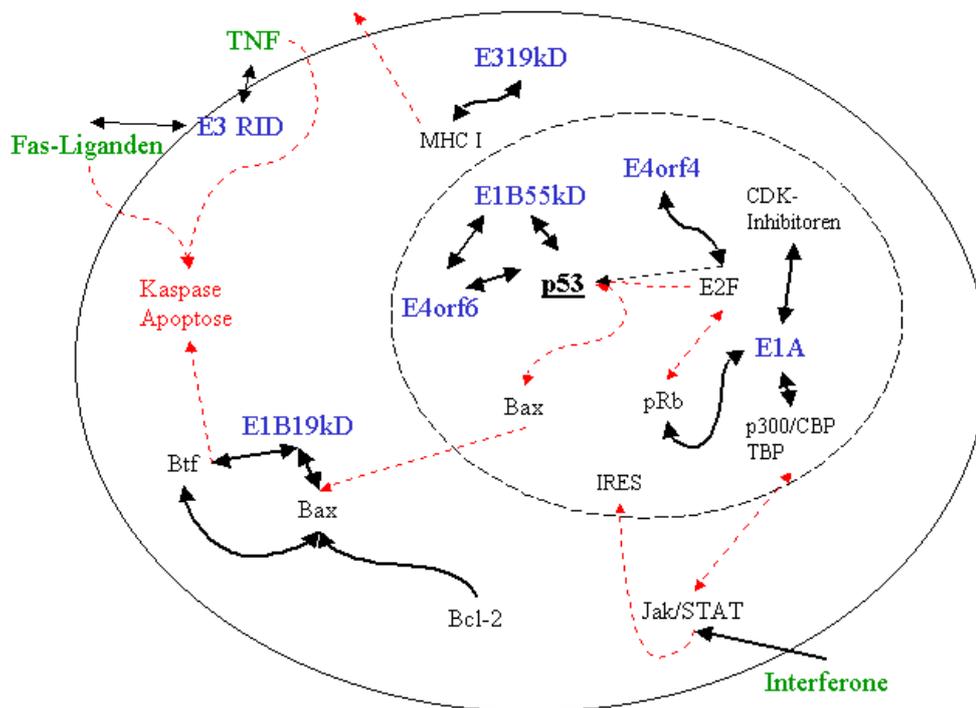


Abbildung 2.6: grafische Darstellung der wichtigsten E1-Funktionen

Die schwarzen Pfeile zeigen die Bindungen an, die die viralen frühen Transkripte mit den zellulären Proteinen eingehen. Die gestrichelten roten Pfeile geben die dadurch unterbundenen funktionellen Vorgänge der Wirtszelle an.

2.3. Einsatz adenoviraler Vektoren in der Tumor-Gentherapie

Chemotherapie und Bestrahlung als Therapiekonzepte maligner Karzinome erbrachten aufgrund unzureichender Wirksamkeit oder auch zu großer Toxizität allein oder in Kombination mit anderen Therapieverfahren bisher noch keine befriedigenden Ergebnisse. Somit werden ständig neue Therapieverfahren erprobt, wobei die Gentherapie mit adenoviralen Vektoren einen vielversprechenden Ansatz darstellt.

2.3.1. Transgene und ihre Wirkung

Bei dem Versuch, eine zulängliche Inhibierung des Tumorwachstums oder gar Regression des tumorös veränderten Gewebes zu erlangen, wurden zahlreiche therapeutisch wirksame Proteine mittels AdV exprimiert, wobei drei grundsätzliche

Herangehensweisen verfolgt wurden: **(i)** die lokale Aktivierung von „Pro-drugs“, **(ii)** die Expression von Tumorsuppressorgenen und **(iii)** die Immuntherapie. Eine der ersten Strategien war hierbei die lokale Anreicherung von Enzymen, die die Vorstufe eines Medikaments („Pro-drug“) in das wirksame Chemotherapeutikum metabolisieren. Das Konzept dieser Studien beinhaltet, dass die lokale Aktivierung des Therapeutikums mittels einer Enzym-kodierender Vektorapplikation direkt in das Tumorgewebe die Konzentration des systemisch eingesetzten Mittels im Tumorgewebe erhöhte und die allgemeine Toxizität verminderte. Zur Anwendung kamen hierbei die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (**HSVtk**) (van der Eb et al., 1998) (Serman et al., 1998) und die E.coli-Deaminase (**CD**) (Ohwada et al., 1996). HSVtk aktiviert die Vorstufe Gancyclovir zum Gancyclovir-Monophosphat, einem Inhibitor der DNA-Polymerase, CD metabolisiert 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil (5-FU), das ebenso wie Gancyclovir-Monophosphat als Suicide-Gen eingesetzt wird. Wie wenig später gezeigt werden konnte, erbrachte die Insertion des „double suicide“ **TK/CD-Fusionsgens** in einen AdV einen höheren Effekt als eines dieser Prodrug-Converting-Enzyme für sich allein (Freytag et al., 1998; Rogulski et al., 1997). Die *E. coli*-Uracil-Phosphoribosyltransferase (**UPRT**) greift ebenfalls in den Metabolismus des 5-FU ein, indem sie den initialen Aktivierungsvorgang zum 5-Fluorouridin-Monophosphat katabolisiert. Koyama et. al. (2000) untersuchten den Effekt des AdV-vermittelten Transfers von UPRT in humane Kolonkarzinomzellen (HT-29, KM12, SW1116) und konnten zeigen, dass der 5-FU-Metabolismus in den infizierten Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen deutlich gesteigert werden konnte. Zugleich stieg die Sensitivierung auf 5-FU auf das bis zu 70-fache.

Das **p53**-Protein, das einen der wichtigsten Tumorsuppressoren der Zelle darstellt, initiiert zwei Prozesse, defekte Zellen zu isolieren und unkontrolliertes Wachstum zu verhindern: zum einen hält es die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus zum anderen kann es den programmierten Zelltod bzw. Apoptose auslösen. Es fungiert dabei als Transkriptionsaktivator für eine große Anzahl von Genen, die für die Zellzyklusregulation und für die Apoptose unentbehrlich sind (Horowitz, 1999). Mutationen und Funktionsverlust des p53-Proteins sind für die Entstehung einer großen Anzahl von humanen Tumoren verantwortlich (Gottlieb and Oren, 1996). Um diesen Defekt auszugleichen und eine Apoptose von Tumorzellen zu induzieren, wurden verschiedene p53-exprimierende AdV konstruiert und sowohl *in vitro* an anaplastischen thyroidalen Tumorzellen (Blagosklonny et al., 1998), malignen

Gliomazellen (Cirielli et al., 1999), ösophagealen Karzinomzelllinien (Shimada et al., 2001) und Mamakarzinomzellen (Putzer et al., 1998) als auch *in vivo* an Prostatakarzinomen (Shirakawa et al., 2000), und anderen Tumormodellen getestet (Eastham et al., 2000; Perrotte et al., 2000). In diesen Studien konnte durch die erhöhte p53-Genexpression in Abhängigkeit von der Infektionsdosis eine Wachstumssuppression des Tumors *in vivo* von nahezu 25% und eine Apoptoserate *in vitro* von bis zu 48% nachgewiesen werden (Delatte et al., 2001).

Durch die Kombination von Radiotherapie und dem intratumoralen adenoviralen p53-Gentransfer in maligne Gliomazelltumore und Prostatakarzinome konnte eine Erhöhung der Bestrahlungseffizienz von bis zu 20% erreicht werden (Kim et al., 2001; Sasaki et al., 2001).

Andere Tumorsuppressorgene wie das **PTEN**, das eine Phosphatidylinositol-Phosphatase kodiert und die Aktivierung des Zellwachstums durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase inhibiert (Minaguchi et al., 1999) oder Vertreter aus der Retinoblastoma-Protein-Familie (**pRB/p105**, **pRB/p107**, **pBR/p130**), die eine wichtige Position in der Wachstumsregulation und der Tumorsuppression einnehmen (Claudio et al., 1999), wurden in AdV inkloniert und an verschiedenen Tumorzelllinien sowie *in vivo* getestet und führten zu vergleichbaren doch weniger signifikanten Resultaten, wie sie hinsichtlich der Wachstumsinhibierung und Apoptoseinduktion für p53 beschrieben wurden.

Durch AdV-vermittelte Substitution des Tumorsuppressorgens **p16**, das einen Stillstand in der G₁-Phase durch Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (D-CDK4) bewirkt und das unter anderem an verschiedenen ovariellen Karzinomzelllinien (SKOV3, OVCA420) (Wolf et al., 1999), humanen Blasenkarzinom-Zelllinien (EJ, UMUC-3) (Grim et al., 1997) und an Prostatakarzinomen *in vitro* und *in vivo* (Allay et al., 2000) eingesetzt wurde, konnte eine mit Apoptose einhergehende Inhibierung der Zellproliferation von 70-80% *in vitro* und eine Tumorsuppression *in vivo* gezeigt werden.

Der dritte Therapieansatz befasste sich mit der Immuntherapie. In die Expressionskassette der AdV wurden Gene für verschiedene Immunmodulatoren und/oder tumorspezifische Antigene inseriert. Viele Zytokine wurden auf diese Weise genutzt, wie zum Beispiel humanes Interleukin 2 (**IL-2**) (Robinson et al., 1998; Shao et al., 1999), das zytotoxische T-Lymphozyten stimuliert, die Zellaktivität der natürlichen Killerzellen erhöht und tumorinfiltrierende Lymphozyten unterstützen kann

(Russell, 2000). Im Tiermodell konnte mit diesen AdV eine Tumorregression erreicht werden, doch auf Grund nachweislich zu hoher Toxizität (Tolosa et al., 1996), konzentrierte sich die Weiterentwicklung der Vektoren auf andere Zytokine, wie zum Beispiel **IL-12** (Gambotto et al., 1999; Mazzolini et al., 2000), das auch in Kombination mit IL-2 (Addison et al., 1998), mit Tumorantigenen (Hirschowitz and Crystal, 1999) oder auch mit dem IFN- γ -induzierbaren Protein-10 (Narvaiza et al., 2000) zur Anwendung kam. Die Erkenntnis, dass viele Tumore spezifische Antigene aufweisen (siehe auch 2.4.3.), führte zur Entwicklung von AdV, die eben diese Antigene exprimieren, um auf diese Weise die antitumorale Immunantwort zu verstärken. Zum Beispiel entwickelten Hu & Garen (2000) einen AdV, der eine Effektor-domäne, bestehend aus der eine Zytolyse induzierenden Fc-Region des Immunglobulins IgG1, und eine angegliederte Targeting-Domäne (TD) kodierte. Die TD umfasste einmal den single-chain-F_v-Antikörper, der an spezifische, selektiv auf humanen Melanomzellen präsentierten Antigenen bindet (Hu and Garen, 2000), in einem weiteren Vektor wurde ein mutierter Faktor VII genutzt, der an gewebsspezifische Faktoren entarteter endothelialer Gefäßzellen (TF) koppelte und somit die durch den Tumorwachstum bedingte Angiogenese unterband und gleichzeitig die IgG-vermittelte Zytolyse auf die Tumorzellen konzentrierte (Hu and Garen, 2001).

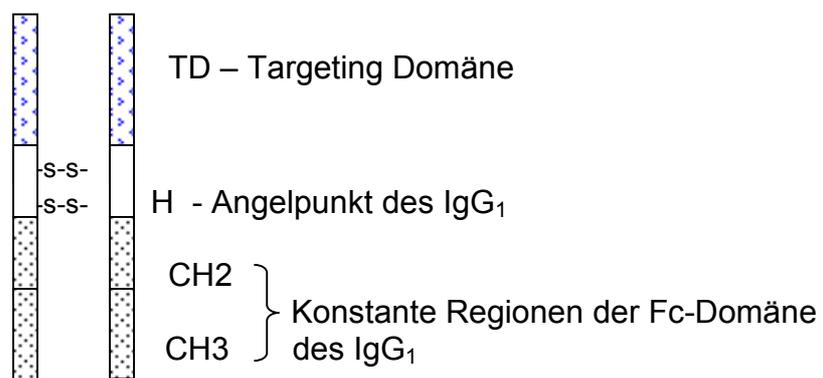


Abbildung 2.7:

Schematischer Aufbau des immunokonjugierten Moleküls von Hu & Garen (2000/2001); die Targeting-Domäne (TD) beinhaltet in einer Studie den single-chain-F-Antikörper, in einer weiteren einen mutierten Faktor VII.

Mausmodelle für Melanome und Prostatakarzinome zeigten, dass die Tumorzellen innerhalb von 194 Tagen eliminiert werden konnten, und Metastasen eine deutliche Regression anzeigten.

Auch die Fähigkeit **dendritischer Zellen**, Antigene effektiv zu präsentieren, wurde in einigen Studien dahingehend genutzt, die Zellen *ex vivo* mit einem spezifischen Antigen-tragenden AdV zu infizieren und darauf dem Patienten zu reimplantieren (Crystal, 1999). Weitere Versuche zeigten, dass mit murinen, mittels AdV modifizierten, dendritischen Zellen eine signifikante Reduktion von Lungenmetastasen (Wan et al., 1999) und eine deutlich verstärkte antitumorale Aktivität gegen Melanome (Tuting et al., 1999) erzielt werden konnte. Auch die AdV-vermittelte Transduktion von MUC1-Antigenen, die häufig von humanen Tumorzellen produziert werden, in dendritische Zellen, erzielte eine verstärkte Induktion MUC1-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (Maruyama et al., 2001).

Das wesentliche Problem bei den meisten der genannten AdV liegt in der geringen Transduktion des Tumorgewebes und der niedrigen Transgenexpression in den infizierten Zellen. Des Weiteren weisen sie eine eingeschränkte Tumorzellspezifität auf und stellen somit eine potentielle Gefährdung durch die Ausbreitung im umliegenden Gewebe und anderen Organen dar (Russell, 2000).

Hierfür wurden zwei mögliche Lösungswege eingeschlagen: **1.** das „transcriptional-targeting“ (2.4.2.), **2.** das „receptor-targeting“ (2.4.3.) (Wickham, 2000).

2.3.2. Verwendung tumorzellspezifischer Promotoren

Der humane Cytomegalievirus-Promotor (hCMV) wurde für Expression von in AdV inserierten Genen aufgrund seiner starken Enhancerfunktion und seiner relativ geringen Größe (380 bp) extensiv genutzt und ist zugleich durch den weitgehend unspezifischen Zelltropismus ubiquitär einsetzbar (Russell, 2000). Um allerdings die Transkription zytotoxischer Proteine gezielt auf Tumorzellen zu beschränken, wurde er in den letzten Jahren durch verschiedene tumorzell- oder gewebsspezifische Promotoren ersetzt.

Einer der ersten Versuche hierzu wurden 1995 von Hauck et. al. unternommen, in dem die selektive Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des tumorspezifischen Carcinoembryonic-Antigen (**CEA**)- Promotors untersucht wurde. Eine 90-fach höhere Genexpression in CEA-positiven Zellen (SW403) konnte

gegenüber in CEA-negativen Zellen (LR-73, HeLa R19) gezeigt werden. Doch es konnte auch festgestellt werden, dass weitere Mechanismen eine bedeutende Funktion in der effektiven Gentransduktion und -expression innehaben mussten, da die Infektion von HT-29, eine humane Kolonkarzinomzelllinie, die eine mittlere CEA-Expression aufweist, kaum eine Transgenexpression zeigte (Hauck and Stanners, 1995). Um die zudem schwache Transkriptionsaktivität des CEA-Promotors zu verbessern, wurde ein Hilfsvektor konstruiert, der das Fusionsprotein GV16 unter CEA-Kontrolle exprimiert. GV16 transaktiviert einen minimalen synthetischen Promotor (GAL4/TATA, **GT**), der vor das Gen von Interesse platziert wurde. Eine Koinfektion CEA-positiver Zellen mit den AdV CEA-GV16 und GT-LacZ resultierte in eine 20- bis 100-fache Steigerung des Reportergens β -Galaktosidase im Vergleich zu einer Monoinfektion mit CEA-LacZ (Koch et al., 2001).

Untersuchungen zu anderen gewebsspezifischen Promotoren folgten, bei denen unter anderem der pankreasspezifische murine **Amylase-Promotor** (Dematteo et al., 1997), der murine Preproendothelin-Promotor (**PPE-1**), der eine bevorzugte Expression eines Transgens in angiogenetischen Epithelzellen induzierte (Varda-Bloom et al., 2001) oder der lungenspezifische humane Surfactantprotein C (**SP-C**) Promotor, der durch die Kontrolle des E3-14.7kDa Gens in der Expressionskassette die inflammatorischen Prozesse im Respirationstrakt, die durch die adenovirale Infektion hervorgerufen werden, deutlich vermindern konnte. Die Expression eines Reportergens konnte hierdurch gesteigert und über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden (Harrod et al., 1998).

Die tumor-selektive Expression der *Bax*-Gene, die eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion durch die Caspasekette spielen und durch Überexpression den direkten Zelltod vermitteln, wurde durch die Insertion des **DF-3/MUC1**-Promotors erzielt und an verschiedenen epithelialen Karzinomzelllinien (ovariale, mamilläre und Epithelzellen der Prostata) verifiziert. Auch im Xenograftmodell konnte eine selektive Transduktion von humanen ovariellen Karzinomzellen (36M2), die eine hohe DF3-Expression und eine hohe Sensitivität gegenüber viralen Infektionen aufweisen, gezeigt, und die Formation von Tumorimplantaten bei sofortiger Vektorapplikation i.p. zu 99% vermieden werden (Tai et al., 1999).

Ein modifizierter **L-Plastin**-Promotor wurde auf seine Selektivität getestet und wies in Ovar- und Blasenkarzinomzelllinien eine weitaus höhere Expression der inserierten Transkriptionseinheiten auf als in normalen ovariellen oder peritonealen

Mesothelialzellen. In Kontrollexperimenten wurde bewiesen, dass die höhere Expression nicht durch eine unterschiedliche Infektiosität der Zellen bedingt war. Durch Insertion des Cytosindeaminase-Gens (CD) in die Expressionskassette konnte in diesen Zelllinien eine gesteigerte Sensitivität gegenüber 5-Fluorocytosin (siehe 2.4.1.) erzielt und eine mit CMV-kontrollierter CD-Expression vergleichbare Suppression des Tumorwachstums *in vivo* gezeigt werden (Peng et al., 2001). Auch Casado et. al. erreichten eine tumorzellspezifische Expression in ovariellen Karzinomzellen mittels zweier Promotoren, die einmal auf dem Midkine (**MK**)- zum anderen auf dem Zyklooxygenase-2 (**cox-2**)-Protein basierten. Insbesondere der cox-2-Promotor konnte hierbei die AdV-assoziierte Toxizität auf normales (Leber-) Gewebe abschwächen (Casado et al., 2001).

Das Prostata-spezifische Antigen (**PSA**) ist ein gründlich charakterisierter Tumormarker (Catalona, 1994), und seine Promotor-/Enhancersequenzen wurden bereits vielfältig in Studien zur Behandlung von Prostatakarzinomen eingesetzt. Er wurde unter anderem als Expressionskontrolle für das p53-Gen (Lee et al., 2000), für die tumorzell-spezifische kombinierte Suizidgen-Therapie mit HSVtk und CD (Yoshimura et al., 2001) genutzt und in AdV-Systemen, die hierdurch eine auf Prostatakarzinomzellen beschränkte Replikationskompetenz aufwiesen, stromaufwärts der Expressionskassette inseriert (Rodriguez et al., 1997). Einen anderen hoch prostataspezifischen Promotor nutzten Lowe et. al. (2001) in einer Studie, in der sie einen modifizierten Probasin-Promotor (**ARR2PB**), unter dessen Kontrolle das proapoptische *Bax*-Gen stand, in einen AdV einklonierten. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei einer Überexpression des anti-apoptischen Bcl-2 die Zahl überlebender Zellen drastisch durch das *Bax*-Protein gesenkt wurde (18%), und dabei gleichzeitig die Spezifität auf die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP beschränkt blieb.

Die Defizienz des in der Leber produzierten humanen α_1 -Antitrypsins (**hAAT**) führt zu einem gestörten Proteinabbau in Körperflüssigkeiten, der zu der am meist verbreiteten genetisch bedingten Ursache für Lebererkrankungen bei Kindern (unter anderem neonatale Hepatitis; chronisch obstruktives Lungenemphysem) gezählt wird (Perlmutter, 1995). Das hAAT-Gen wurde daher bereits mehrfach in Studien für einen effizienten Gentransfer untersucht (Guo et al., 1996; Kay et al., 1992; Morral et al., 1998; Morral et al., 1999; Rettinger et al., 1994). Um den adenoviralen Gentransfer stärker auf die Leber zu konzentrieren, wurde hAAT unter anderem unter die

Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotor gestellt (Pastore et al., 1999). Der Promotor des hAAT dagegen wurde bisher ausschließlich in anderen viralen Vektorsystemen, hauptsächlich in retroviralen Systemen, für die Kontrolle eines Transgens einkloniert und erprobt (Hafenrichter et al., 1994b;Hafenrichter et al., 1994a;Le et al., 1997;Okuyama et al., 1996) und wurde in weiteren Studien für die Kontrolle eines Reportergens ins Genom transgener Mäuse integriert (Gay et al., 1997;Ponder et al., 1991;Rodriguez et al., 1996;Yull et al., 1995). Im Vergleich zu anderen leberspezifischen Promotoren (muriner Albumin-Promotor, Apolipoprotein E-Promotor, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PECK)-Promotor der Ratte) wies der hAAT-Promotor eine bis zu 35-fach stärkere Potenz der Expressionsinduktion auf (Hafenrichter et al., 1994b;Okuyama et al., 1996). Die Evaluierung der relativen Promotoraktivität in primären Hepatozyten demonstrierte, dass die spezifische Aktivität eines 1200bp-hAAT-Promotors 18% der Aktivität des CMV-Promotors betrug, hingegen die Aktivität eines 732bp-umfassenden hAAT-Promotors lediglich 3%, was auf die Positionierung von Enhancersequenzen schließen ließ (Ponder et al., 1991).

Allgemein zeichneten sich bei den genannten Beispielen deutliche Einbußen hinsichtlich der Transkriptionsrate des inserierten Transgens im Vergleich zum CMV-Promotor ab. Die Selektivität wurde somit weitgehendst auf Kosten der Transkriptionseffizienz erreicht, und die Weiterentwicklung der AdV basierte auf zusätzlichen Methoden, die dieses Problem in Angriff nahmen (siehe unten).

2.3.3. Vektorbindung an tumorzellenspezifische Rezeptoren

Ein weiterer Therapieansatz für die Behandlung maligner Tumore stützte sich auf die Erkenntnis, dass eine große Anzahl von Tumoren spezifische Antikörper (AK) auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Das Ziel sah die primäre (ausschließliche) Bindung eines AdV an tumorzellenspezifischen Rezeptoren voraus. Modifikationen der Interaktionen des Fiberproteins mit dem Coxsacki-Adenovirus-Rezeptor (CAR) der Zielzelle oder des Pentons mit den Integrinen wurden genutzt, um den Tropismus eines AdV näher zu bestimmen. Versuche, auch Zellen zu infizieren, die kein CAR an ihrer Oberfläche tragen, wie z. B. glatte Muskelzellen oder B-Lymphozyten, führten durch Addition eines Oligolysinmotivs am N-terminalen Ende des Fiber-Proteins zu dem Ergebnis, dass die AdV eine hohe Affinität zu Polyanionen (z.B. Heparinsulfat)

zeigten und somit auch CAR-negative Zelltypen infizierten (Wickham et al., 1996). Staba et al. (2000) erreichten in verschiedenen malignen Gliomazelllinien mit einem im Fiber-Protein modifizierten AdV eine 10- bis 100-fache Steigerung der Transduktion im Vergleich zu einem unmodifizierten AdV.

Auch Modifikationen im Fiber-Knob ermöglichten eine direkte Bindung an alternative Rezeptoren, und durch die Addition des RGD-Motivs an das C-terminale Ende des Fiber-Proteins, konnte die Infektion CAR-defizienter Zellen beträchtlich gesteigert werden (Hidaka et al., 1999). Der vollständige Austausch des Fiber-Proteins des Ad2 gegen das des Ad17 erbrachte eine ca. 10-fache Steigerung der Bindungsfähigkeit an bronchiale Primär-Epithelzellen im Vergleich zum nativen Ad2, der kaum eine Affinität zu diesen Zellen zeigte, und die Expression des Reportergens β -Galaktosidase zeigte dabei eine Effizienzsteigerung des Gentransfers um das 15- bis 95-fache (Zabner et al., 1999).

Durch den Einsatz bispezifischer AK (Liganden) konnten AdV direkt gegen spezielle Zelltypen gerichtet werden (Wickham et al., 1997). Z. B. generierten Miller et al. (1998) einen Liganden, der eine Bindung zwischen dem adenoviralen Fiberprotein und dem Epidermal Growth Factor (EGF) ermöglichte. So konnte die Spezifität der AdV gegen Gliomazellen, die nur eine geringe CAR- aber eine deutliche EGF-Präsentation auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, erhöht werden. Ein ähnliches Modell zeigte die gerichtete AdV-Transduktion *in vivo*, wobei ein Ligand des Fibroblast Growth Factor (FGF), ein Faktor, der in abnorm proliferierendem Gewebe überexprimiert wird, eingesetzt wurde (Printz et al., 2000). Die intravenöse Administration des AdV zeigte eine 10-20-fach niedrigere Konzentration in der Leber als ein Kontrollvektor, wodurch die Toxizität und die folgende Gewebsschädigung deutlich geringer ausfiel.

Ein weiterer bispezifischer AK blockierte die Bindung des Fiber-Proteins an den CAR, ermöglichte aber gleichzeitig die spezifische Bindung an einen alternativen tumorzellspezifischen Rezeptor (humanes epitheliales Adhäsionsmolekül – EpCAM), der in (prä-) malignen Drüsenzellen des Magens und des Ösophagus vermehrt exprimiert wird, wodurch die Infektion normaler CAR-exprimierender Zellen vermindert werden konnte (Heideman et al., 2001). Auch eine gerichtete humorale Immunantwort gegen bestimmte Tumorzellen konnte durch den Einsatz von Liganden erreicht werden (siehe 2.4.1.).

2.4. Restricted-Replikationskompetente-Adenoviren (RRCA) in der Tumor-Gentherapie

Bedingt replikationskompetente Adenoviren (RRCA) sind Viren, die aufgrund verschieden eingesetzter Mutationen, Deletionen und Substitutionen im Genom, insbesondere in der E1-Region, nur unter bestimmten Voraussetzungen replikationsfähig sind und eine Zellyse induzieren. Die Expression der adenoviralen E1A- und E1B-kodierten Proteine sind 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).

Die Tumorzellyse ist die direkte Konsequenz der adenoviralen Replikation (Curiel, 2000). Gleichzeitig ist es für den potentiellen Einsatz von RRCAs in der Tumorgentherapie von großer Bedeutung, dass die Infektion von Nicht-Tumorzellen ausbleibt, was durch die Modifikation des natürlichen viralen Tropismus, entweder durch Alteration der Anlagerung und Aufnahme in die Zielzelle oder Änderung der funktionalen Aspekte der viralen Replikation versucht wurde zu verifizieren. Eine weitere nützliche Eigenschaft replikationskompetenter Viren wäre die Fähigkeit, die frühe Erkennung und Eradikation durch das Immunsystem zu vermeiden, ein Schritt, der in früheren Studien durch Administration von Immunsuppressiva (z. B. Kortison) praktiziert wurde, allerdings zur Folge hatte, dass zwar eine initiale Tumornekrose erreicht wurde, aber die folgende Antikörperproduktion nicht umgangen werden konnte (Alemany et al., 2000).

2.4.1. Tumorzellspezifität und Effizienz der Therapie bei Verwendung unterschiedlicher RRCA-Varianten

Verschiedene RRCAs wurden bisher entwickelt, die zum Ziel die selektive Replikation in Tumorzellen hatten und die auf unterschiedlichen Grundmechanismen der viralen Physiologie basierten. Zwei Hauptstrategien wurden hierbei verfolgt: **1.** virale Gene, die in Tumorzellen für die Aktivierung des Zellzyklus durch p53- oder pBR-Bindungen entbehrlich waren, wurden komplett oder partiell deletiert und **2.** wurde die Transkription der viralen Gene wurde durch den Austausch des nativen

Promotors gegen tumorspezifische Promotoren auf das Zielgewebe gerichtet (Alemany et al., 2000).

Das sogenannte **ONYX-015 (Ad2/5 dl1520)** stellt dabei das mit Abstand am häufigsten in der experimentellen Forschung und das einzige bisher beim Menschen eingesetzte RRCA dar (Bischoff et al., 1996; Ganly et al., 2000; Heise et al., 1997; Khuri et al., 2000; Nemunaitis et al., 2001; Rogulski et al., 2000). Ursprünglich wurde angenommen, dass durch das Fehlen des funktionell aktiven E1B-55kDa-Proteins die Replikationsfähigkeit dieses RRCA auf p53-negative Zellen, die also eine typische Eigenschaft tumoröser Entartungen aufweisen, beschränkt sei (Bischoff et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass dl1520 die p53-negativen (p53-) Zelllinien C33A und U373 in gleichem Maße lysierte wie ein Wildtyp-Virus (Ad-wt), dabei allerdings 100-fach weniger effektiv in der p53-positiven (p53+) Zelllinie U87 replizierte. Das gleiche Ergebnis zeigten die Zelllinien RKOp53+/RKO. Eine komplette Tumorelimination im murinen Xenograftmodell zeigten zudem Heise et al. (1999). Konträre Ergebnisse hierzu lieferten allerdings Rothmann et al. (1998), die im Lyse-Assay zeigen konnten, dass U373 (p53-) 100-fach niedrigere dl1520-Level im Vergleich zum Ad-wt produzierte und die Zelllinie U87 (p53+) dagegen gleiche Mengen beider Typvarianten generierte. Weitere Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die spezifische Replikationskompetenz des dl1520 nicht auf das Fehlen oder die Präsenz des p53 zurückzuführen ist, sondern es konnte auch in Tumorzelllinien, die ein funktionell aktives p53 exprimieren, eine Replikation des RRCA nachgewiesen werden (Li et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit von der Zyklusphase besteht, in der sich die Zielzelle befindet, und ONYX-015 in Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden, lediglich langsamer reife Viruspartikel generiert (Goodrum and Ornelles, 1998) und die Ausprägung des zytopathogenen Effekts dadurch deutlich niedriger ausfällt als beim Ad-wt (Hall et al., 1998). Der Grund ist in der reduzierten Sytheserate der späten viralen Proteine durch den beeinträchtigten mRNA-Transport, der normalerweise durch den E1B-55kDa-E4-34kDa-Komplex vermittelt wird, zu finden (Harada and Berk, 1999). Die systemische oder lokale Administration von dl1520 für die Behandlung sowohl ovarialer, kolorektaler, oraler Tumore als auch Lungen- und Prostatakarzinome lieferte in neueren Untersuchungen selbst in hoher Dosierung (2×10^{13} Partikel) keine objektiv messbaren Resultate (Ganly et al., 2000).

Weiterentwicklungen des dl1520 beinhalteten die Insertion des *HSV-tk*-Gens in die Expressionskassette (**AdTK^{RC}**) mit der additiven Applikation von Ganciclovir (Wildner et al., 1999), sowie Mutationen im Fiberprotein (**AdvE1AdB-F/K20**), die eine erhöhte Transduktionseffizienz des RRCAs in Gliomazellen ermöglichten (Shinoura et al., 1999) oder die Koinfektion mit replikationsdefizienten AdV, die dadurch eine deutlich gesteigerte Genexpression zeigten (**AxE1AdB & AdCAhIL-2**) (Motoi et al., 2000). Eine weitere E1-Adenovirusmutante (**AdΔ24**) basierte auf der Deletion der pRB-Bindungsdomäne in der E1A-Region, wodurch sie außerstande war, ruhende Zellen über die G₂/M-Grenze des Zellzyklus zu bringen (Fueyo et al., 2000). Versuche zur Lyse von Glioblastomen zeigten durch eine vorausgehende Infektion eines pRB-exprimierenden AdV die Refraktivität pRB-positiver Zellen gegenüber AdΔ24, und *in vivo* Experimente konnten bei mehrmaliger Applikation von AdΔ24 eine Inhibition des Tumorwachstums von bis zu 83% aufweisen. Auch Suzuki et. al. (2001) nutzten diesen in der E1A-pRB-Bindungsdomäne deletierten RRCA und kombinierten hierzu eine Modifikation im Fiber-Knob. Die genetische Addition des RGD-Motivs an den Fiber-Knob (**AdΔ24RGD**) ließ eine 43-fach effektivere Propagation infektiöser Viren in A549 Zellen zu (Plaque-Assay) und resultierte in eine 7-fach (in A549) bzw. 3,5-fach (in LNCaP, humane Prostatakarzinomzellen) höhere Induktion der Zelllyse als AdΔ24. *In vivo* überstieg die onkolytische Potenz des AdΔ24RGD die des AdΔ24 bis zu 55% in Abhängigkeit von der intratumoralen Infektionsdosis (Suzuki et al., 2001).

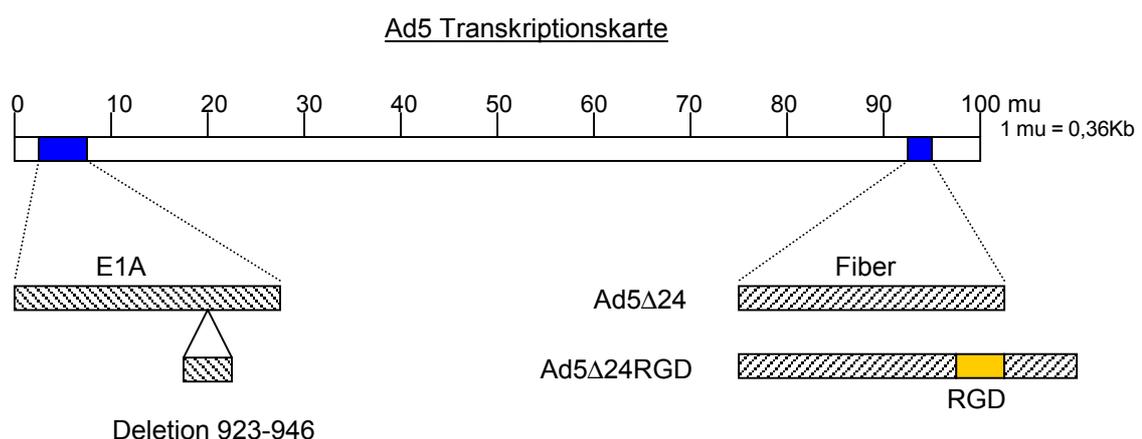


Abbildung 2.8: AdΔ24RGD (Suzuki et al., 2001)

Ein anderer RRCA wurde durch das Belassen des Adenovirus Death Protein (ADP) in der E3-Region und durch zwei Deletionen in der CR1- und CR2-Domäne generiert (**dl01/07KD1/KD3**) (Doronin et al., 2000). Das ADP versprach eine effektivere Zellyse und damit eine schnellere Transduktion des Tumorgewebes (Tollefson et al., 1996b). Durch die intakte CR3-Domäne wurde die Fähigkeit zur Transaktivierung der weiteren frühen Transkriptionseinheiten aufrechterhalten, die Potenz aber, ruhende Zellen durch Bindung an pRB und p300 in die S-Phase zu überführen, wurde durch die Mutationen in CR1 und CR2 aufgehoben, mit Bedacht darauf, dass sich teilende Tumorzellen von allein die S-Phase erreichen und nur hier der RRCA repliziert (Howe et al., 2000). Die E3-Region wurde bis auf das ADP deletiert. Die Überexpression des ADP konnte mittels Immunoblotting in A549 Zellen nachgewiesen werden, ebenso eine kaum ausgeprägte Replikation in primären oder ruhenden Zellen (humane Fibroblasten HEL-299, WI-38; primäre humane Bronchialepithelzellen, primäre humane Endothelialzellen aus dem Truncus pulmonaris). In der Karzinomzelllinie A549 dagegen waren 5 Tage p.i. 75% der Zellen apoptotisch. In HeLa/ME-180 (Zervixkarzinom), DU145/PC-3 (Prostatakarzinom) und HepB-3 (Leber) konnte eine Zellyse innerhalb von 7-10 Tagen induziert werden. Auch im Xenograftmodell an immundefizienten Mäusen wurde die Fähigkeit zur Wachstumssuppression implantierter Tumore durch dl01/07 am Beispiel von HepB-2 Zellen bewiesen (Doronin et al., 2000).

Mehrere RRCAs wurden entwickelt, in denen das adenovirale E1A-Gen unter die Kontrolle eines tumorspezifischen Promotors gestellt wurde.

Beispiele hierfür sind **Ad5CN706**, in welchem der Prostata-spezifische-Antigen (PSA)-Promotor eingesetzt wurde (Chen et al., 2001;Rodriguez et al., 1997), **Ad5CN763**, der das E1A-Gen unter der Kontrolle des Kallikrein-2-(hK-2)-Promotors exprimiert (Yu et al., 1999b) und **Ad5CN764**, der durch die Insertion des PSA-Promotors vor die E1A-Region und zusätzlicher Kontrolle des E1B-Gens durch den hK-2-Promotor eine Weiterentwicklung dieser beiden RRCAs hinsichtlich einer erhöhten Spezifität gegenüber Prostatakarzinomen aufwies (Yu et al., 1999b). Mittels Ad5CN764 wurde eine 10000-fach höhere Selektivität für die Lyse PSA-positiver gegenüber PSA-negativer Zellen erzielt.

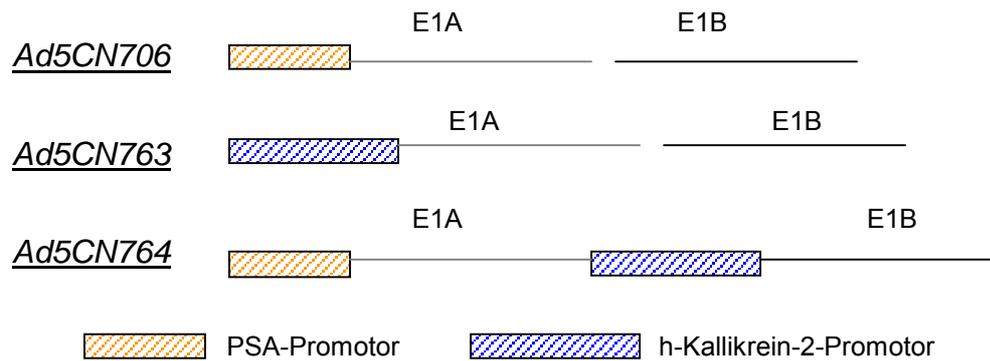


Abbildung 2.9: Einsatz der prostataspezifischen Promotoren PSA und hK-2

Ein ähnliches System (**CV787**) entwickelten Yu et. al. (1999), indem sie den prostataspezifischen Probasin-Promotor für die E1A-Expression und den PSA-Promotor für die E1B-Expression nutzten. Die gesamte E3-Region wurde im Vektor belassen. Die Replikation des CV787 war in PSA-positiven Zellen mit der des Ad-wt vergleichbar, hingegen in PSA-negativen Zellen um 10^4 - 10^5 -fach weniger effizient (Yu et al., 1999a).

Hallenbeck et. al. (1999) nutzten den Promotor des α -Fetoprotein (AFP) für die Transkription des E1A-Gens, um hepatozelluläre Karzinome zu bekämpfen. Das AFP-Gen wird in hohem Maße in 70-80% der Patienten mit hepatozellulären Karzinomen exprimiert und konnte dagegen in gesunden Individuen nicht nachgewiesen werden. Der generierte Adv **AvE1a04i** konnte in einem *ex-vivo*-Experiment an AFP-positiven Leberkarzinomzellen ein Tumorstadium unterdrücken, in AFP-negativen Karzinomzellen hingegen nicht. Allerdings war *in vitro* auch in sieben AFP-negativen humanen Zelllinien, primären Lungenepithel- und Endothelialzellen eine leichte Virusreplikation nachweisbar (Hallenbeck et al., 1999a).

Eine Weiterentwicklung des CV787 und des AvE1a04i stellte der RRCA **CV890** dar, der durch die Insertion der IRES-Struktur des Enzephalomyokarditis Virus (EMCV) (Jackson and Kaminski, 1995) sowohl E1A als auch E1B unter der Kontrolle eines singulären AFP-Promotor exprimiert. Sowohl die Replikationsspezifität als auch die Replikationseffizienz in AFP-positiven Zellen konnte dadurch deutlich verbessert werden. Eine Gegenüberstellung dieser AFP-kontrollierten RRCAs in Xenograftmodellen zeigte eine signifikante Steigerung der Wachstumsinhibierung durch CV890

in HepB3 (AFP+) Tumoren verglichen mit AvE1a04i, in LNCaP (PSA+/AFP-) Tumoren hingegen zeigte CV890 im Gegensatz zu CV787 keinerlei Antitumoreffizienz, womit die Spezifität von CV890 auch *in vivo* bewiesen werden konnte (Li et al., 2001).

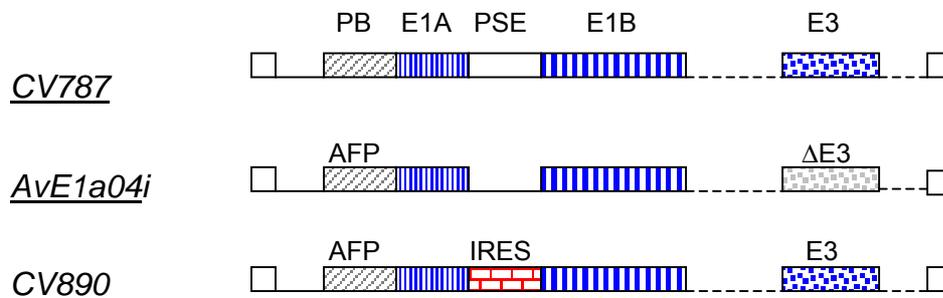


Abbildung 2.10: CV787, AvE1a04i, CV890

PB = Probasin-Promotor; PSE = Prostata-spezifischer-Antigen-Promotor; AFP = α-Fetoprotein-Promotor; IRES = Internal Ribosomal Entry Site des Enzephalomyokarditis Virus (EMCV)

Ein weiterer RRCA wurde für den Einsatz in fortgeschrittenen Neuroblastomen und im Ewings-Sarkom (ES), ein maligner Knochenmarkstumor, konstruiert (Adachi et al., 2001). Die E1-Expression wurde hier unter die Kontrolle des Midkine-Promotors (MK) gestellt (**AdMKE1**), da für beide Tumortypen eine hohe Expression des Wachstums-/Differenzierungsfaktors Midkine charakteristisch ist. Neuroblastomzellen und Zellen des ES (SK-ES-1, RD-ES) sind sensitiv für eine Ad-Infektion, wogegen Stammzellen im Knochenmark sich als refraktär erweisen. Zudem weisen beide Karzinome nur geringe interzelluläre Kontakte und selten eine Abnormalität der p53-Funktion auf, so dass herkömmliche Verfahren kaum einen therapeutischen Effekt hatten und bisher generierte AdV bei dieser Art von Tumorerkrankung wenig Erfolg versprechend waren. Die Spezifität des MK-Promotors konnte mittels eines Luciferase-Assays in den untersuchten Zelllinien dargelegt werden, was im Konsens mit dem Nachweis des zellspezifischen Cellkilling durch AdMKE1 lag (Adachi et al., 2001).

Auch Matsubara et. al. (2001) setzten die E1A-Region unter eine tumorspezifische Promotorkontrolle. **Ad-OC-E1A** enthält den Promotor des Knochenmatrix-Proteins Osteokalzin (OC), das ausschließlich in sich differenzierenden Osteoblasten produziert und zum Zeitpunkt der Knochenmineralisierung in der Knochenmatrix abgelagert wird. Auf der Basis der reziproken zellulären Interaktion zwischen Prostatakarzinomzellen und den Stromazellen der Prostata bzw. den Stromazellen

des Knochens wurde hier ein RRCA entwickelt, der sowohl epitheliale Tumorzellen als auch Tumorzellen mit Ursprung im Knochenstroma erfasste und dabei unabhängig von der PSA-Expression war. Verschiedene humane Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, C4-2, PC-3, DU-145, ARCaP) zeigten *in vitro* eine Wachstumsinhibierung bis zu 70% und auch in humanen Prostatafibroblasten (9096F) und Osteosarkomzellen (MG-63) konnte eine deutliche Zelllyse festgestellt werden. *In vivo* Experimente zeigten sowohl die Effektivität der intratumoralen Injektion von Ad-OC-E1A in Prostatakarzinome als auch die komplette Regression von Knochenmetastasen nach systemischer Applikation in zwei von fünf Tieren. Ein Tier ließ allerdings keinen Effekt des Ad-OC-E1A erkennen, aber auch die restlichen Tiere konnten eine deutliche Inhibierung des Tumorwachstums aufweisen (Matsubara et al., 2001).

Für die tumorspezifische Transgenexpression in Lebermetastasen wurde der RRCA **Δ Ad.IR-BG** entwickelt, dessen Entwicklung sich die Tatsache zu Nutze machte, dass einerseits eine Insertion von Inverted Repeats (IR) in die E1-Region eine vorhersagbare genomische Reorganisation in Abhängigkeit von einer viralen Replikation vermittelte (Steinwaerder et al., 1999) und dass andererseits viele Karzinome eine E1A-ähnliche Aktivität zeigen und dadurch zur *Trans*-Komplementierung von E1A(-) AdV imstande sind. Es wurde angenommen, dass die Expressionskassette flankierende IRs das Transgen mit dem Promotor, in Folge einer homologen Rekombination, in Verbindung bringen. Eine adenovirale Replikation und somit auch die Δ Ad.IR-BG-vermittelte Genexpression konnte durch Applikation von Hydroxyharnsäure *in vitro* unterbunden werden. Die Diskriminierung zwischen Tumor- und gesundem Lebergewebe konnte *in vivo* mittels histopathologischer Schnitte bewiesen werden, wobei allerdings eine Transduktion der Tumorzellen in Lebermetastasen bei systemischer Administration von lediglich 5% erreicht wurde (Steinwaerder et al., 2001).

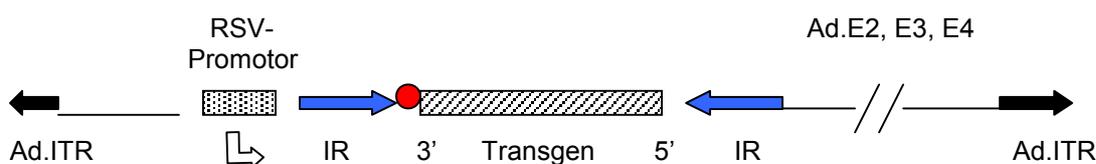


Abbildung 2.11: Δ Ad.IR-BG; (Steinwaerder et al., 2001) ● = bidirektionales Poly-A-Signal SV40

Der bereits oben beschriebene DF3/MUC1-Promotor (siehe 2.4.2.) wurde von Kurihara et. al. (2000) für die selektive E1-Expression in MUC1-positiven Mamakarzinom-zellen eingesetzt. Durch zusätzliche Integration der TNF α -cDNA unter CMV-Promotorkontrolle (=> **Ad.DF3-E1/CMV-TNF**) wurde die Antitumoraktivität potenziert. Die Infektion der MUC1-positiven Zelllinie MCF-7 mit Ad.DF3-E1/CMV-TNF erbrachte eine 10⁶-fach höhere TNF α -Produktion als die Infektion mit Ad.CMV-TNF und war damit auch 10⁵-10⁶-fach höher als in der MUC1-negativen Zelllinie PA-1. Im Xenograftmodell konnte nach intratumoraler Administration von Ad.DF3-E1/CMV-TNF und CMV-TNF der wachstumshemmende Effekt auf die MUC1-negative Zelllinie MDA-MB-231 auf die alleinige Wirkung des TNF α zurückgeführt werden, wobei hingegen bei der inokulierten MUC1-positiven Zelllinie MCF-7 eine Tumorregression bis auf eine kaum noch palpierbare Größe erzielt wurde (Kurihara et al., 2000).

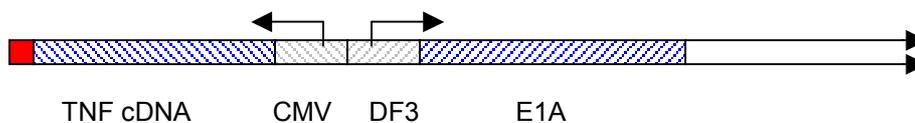


Abbildung 2.12: Ad.DF3-E1/CMV-TNF; (Kurihara et al.; 2000) ■ = Poly-A-Signal SV40

Die alleinige Auswirkung der Deletion des E1B-19kDa-Proteins, das einen potenten Inhibitor der frühzeitigen Apoptose im regulären viralen Replikationszyklus darstellt, wurde in einer weiteren Studie dokumentiert (Sauthoff et al., 2000). Die E1B-19kDa-deletierte Virusmutante **dl337** induzierte in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien deutlich stärker eine Apoptose als Ad-wt. Die Zahl der infektiösen viralen Partikel im Überstand der dl337-infizierten Zellen war verglichen mit Ad-wt erhöht und dl337 induzierte wesentlich größere Plaques in A549 Zellen, was aus der frühen viralen Freigabe und der verstärkten interzellulären Ausbreitung resultierte (Sauthoff et al., 2000).

Übersichtstabelle der beschriebenen RRCA's:

Name	Basis der Tumor- Therapeutische		Literaturverweis
	Selektivität	Charakteristik	
dl1520	E1B-55kDa-Deletion hebt p53-Bindung auf	Onkolyse	(Bischoff et al., 1996)
AdTK ^{RC}	E1B-55kDa-Deletion hebt p53-Bindung auf	Onkolyse & Suicide-Gentherapie	(Wildner et al., 1999)
AdvE1AdB-F/K20	E1B-55kDa-Deletion hebt p53-Bindung auf	Onkolyse mit erhöhter Infektivität	(Shinoura et al., 1999)
AdΔ24	E1A-Deletion hebt pRB-Bindung auf	Onkolyse	(Fueyo et al., 2000)
AdΔ24RGD	E1A-Deletion hebt pRB-Bindung auf; erhöhte Vektoraufnahme durch Addition des RGD-Motivs im Knob	Onkolyse mit erhöhter Infektiosität	(Suzuki et al., 2001)
dl01/07 (KD1/KD3)	E1A-Deletionen heben pRB- und p300-Bindung auf	Onkolyse, verstärkt durch Überexpression von ADP	(Doronin et al., 2000)
CN706	E1A-Regulation durch PSA-Promotor	Onkolyse	(Chen et al., 2001; Rodriguez et al., 1997)
CN763	E1A-Regulation durch Kallikrein-2-Promotor	Onkolyse	(Yu et al., 1999b)
CN764	E1A-Reg. durch PSA-Promotor, E1B-Reg. durch Kallikrein-2-Promotor	Onkolyse	(Yu et al., 1999b)
CV787	E1A-Reg. durch Probasin-Promotor, E1B-Reg. durch PSA-Promotor	Onkolyse	(Yu et al., 1999a)
AvE1a04i	E1A-Reg. durch AFP-Promotor	Onkolyse	(Hallenbeck et al., 1999b)
CV890	E1A- und E1B-Reg. durch AFP-Promotor	Onkolyse	(Li et al., 2001)
dl337	Keine	Onkolyse, verstärkt durch E1B-19kDa-Deletion	(Sauthoff et al., 2000)
AdMKE1	E1A-Regulation durch MK-Promotor	Onkolyse	(Adachi et al., 2001)
Ad-OC-E1A	E1A-Regulation durch OC-Promotor	Onkolyse	(Matsubara et al., 2001)
Ad.DF3-E1/CMV-TNF	E1-Regulation durch DF3/MUC1-Promotor	Onkolyse, verstärkt durch TNF	(Kurihara et al., 2000)
ΔAd.IR-BG	Insertion von IRs beidseits der Expressionskassette	Selektive Transduktion von Metastasen	(Steinwaerder et al., 2001)

Tabelle 2.1: verschiedene RRCA-Systeme

2.4.2. Kombination von RRCA und AdV

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kombination von RRCA mit Suizidgen- oder Zytokin-exprimierenden AdV die Wirksamkeit der Tumorthherapie weiter erhöht. Die Basis hierfür ist die zytolytische Wirkung der intrazellulär replizierenden RRCA an sich, die durch RRCA vermittelte Replikation der ko-applizierten AdV, die Ausbreitung beider AdV im Zielgewebe und die zelltoxische Wirkung der durch den AdV exprimierten Transgene (Motoi et al., 2000).

Einer der ersten grundlegenden Versuche hierzu wurde von Dion et. al. (1996) durchgeführt, der ein die E1-Proteine kodierendes Plasmid mit einem replikationsdefizienten, die HSVtk exprimierenden AdV koinfizierte. Die Kotransduktion des E1-Plasmids mit dem AdV-HSVtk in subkutane Tumorknoten resultierte in einen gesteigerten therapeutischen Effekt gegenüber der Kombination des AdV-HSVtk mit einem irrelevanten Plasmid (Dion et al., 1996).

Ein auf dem ONYX-015-System basierender RRCA (**AxE1AdB**) wurde mit einem E1-defizienten, das humane IL-2 exprimierenden AdV (**AxCAhIL2**) koinfiziert und es resultierte eine 110-fache Expression des Transgens in p53-negativen Pankreaskarzinomzellen verglichen mit der alleinigen Infektion von AxCAhIL2. Im Mausmodell konnte mit dieser Strategie eine deutliche Reduktion des Tumolvolumens erreicht werden (Motoi et al., 2000).

In einer weiteren Studie wurde das Adenovirus 5 Genom auf zwei defekte Viren aufgeteilt, so dass eine gegenseitige *Trans*-Komplementierung nur in replizierenden Tumorzellen möglich war. Dabei trug einer der Vektoren (**GT5610**) die minimalen Elemente, die in *cis* für Replikation und Verpackung notwendig sind und die viralen E1-Gene mit der E1A-Region unter der Kontrolle des α -Fetoprotein (AFP)-Promotors. Ein zweiter Vektor besaß sämtliche adenovirale Gene mit Ausnahme der E1-Region (**AdHbeta**). Die Koinfektion hepatozellulärer Karzinome mittels der beiden komplementären AdV demonstrierte die Potenz zur Zellyse und die Vektorausbreitung im Tumorgewebe (Alemany et al., 1999).

Name	Basis der Tumor-Selektivität	Therapeutische Charakteristik	Literaturverweis
AdHSVtk & E1-Plasmid	keine	Onkolyse	(Dion et al., 1996)
AxE1AdB & AdCAhIL-2	E1B-55kDa-Deletion hebt p53-Bindung auf	Onkolyse & Immunogen-therapie	(Motoi et al., 2000)
GT5610 & AdH β	E1A-Reg. durch AFP-Promotor	Onkolyse	(Alemany et al., 1999)

Tabelle 2.2: Kombination von RRCA und AdV

2.5. Induzierbare Genexpressionssysteme

In klinischen Anwendungen ist die Regulierung der Transgenexpression von Vorteil sowohl hinsichtlich der Aufrechterhaltung der therapeutischen Proteinkonzentration in einem für die Behandlung zweckmäßigen Rahmen als auch der Optimierung der Effektivität in Rücksichtnahme auf die sich entwickelnde Natur einer Krankheit. In der Gentherapie zeigen regulierbare Systeme eine große Nützlichkeit für die Expressionskontrolle therapeutisch wirksamer Gene (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000). Im Falle des Einsatzes replizierender Viren, die diese Gene übertragen sollen oder die eine Tumorlyse direkt auslösen können, ist die Regulation der viralen frühen Promotoren essentiell für die Kontrolle der viralen Replikationsrate, wodurch für die Nutzung rekombinanter Viren eine Erhöhung der Sicherheit erreicht wird. Die ersten regulierbaren Systeme basierten auf natürlichen Wege induzierbaren Promotoren, die allgemein unter einer hohen Basalexpression und einer schwachen Induzierbarkeit der Transgenexpression litten, und die auf Wirkstoffe reagierten, die häufig pleiotropische Effekte auf eukaryontische Zellen ausübten (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000). Ein Beispiel hierfür war der AdV **dl312**, der auf die Erkenntnis hin, dass eine große Anzahl von Karzinomen eine durch humanes IL-6 induzierbare E1A-ähnliche Aktivität aufweisen und damit zur *Trans*-Komplementierung E1-deletierter AdV fähig sind, konstruiert wurde. Durch die zusätzliche Applikation von IL-6 konnte die *Trans*-Komplementierung verstärkt werden (Rancourt et al., 1999).

Die Involvierung des radiosensitiven Egr-1-Promotors in den replikationsdefizienten AdV **Ad.Egr-1/lacZ** ließ eine Transkriptionsregulation des Reportergens β -Galaktosidase durch ionisierende Strahlung zu. Die Expression des Transgens konnte durch eine Strahlungsdosis von 2 Gy, die klinisch als Standard einer fraktionierten Radiotherapie für Hirntumore eingesetzt wird, in 9L Ratten-

Gliosarkomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nahezu verdreifacht werden (Manome et al., 1998).

In einer weiteren Studie wurde der E1A- und E4-Promotor sowohl durch Teile des pS2-Promotors, der gewöhnlich in den Mukosazellen des Gastrointestinaltraktes (Ribieras et al., 1998) und auch zu 50% in humanen Mamakarzinomen (Rio and Chambon, 1990) nachweisbar ist, als auch durch zwei Östrogen-Response-Elemente (EREs) ersetzt (**Ad5ERE2**), so dass hier eine Induktion der RRCA-Replikation bevorzugt in Zellen erfolgte, die Östrogen-Rezeptoren (ERs) exprimieren, welche intrazellulär in Anwesenheit von Östrogen als Transkriptionsfaktoren agieren. Die Replikation eines E1-deletierten AdVs, der das proapoptische Bcl-xs Gen unter der Kontrolle des Rous-Sarkoma-Virus (RSV)-Promotors exprimierte, konnte durch die *Trans*-Komplementierung des Ad5ERE2 in ER-positiven Zellen und in Anwesenheit von 17 β -Östradiol induziert und durch das Antiöstrogen Tamoxifen inhibiert werden. Der zytopathische Effekt des Ad5ERE2 in ER-positiven Zelllinien war vergleichbar mit dem des Ad-wt, wogegen ER-negative Zelllinien eine zweifach höhere Resistenz gegen Ad5ERE2 als gegenüber Ad-wt aufwiesen. Im Mausmodell wurde die Kombination des Bcl-exprimierenden E1-deletierten AdV zusammen mit Ad5ERE2 untersucht und konnte bei wöchentlicher intratumoraler Applikation eine Reduktion des Tumorumens innerhalb von 3 Wochen von mehr als 90% aufzeigen (Hernandez-Alcoceba et al., 2000).

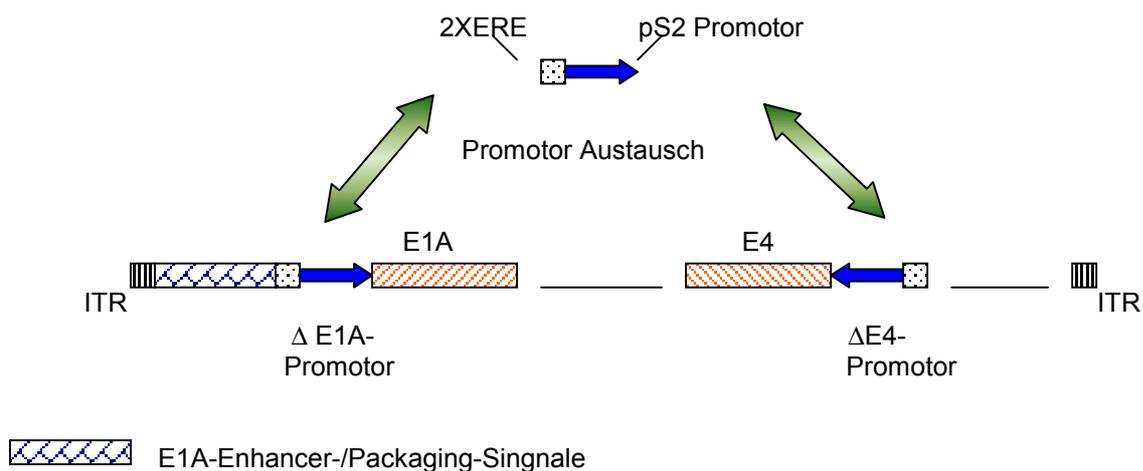


Abbildung 2.13: Ad5ERE2 (Hernandez-Alcoceba et al., 2000)

Eine Verbesserung dieses RRCA wurde ein Jahr später demonstriert (**AdEHrk**), welcher durch die zusätzliche Insertion von Hypoxia-Responsive-Elementen (HRE) in den Promotor seine Spezifität auf Zellen, die entweder eine Überexpression von ERs oder des Hypoxia-induzierbaren Faktors (HIF) aufwiesen, erhöhte. HIF konnte als eine Antwort auf die oftmals im Tumorgewebe vorherrschende Hypoxie vermehrt nachgewiesen werden und wurde bereits in anderen Studien für den gerichteten Gentransfer in solide Tumoren eingesetzt (Ruan et al., 1999). Die Einklonierung des proapoptotischen Gens *Harakiri* in AdEHrk resultierte in ER-positiven Zellen durch Applikation von 17 β -Östradiol in eine verstärkte Zellyse. Weniger effizient als das Östrogen (50% gegenüber 80%) aktivierte eine Hypoxie den apoptotischen Effekt, der jedoch durch die Kombination beider Induktionsfaktoren (Hypoxie + Östrogen) den Effekt der alleinigen Applikation von Östrogen noch übertreffen konnte. Auch bei diesem RRCA war die Inhibierung der Apoptose durch das Antiöstrogen Tamoxifen möglich (Hernandez-Alcoceba et al., 2001)

Name	Basis der Tumor-Selektivität	Zielgewebe	Literaturverweis
dl312	Komplette E1A-Deletion macht den Vektor abh. von wahrer od. E1A-ähnlichen Aktivität	IL-6 sezernierende Tumorzellen	(Rancourt et al., 1999)
Ad.Egr-1/lacZ	Kontrolle des Transgens durch Egr-1-Promotor	Gliosarkome	(Manome et al., 1998)
Ad5ERE2	E1A- und E4-Regulation durch Teile des Promotors und ERE	pS2-Mamakarzinome	(Hernandez-Alcoceba et al., 2000)
AdEHrk	E1A- und E4-Regulation durch Teile des Promotors und ERE/HRE	pS2-Mamakarzinome	(Hernandez-Alcoceba et al., 2001)

Tabelle 2.3: Induzierbare Genexpressionssysteme

2.5.1. Tetrazyklin-induzierbare Transgenexpression

Das Tetrazyklin-regulierbare (Tet-) System basiert auf dem Resistenzoperon von *Escherichia coli*. Das System nutzt die Spezifität des Tet-Repressors (TetR) für die Tet-Operatorsequenz (TetO), die Sensitivität des TetR gegenüber Tetrazyklin und die ubiquitäre Aktivität des potenten Herpes-Simplex-Virus-Transaktivators VP16 in eukaryontischen Zellen (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000). Das Tet-System ist von dem konditionell aktiven chimären Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA)

abhängig, der durch die Fusion der VP16-Domäne mit dem tetR-Protein generiert wurde. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet die TetR-Domäne des tTA mit einer hohen Affinität und Spezifität an das Tetrazyklin-Response-Element (TRE), das aus einer Regulatorregion mit sieben Wiederholungen der TetO-Sequenz und von einem minimalen CMV-Promotor (CMV_{min}) gefolgt wird. Aufgrund der Bindung an TRE wird von VP16 die Transaktivierung des Zielgens initiiert. Die Bindung von Tetrazyklin an TetR bewirkt eine Konformationsänderung des Repressors, die die TetR-Affinität zu TetO aufhebt, so dass durch die Zugabe von Tetrazyklin die Transgenexpression herabreguliert werden kann (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

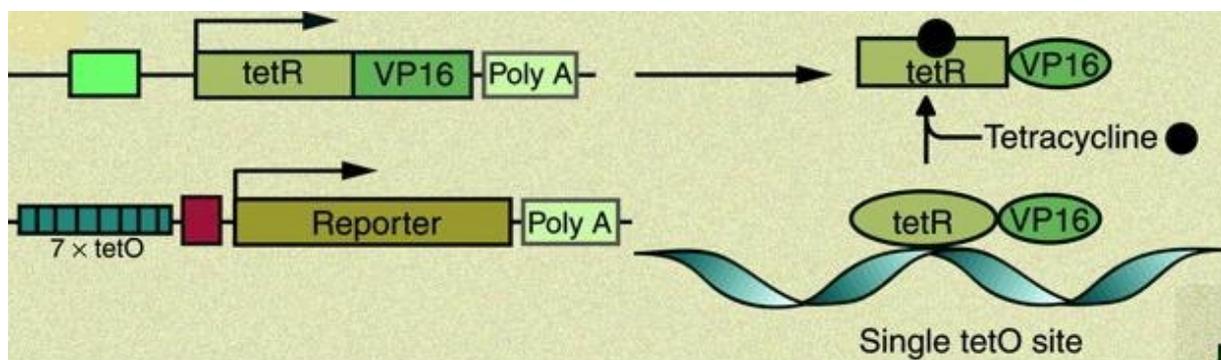


Abbildung 2.14: Tetrazyklin-regulierbares System; aus Agha-Mohammadi, S.; 2000

Das Tet-System ist das am meisten eingesetzte System in der Gentherapie und weist gegenüber anderen regulierbaren Methoden deutliche Vorteile auf hinsichtlich der An- und Abschaltbarkeit, der hohen Induzierbarkeit, der schnellen Reaktionszeiten und des Ausbleibens pleiotropischer Effekte durch den Einsatz von Tetrazyklin (Mizuguchi and Hayakawa, 2001; Molin et al., 1998).

2.5.1.1. Tet-On/Tet-Off

Zwei einander konträre Tetrazyklin-regulierbare Systemvarianten wurden bislang für die Regulierung der Genexpression eingesetzt. Im bereits beschriebenen Tet-Off-System (siehe oben) reguliert der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (tTA) die Transkription eines Gens, das die Tet-Operator (TetO)-Sequenz enthält. In Anwesenheit von Tetrazyklin oder seinen Derivaten (Doxyzyklin [Dox], Anhydrotetrazyklin [TAc]) wird die Transkription unterbunden. Im Tet-On-System dagegen wird der reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) verwendet.

Durch den Austausch von 4 Aminosäuren im TetR bindet der rtTA nur in Anwesenheit von Tetrazyklin an TetO und initiiert die Transkription (Gossen et al., 1995). Im Tet-On-System zeichnet sich eine rapide Hochregulation der Genexpression nach Dox-Applikation ab, die im Tet-Off-System nach der Entfernung von Dox aufgrund der erst erforderlichen Metabolisierung mit Verzögerung eintritt. Diese günstigeren kinetischen Eigenschaften werden durch die Tatsache ergänzt, dass der Einsatz von Tetrazyklin oder seinen Derivaten zur Induzierung der Transgenexpression in vielen Situationen zweckmäßiger erscheint als die langanhaltende Tetrazyklin-Applikation zur Inhibierung der Transgenexpression (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

Die Option zur Regulierbarkeit der Transgenexpression wurde bereits öfter für die Expression zytotoxischer Gene, unter anderem des Tumor Nekrose Faktors α (TNF- α) (Hu et al., 1997) oder der toxischen Ribonukleotid-Reduktase des Herpes Simplex Virus Typ 2 (Δ R1) (Massie et al., 1998), genutzt. tTA bzw. rtTA stabil exprimierende Zelllinien wurden hierbei mit einem das Transgen unter TetO-Kontrolle exprimierenden AdV transduziert. Allerdings wurde dabei ein komplettes Shut-Off der Transkription in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Inducers aufgrund minimaler Transaktivierung der TATA-Box durch die adenoviralen E1-Proteine (Berk et al., 1998) nicht erreicht, woraus eine vorzeitige Zellyse resultierte. Parallel konnte aber auch gezeigt werden, dass die gleichfalls AdV-vermittelte Übertragung des tTA in die native Zielzelle eine höhere Transgenexpression erzielte als bei alleiniger Übertragung des Transgens in Zellen mit stabil integriertem tTA (Massie et al., 1998). Die Expression des Fas-Liganden (FasL) induziert in Fas-Rezeptor exprimierenden Zellen den Zelltod, wobei der Rezeptor in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, dagegen die Expression des Liganden strikt kontrolliert wird (Nagata and Golstein, 1995). Mano et. al. (2000) generierten ein Tet-System zur Kontrolle der AdV-vermittelten FasL-Expression, um die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC) und damit die Restenosierung nach Ballon-Angioplastie oder auch die Angiogenese in Tumorzellen zu inhibieren. Die alleinige Transduktion des Tet-regulierten FasL resultierte auch in dieser Studie in eine bereits leicht erhöhte Apoptoserate, die durch die Kotransduktion des rtTA und Applikation von Dox (300 ng/ml) von 20% auf 65% gesteigert wurde (Mano et al., 2000). Eine Graduierung der Transgenexpression wurde in Abhängigkeit von der Dox-Konzentration (3 ng/ml, 30 ng/ml, 300 ng/ml) ersichtlich. Die Möglichkeit der graduellen Transgenexpression in

tTA- bzw. rtTA-stabil exprimierenden Zelllinien mittels des Tet-Systems wurde auch bereits anhand von Untersuchungen mit retroviralen Vektoren beschrieben (Kringstein et al., 1998).

Eine andere Strategie, die Proliferation und Migration von Endothelzellen zu inhibieren und somit eine unkontrollierte Angiogenese zu vermindern, verfolgten Goukassian et. al. (2001), indem sie die Dox-abhängige Überexpression des Wachstums-inhibitors p27 demonstrierten. Durch die Koinfektion des rtTA und eines p27-exprimierenden AdV konnte *in vitro* die Zellzyklusprogression und die Migration von HUVEC Zellen weitgehend blockiert werden. Im Mausmodell wurde mittels Bestimmung der Kapillardichte die drastische Reduktion der *de novo*-Formation von Blutgefäßen nach Koinfektion der AdV und 4-wöchiger Dox-Applikation nachgewiesen (Goukassian et al., 2001).

Um gleichzeitig zur Regulierbarkeit durch die Tet-On-/Tet-Off-Systeme eine gerichtete Genexpression zu erzielen, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden gewebsspezifische Promotoren/Enhancer für die Expression des tTA/rtTA (Stebbins et al., 2001) eingesetzt, die die Regulation des Transgens nach direkter Plasmidübertragung oder viralem Gentransfer in Zellen oder transgenen Tieren kontrollierten, zum anderen wurden die TetO-Sequenzen in einen existierenden gewebsspezifischen Promotor integriert (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000). Zum Beispiel wurde in einer Studie der murine FasL unter die Kontrolle des Tet-Systems gesetzt, um eine Apoptose in Tumorzellen zu induzieren (Rubinchik et al., 2000). Dabei wurde der tTA durch den prostata-spezifischen ARR2PB-Promotor kontrolliert und sowohl die FasL- als auch die tTA-Expressionskassette in einem Konstrukt vereint. Es konnte gezeigt werden, dass die FasL-Expression im wesentlichen auf Prostatakarzinomzellen beschränkt war und zudem höhere Expressionslevel erreicht wurden als mit der direkten ARR2PB-Kontrolle von FasL. Im Mausmodell wurden Konzentrationen von Tet-kontrolliertem FasL durchaus toleriert, die unter dem CMV-Promotor letale Wirkung zeigten (Rubinchik et al., 2001).

In einem anderen Versuch wurde das Suizidgen Barnase, eine extrazelluläre hoch aktive RNase, die aus *Bac. amyloliquefaciens* gewonnen wird, downstream eines modulierten TetO kloniert. Statt des CMV_{min} wurde der pflanzenvirale 35S-Promotor eines Mosaikvirus eingesetzt und als Regulator der Barnase stabil in Neuro2A Zellen integriert. Der neuro-spezifische Enolase-Promotor wurde für die Kontrolle des tTA genutzt, und auch hier ließ sich eine zwar geringe aber für die Zellablation

ausreichende und weitgehend auf neuronale Zellen beschränkte Transgenexpression nachweisen (Leuchtenberger et al., 2001). Eine ebenfalls neurospezifische Transgenexpression wurde von Ralph et. al. (2000) in einem AdV-System untersucht, wobei der tTA unter der Kontrolle des Synapsin I-Promotors bzw. des gliaspezifischen Fibrillenprotein (GFAP)-Promotors exprimiert wurde.

Um die Sachverhalte der extern regulierbaren Transgenexpression hinsichtlich von in verschiedenen Entwicklungsstadien auftretenden pulmonalen Erkrankungen vor und nach der Geburt zu charakterisieren, setzten Ray et. al. (1997) den rtTA unter den lungenspezifischen Clarazell-10kDa (CC10)-Promotor und nutzten dieses System für die Expression des humanen IL-11. Unter anderem konnte auch in dieser Versuchsreihe eine Basalexpression in der Lunge nachgewiesen werden, doch zugleich beschränkte sich die Transgenexpression selbst nach Induktion durch Dox auf das Zielgewebe und die IL-11-mRNA war mittels einer Northern-Blot-Analyse in anderen Organen nicht nachweisbar (Ray et al., 1997). Andere Beispiele für den Einsatz spezifischer Promotoren waren unter anderem der Insulin-Promotor für die Kontrolle des rtTA, der die Tet-vermittelte Expression des SV40 Large Tumor Antigen (TAg) regulierte und *in vivo* eine effiziente und pankreasspezifische Inhibierung der β -Zellproliferation bewirkte (Efrat et al., 1995) und der Mammary Tumor Virus (MMTV)-LTR-Promotor, der als Kontrolleinheit des tTA inseriert wurde und so die Expression eines Reportergens auf die Epithelzellen sekretorischer Organe und die Basalzellen der Epidermis beschränkte (Hennighausen et al., 1995).

Eine weitere Studie zeigte, dass die Fusion des TetO mit einem adenoviralen MLP_{min}-Promotor nach Dox-Induktion zu einer 50-fach stärkeren Proteinexpression eines Reportergens führte als mit einem rekombinanten AdV mit permanent aktiven CMV-Promotor (Molin et al., 1998).

Die funktionellen Charakteristika der AdV-vermittelten Tet-On-/Tet-Off-Systeme wurden in einer weiteren Studie geprüft und verglichen (Mizuguchi and Hayakawa, 2001). Verschiedene Konzentrationen von Dox und unterschiedliche AdV-Dosierungen wurden einander gegenübergestellt. Die maximale Luciferase-Expression war in den entsprechenden Dosierungsrelationen im Tet-On-System 20 mal schwächer als im Tet-Off-System. Durch die Erhöhung der rtTA- bzw. tTA-Konzentration bei gleichbleibender AdV-Luciferase-Menge konnte allerdings eine wesentlich stärkere Induktion der Transgenexpression durch rtTA (x10) erreicht werden als im Tet-Off System (x2). Des Weiteren wurde der Effekt des Tetrazyklin-

kontrollierten transkriptionalen Silencers (tTS) (siehe 2.6.1.2.) auf das Tet-On-System untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Background der Transgenexpression deutlich reduziert und somit die Induktionsrate von 19,8 auf 146 vergrößert werden konnte. Auch hier wurden durch Konzentrationsvariationen der AdV signifikante Unterschiede in den Ergebnissen offenbar, doch es erwies sich gemessen an den Absolutwerten der Induzierbarkeit der Genexpression das Tet-Off-System dem Tet-On-System in seiner Funktionalität überlegen (Mizuguchi and Hayakawa, 2001).

Aufgrund der nachgewiesenen Schwächen des Tet-On-Systems (Restaffinität des rtTA zum TetO in Abwesenheit von Dox, hohe Instabilität des rtTA *in vivo*, geringere Sensitivität gegenüber Dox im Vergleich zum Tet-Off-System (Baron and Bujard, 2000; Mizuguchi and Hayakawa, 2001) befasste sich eine Studie mit den Eigenschaften unterschiedlicher rtTA-Varianten (rtTA-S2, rtTA-M1, rtTA-M2), die hauptsächlich durch Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne generiert wurden. Mit 5 Mutationen, von denen 2 essentiell für den reversen Phänotyp waren und 3 zusätzlich eingefügt wurden, erwies sich der rtTA-M2 hinsichtlich seiner Induzierbarkeit und Spezifität den anderen deutlich überlegen (Urlinger et al., 2000).

Dox, ng/ml	rtTA	rtTA-S2	rtTA-M1	rtTA-M2
0	1,24 ± 0,41	0,62 ± 0,48	1,02 ± 1,16	3,02 ± 1,26
5	57,27 ± 6,66	1,26 ± 0,17	1,24 ± 1,54	17,07 ± 5,58
50	229,72 ± 35,34	26,52 ± 12,4	30,94 ± 25,75	1517,37 ± 169,94
500	696,27 ± 70,3	1726,75 ± 110,64	2428,19 ± 254,42	10746,33 ± 1272,97

Tabelle 2.4: Dox-abhängige Genaktivierung verschiedener rtTA Varianten in HeLa Zellen. Die Werte wurden mittels der Luciferase Aktivität bestimmt und in internen Licht-Einheiten angegeben.

Eine zusätzliche Modifikation des rtTA-M2 wurde im Drosophilamodell von Stebbins et. al. (2001) etabliert, die einen verborgenen Spliceort im TetR identifizierten und entfernten. Vergleichbare Induktionsraten zum tTA/Tet-Off konnten auf diesem Weg erreicht werden.

Die in nahezu allen Studien auftretende Basalexpression konnte durch die Generation chimärer Repressor-Aktivator-Proteine, die durch einen singulären Promotor kontrolliert wurden und durch zusätzliche Mutationen in den Dimerisationszonen (siehe 2.6.1.2.) keine Heterodimere bildeten, drastisch reduziert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden (Forster et al., 1999; Imhof et al., 2000).

2.5.1.2. Tetrazyklin-kontrollierter transkriptionaler Silencer

Der Tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) ist ebenfalls ein Fusionsprotein, das aus dem aus Tn-10 abgeleiteten Tet-Repressor-Protein (TetR) von *Escherichia coli* und der Kruppel-associated Box (KRAB-AB) Silencer Domäne des Kid-1 Proteins (SD^{Kid}) besteht (Freundlieb et al., 1999). In Abwesenheit von Dox bindet er mit der TetR-Domäne an die TetO-Sequenzen und verhindert die Transkription eines TetO-kontrollierten Tansgens durch die KRAB-Domäne. Durch Applikation von Dox in das Kulturmedium oder dem entsprechenden Versuchsmodell dissoziiert der tTS von TetO und hebt die transkriptionelle Suppression auf. Bei ausreichenden Konzentrationen interagiert Dox zugleich mit dem rtTA, ermöglicht die Bindung an TetO und aktiviert so die Transkription des Gens von Interesse (Freundlieb et al., 1999; Gossen and Bujard, 1992). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die KRAB-Domäne in der Lage ist, basale und aktivierte Transkriptionsaktivität zu inhibieren. Diese Inhibierung ist vom Vorhandensein einer TATA-Box im Promotor abhängig (Pengue and Lania, 1996).

Zhu et. al. (2001) stellten in einem Experiment den tTS unter die Kontrolle des Clarazell 10-kDa (CC10)-Promotors, der nachweislich eine hohe Spezifität für die Lunge aufweist. Zusammen mit dem rtTA, der ebenfalls durch den CC10-Promotor kontrolliert wurde, und dem IL-13 downstream des TRE wurde er in das Genom transgener Mäuse integriert und konnte hinsichtlich der Reduzierung der Basalexpression eine deutliche Verbesserung gegenüber Kontrolltieren, die lediglich CC10-rtTA/IL-13 im Genom trugen, aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Dox-Applikation die IL-13-mRNA via RT-PCR nicht nachweisbar war, und die Induzierbarkeit der IL-13-Expression durch Dox kaum geringere Werte aufzeigte als bei jenen Tieren, die das tTS-Gen nicht integriert hatten. Unkontrollierte IL-13-vermittelte Gewebsalterationen der Lunge (Volumenzunahme, Vergrößerung der Alveolen, Inflammation und muköse Hyperplasie) konnten somit durch Integration des tTS vollständig vermieden und durch Applikation von Dox über das Trinkwasser induziert werden (Zhu et al., 2001).

In einer weiteren Studie konnte ebenfalls die effektive Regulation und die effiziente Reduzierung der Basalexpression durch den tTS gezeigt werden. Hierbei wurde die Plasmid-DNA verschiedener Konstrukte intrazellulär in Muskelfibrillen koinjiziert (Sander et al., 2000). Sowohl rtTA als auch tTS standen unter Kontrolle des CMV-

Promotors, als Reporter diene das Plasmid TetO-lacZ. Die alleinige Injektion des Reporterplasmids in die Muskelzelle induzierte eine signifikante Basalexpression, die noch deutlich durch die Koinjektion des CMV-rtTA in Abwesenheit von Dox verstärkt wurde (17% -> 54%). Durch Administration von Dox konnte die Expression weiter erhöht werden (63%). Die hohe Basalexpression wurde durch die zusätzliche Injektion des CMV-tTS effektiv blockiert (0%) und die β -Galaktosidase-Expression durch Dox induziert (37%). Die Erhöhung der Plasmidkonzentration der β -Galaktosidase resultierte in eine leichte Basalexpression und eine signifikante Transgenexpression bei Dox-Applikation (Sander et al., 2000).

tTS	TetO- β -Gal.	Effizienz der tetO- β -Galaktosidase Aktivierung			
		- rtTA - dox	- rtTA + dox	+ rtTA - dox	+ rtTA + dox
-	5 ng/ μ l	17%	-	54%	63%
+	5 ng/ μ l	5%	5%	0%	37%
+	10 ng/ μ l	0%	22%	14%	63%

Tabelle 2.5: Effekt des rtTA und des tTS auf die Aktivierung der TetO-lacZ Genexpression.

Eine auf einem retroviralen Tet-On-System basierenden Studie befasste sich mit der Annahme, dass eine Formation nicht-funktioneller Heterodimere bei der Koexpression von rtTA und tTS auftritt. Hierbei kommt es zum Austausch der KRAB-Repressor- und der VP16-Aktivator-Domäne der ursprünglichen Homodimere, was durch die Veränderung der Dimerisationsdomäne im TetR verhindert werden konnte (Forster et al., 1999). Anhand des Wachstumsinhibitors p16 konnte beispielhaft so eine verfeinerte Regulation der Transgenexpression erreicht werden (Rossi et al., 1998).

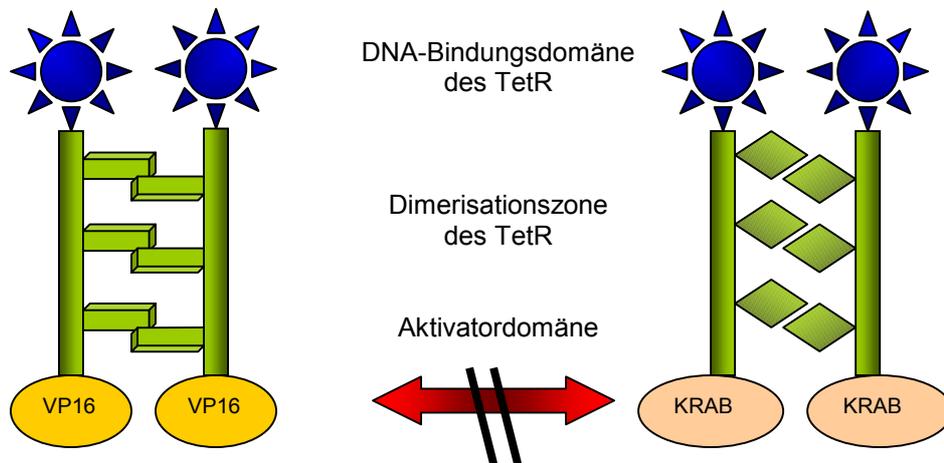


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung von Modulationen in der Dimerisationszone des TetR

Mutationen in der TetR-Dimerisationszone (grün) verhindern die Formation nicht-funktionaler Heterodimere. Zusätzliche Veränderungen in der DNA-Bindungsdomäne sowie der Einsatz unterschiedlicher Aktivator-domänen sind möglich.

Eine zusätzliche Alteration in der DNA-Bindungsspezifität (Baron et al., 1999) und die unterschiedliche Empfänglichkeit des tTA und des rtTA gegenüber den Tetrazyklinen und seinen Derivaten (Mizuguchi and Hayakawa, 2001) erlaubte die gleichzeitige, reversible Kontrolle zweier Gene in Abhängigkeit von der Dox-Dosierung. Hierfür wurden der tTA_{4C} und der rtTA_{6C} generiert, die jeweils spezifisch mit der 4C-TetO- (Helbl and Hillen, 1998) bzw. mit der 6C-TetO- (Helbl et al., 1998) Sequenz des Zielpromotors assoziierten (Baron et al., 1999). Als Indikator wurde das Luciferasegen einmal unter die Kontrolle des 4C-TetO-Promotors, einmal unter die Kontrolle des 6C-TetO-Promotors gestellt. Die Applikation der jeweiligen Luciferase-Konstrukte in tTA_{4C}- und rtTA_{6C}-exprimierende HeLa Zellen und die Administration unterschiedlicher Dosierungen von Anhydrotetrazyklin (ATc) zeigten, dass die durch 4C-TetO-kontrollierte Luciferase-Aktivität bei ATc-Konzentrationen von ≥ 10 ng/ml aufgrund der Inaktivierung durch den tTA_{4C} auf den Basalwert reduziert war. Die durch 6C-TetO-kontrollierte Luciferase-Aktivität hingegen konnte durch die Bindung des rtTA_{6C} an 6C-TetO nur bei ATc-Konzentrationen von ≥ 100 ng/ml nachgewiesen werden. Der Einsatz der β -Galaktosidase als zweites Reportergen unter der Kontrolle des 6C-TetO zeigte die Möglichkeit der Expression entweder des einen oder des anderen Gens in Abhängigkeit von der Dosierung des Inducers und ließ bei einer Dox-Konzentration von 30 ng/ml eine Inaktivierung beider Gene zu (Baron et al., 1999).

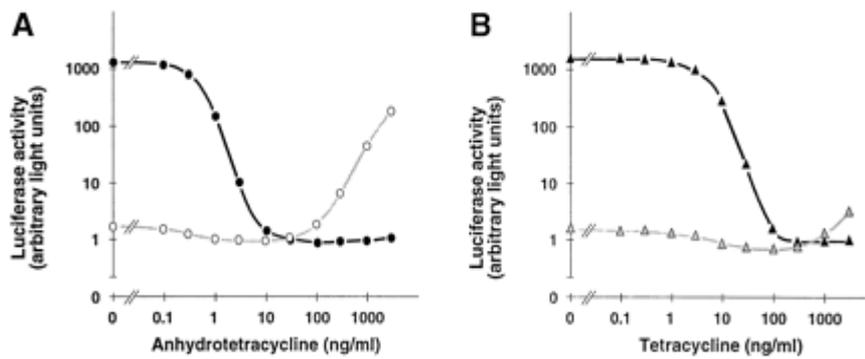


Abbildung 2.16

aus Baron, U., et. al.; 1999

Transkriptionsaktivierung durch tTA und rtTA bei unterschiedlichen Konzentrationen von ATc (A) und Tetrazyklin (B)

Die Kurve der 4C-TetO-Luciferase ist gekennzeichnet durch die hellgraue Linie, die der 6C-TetO-Luciferase durch die schwarze Linie.

2.5.2. Progesteron-induzierbares System

Eine weitere Methode stellt das Progesteron-induzierbare System dar, das durch RU486 induzierbar ist. Hierbei besteht der Transaktivator aus der VP16-Domäne, der Liganden-Bindungsdomäne eines mutierten humanen Progesteron-Rezeptors (PR-LBD) und der DNA-Bindungsdomäne GAL4, die aus der Hefe gewonnen wird. RU486 aktiviert den Transaktivator durch die Bindung an PR-LBD und es folgt die Bindung des GAL4 an die übereinstimmenden Elemente auf dem DNA-Template (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

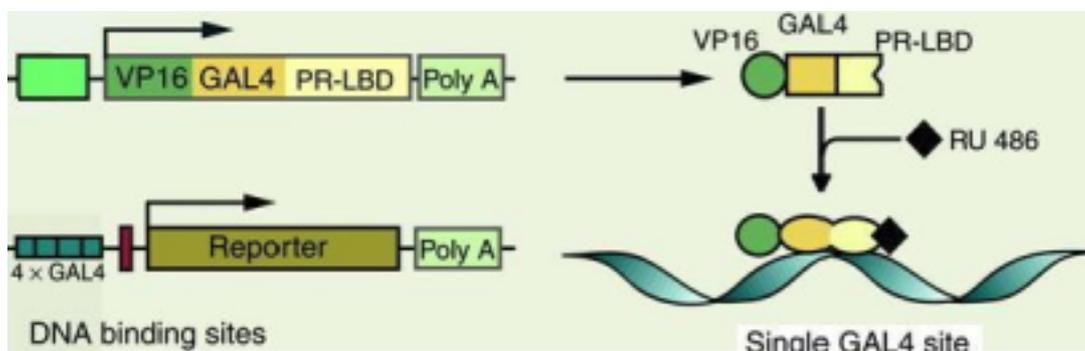


Abbildung 2.17: Progesteron-induzierbares System; aus Agha-Mohammadi, S.; 2000

Transgene Mäuse, die den Transaktivator fest im Genom integriert hatten, zeigten die Induzierbarkeit einer Reporter-Genexpression unter der Kontrolle der GAL4-DNA-Bindungssequenzen und einer TATA-Box durch die Applikation von RU486, die innerhalb von 12 Stunden registriert werden konnte. Das Erreichen der Basalexpression in Abwesenheit von RU486 nahm allerdings einen Zeitraum von bis zu 100 Stunden in Anspruch, was auf die lange Halbwertszeit und die schlechten Diffusionseigenschaften des RU486 im Gewebe zurückgeführt werden konnte (Serguera et al., 1999). Eine Modifikation, bei der die VP16-Domäne durch eine weniger immunogene Domäne des p65-Proteins des NF- κ B Faktors ersetzt wurde, erbrachte vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Funktionalität des Systems und reduzierte gleichzeitig die Immunantwort auf die applizierten Vektoren (Burcin et al., 1999).

Um die in diesem System ebenfalls auftretende hohe Background-Expression zu vermindern, wurde auch hier die Kombination mit einem Repressor getestet. Das Lac-Repressor-Protein, das die effiziente Reduzierung der Basalexpression des CMV-Promotors bereits in einer anderen Studie demonstrierte (Matthews et al., 1999), wurde von Edholm et. al. stabil in HEK293 Zellen integriert und die Lac-Operator-Sequenz downstream der Expressionskassette des Transgen tragenden AdV inseriert. Es konnte gezeigt werden, dass die durch die E1-Proteine hervorgerufene und somit für den hohen Background verantwortliche Transkriptionselongation (Berk et al., 1998) durch das Lac-Repressor-Protein drastisch blockiert werden konnte und ließ dadurch eine höhertitrigere Produktion von Toxinen-exprimierenden AdV zu (Edholm et al., 2001).

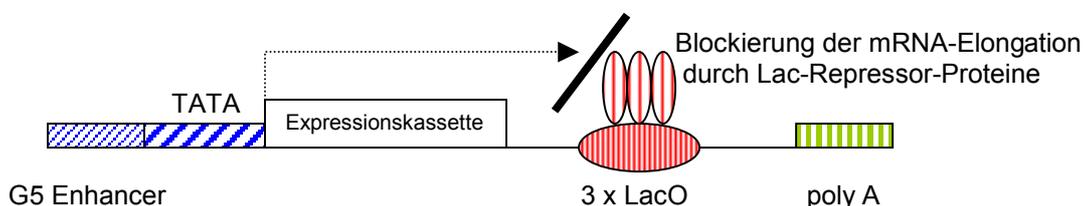


Abbildung 2.18: Einsatz des Lac-Repressor-Proteins im Progesteron-System

Die Insertion der Lac-Operator-Sequenz in einen retroviralen Vektor reduziert die Basalexpression durch die Bindung des Lac-Repressor-Proteins an Lac-O. Die Synthese einer mRNA in voller Länge wird in Abwesenheit des Inducers vermieden.

2.5.3. Ecdyson-induzierbares System

Das Ecdyson-induzierbare System (ERS) basiert auf dem Insektenhormon Ecdyson und seinem funktionalen Rezeptor. Der Rezeptor ist in der aktivierten Form ein heterodimerer Komplex aus einer mutierten Ecdysone-Rezeptorkomponente, die die DNA-Bindungsspezifität trägt und mit der die VP16-Domäne fusioniert wurde (VpECR) und dem Retinoid X-Rezeptor (RXR). In Anwesenheit von Ecdyson oder seinem synthetischen Analogon Muristeron bindet der aktivierte Rezeptorkomplex an die vier Wiederholungen des Ecdyson-Response-Elements (ECRE) des Zielpromotors und initiiert so die Transkription des Gens von Interesse (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

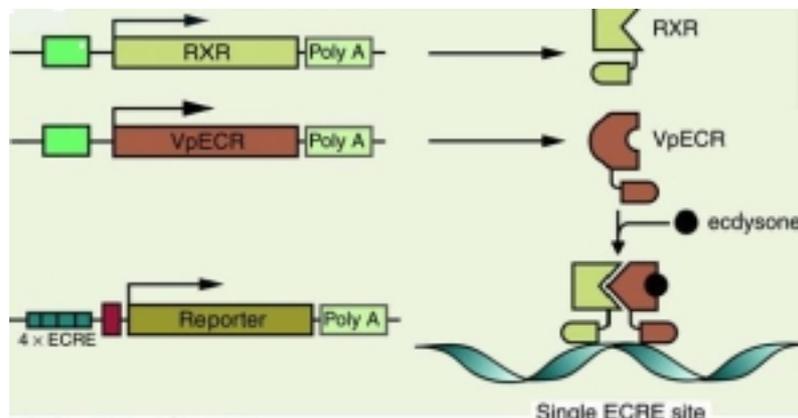


Abbildung 2.19: Ecdyson-induzierbares System; aus Agha-Mohammadi, S.; 2000

Die Effizienz des ERS übersteigt die des Tet-Systems um mehr als das 10-fache (No et al., 1996), fand dabei allerdings zum einen aufgrund der notwendigen Simultanexpression aller drei Komponenten (2 Rezeptorkomponenten und die das Transgen-tragende Response-Einheit) zum anderen wegen der unbekanntenen Wirkung des Ecdyson im menschlichen Körper bisher geringere Beachtung (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

2.5.4. Rapamycin-induzierbares System

Der Transaktivator des Rapamycin-induzierbaren Systems (RRS) ist zweigeteilt und besteht aus zwei chimären Peptiden, die jeweils aus zwei modifizierten humanen Proteinen generiert wurden. Die eine Peptidchimäre besteht aus einer DNA-

Bindungsdomäne (ZFHD1) und FKBP12, die andere aus einer verkürzten Version des FKBP12-Rapamycin-assoziierten (FRAP)-Proteins und aus dem C-terminalen Ende des p65-Proteins des NF- κ B. In Anwesenheit von Rapamycin bindet das ZFHD1-FKBP-Protein an die FRAP-p65-Chimäre und formt einen Komplex, der die 12 ZFHD1-Domänen in dem ZFHD1-abhängigen Promotor aktiviert (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

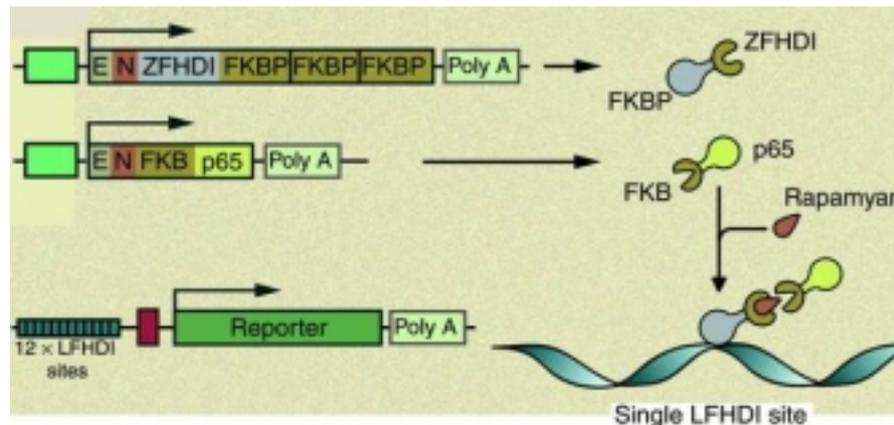


Abbildung 2.20: Rapamycin-induzierbares System; aus Agha-Mohammadi, S.; 2000

E: Epitop-Marker, N: SV40 T-Antigen Lokalisationssequenz

In einer Studie resultierte die Administration von Rapamycin in eine langsame 200-fache Induktion eines Reportergens und konnte in Mäusen bis zu 6 Monaten und in Rhesusaffen bis zu 3 Monaten aufrecht erhalten werden (Ye et al., 1999), doch die immunsuppressive Wirkung des Rapamycin verbietet bisher den Einsatz in dieser Form (Rivera et al., 1996), und es konnte zudem in neueren Untersuchungen eine teratogene Aktivität von Rapamycin demonstriert werden (Hentges et al., 2001).