

## 5. Diskussion

### 5.1. Bedeutung der Replikationsfähigkeit adenoviraler Vektoren im Einsatz in der Tumorthherapie

Der Einsatz adenoviraler Vektoren (AdV) in der Tumorthherapie stellt ein vielversprechendes Konzept zur Bekämpfung verschiedener Tumorarten dar. Bedeutend ist hierbei die schwache Pathogenität des humanen Adenovirus für den Menschen und der natürliche Tropismus zu epitheliale Gewebe, dem Ursprung der meisten malignen Tumorerkrankungen. Die geringen Erfolge replikationsdefizienter AdV zur Behandlung tumoröser Entartungen aufgrund der mangelhaften Transduktion des Tumorgewebes mit den therapeutischen Transgenen führten zum Einsatz bedingt replikationskompetenter Adenoviren (RRCA). Die Tumorzelllyse stellt hierbei die direkte Konsequenz der viralen Replikation dar (Viroonkolyse), und die Ausbreitung des RRCA im Tumorgewebe versprach eine potenzierte Wirkung hinsichtlich der Transduktionseffizienz (Hermiston, 2000). Vielfältige Versuche wurden unternommen, eine selektive Replikation der Viren im Tumorgewebe zu erzielen, hauptsächlich durch die Deletion viraler Funktionen, die im Tumorgewebe für die Replikation entbehrlich sind oder durch den Einsatz gewebs- bzw. tumorspezifischer Promotoren zur Kontrolle der E1-Region (s. 5.4.). Spezielle Beispiele hierfür sind Viren, die Mutationen in der E1A-Region enthalten und somit nicht befähigt sind, pRB, ein zelluläres Tumorsuppressor-Protein, oder Proteine der p300/CBP Familie, die ebenfalls wichtige regulatorische Funktionen des Zellzyklus einnehmen, zu inaktivieren (Heise et al., 2000), um somit die zelluläre DNA-Synthese zu induzieren (Howe et al., 2000). Deletionen in der E1B-55kDa-Region (ONYX-015) versprachen eine selektive Replikation in p53-negativen Zellen (Bischoff et al., 1996), doch haben neuere Studien gezeigt, dass auch in verschiedenen p53-positiven (Tumor-) Zellen eine Replikation nachweisbar wurde (Goodrum and Ornelles, 1998; Turnell et al., 1999).

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von RRCA ist ihre Fähigkeit, die E1-Region koapplizierter replikationsdefizienter AdV in *trans* zu komplementieren (Fechner et al., 2000; Goldmann et al., 1998), so dass die zytolytische Wirkung der intrazellulär replizierenden RRCA an sich, die durch RRCA vermittelte Replikation der koapplizierten AdV, die Ausbreitung beider AdV im Zielgewebe und die zelltoxische

Wirkung der durch den AdV exprimierten Transgene den therapeutischen Effekt erhöhen (Motoi et al., 2000).

Grundlage der vorliegenden Arbeit stellt somit die Untersuchung der nutzbaren positiven Eigenschaften replikationskompetenter AdV und die darauf basierende Entwicklung eines von extern kontrollierbaren RRCA-Systems dar. Zusätzlich wurde die Wirkung des RRCA auf einen koapplizierten AdV hinsichtlich der Effektivität der Genexpressionssteigerung untersucht und mit einem replikationskompetenten Adenovirus (RCA) verglichen (s. 4.5.2.). Die Aussicht, die adenovirale Replikation pharmakologisch von extern zu kontrollieren, gewährt viele Vorteile in Hinblick auf die Sicherheit für den Einsatz von RRCA *in vivo*, insbesondere durch die Möglichkeit, eine RRCA-gestützte Viroonkolyse gegebenenfalls zeitgerecht abubrechen und stellt damit einen neuen grundlegenden Forschungsansatz in der gerichteten Tumorgentherapie dar.

Die in vorliegender Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente zum Einsatz eines RCA (+E1;  $\Delta$ E3) demonstrierten eine effektive Induktion der Tumorzelllyse (s. 4.5.3. und 4.6.3.5.). Zudem konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass durch die Replikationskompetenz und durch die Fähigkeit zur *Trans*-Komplementierung der E1-Region eine erhebliche Expressionssteigerung des koapplizierten Transgens zu erzielen ist (s. 4.3. und 4.4.), was allerdings durch die natürliche Unkontrollierbarkeit der Virusinfektion und durch die damit einhergehende schwer kalkulierbare Zelllyse auch mit hohen Ergebnisschwankungen einherging. *In vivo* waren deutliche Abwehrreaktionen des Gewebes, insbesondere in der Leber, histologisch nachweisbar (Abb. 4.10.). Im Gegensatz zu den Studien von Lochmüller et al. (1994), in welchen allerdings die Messung der Transgenexpression erst einen Monat p.i. vorgenommen wurde, konnte *in vivo* eine 24-fache Steigerung der Transgenexpression des koapplizierten AdVs nachgewiesen werden. Aufgrund der erwiesenen Entzündungsreaktion sowohl bei den Untersuchungen von Lochmüller et al. (1994) als auch in dem hier durchgeführten Tierversuch (s. 4.4.2.) sowie dem Abfall der RCA-vermittelten Transgeneexpressionsteigerung nach 7 Tagen auf lediglich nur noch das 2-fache des Kontrollwertes (vgl. mit 24 Stunden p.i.), ist anzunehmen, dass die Immunantwort auf den RCA bereits nach wenigen Tagen drastisch den Effekt der *Trans*-Komplementierung verringerte. Somit ist trotz der initialen, durch die *Trans*-Komplementierung vermittelte Verstärkung der

Transgenexpression mit einer raschen Abnahme der Transgenexpression zu rechnen.

Geringere Dosierungen des RCAs führten *in vitro* zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Replikation, ohne dass in dem hier untersuchten Zeitraum von 72 Stunden eine Zellyse evident wurde. Bei einer höher dosierten Koinfektion des RCAs hingegen konnte der deutliche Abfall der AdV-DNA-Replikation nachgewiesen werden (s. 4.3.2.2.). Ursache hierfür scheint die zytolytische Wirkung des RCA zu sein, wodurch sich die Viruspartikel frei im Zellkulturmedium befinden und anhand der hier gewählten Methode nicht mehr bei der Messung erfasst werden.

Demnach sind eindeutig positive Effekte durch die Koinfektion eines replikationsdefizienten AdV mit einem RCA erzielbar, namentlich der zytopathogene Effekt und die *Trans*-Komplementierung koapplizierter replikationsdefizienter AdV. *In vivo* allerdings wurden mit der stark ausgeprägten Immunreaktion und der unkontrollierten Ausbreitung im Organismus, die durch die Transgenexpression in Lunge und Herz nach Koinfektion mit dem RCA manifest wurde (vgl. Kass-Eissler et al. (1994), nach dem eine systemische AdV-Applikation zur alleinigen Expression in der Leber führt), die Nachteile der Applikation eines RCAs in dieser Form offenbar. Eine Kontrollierbarkeit der viralen Replikation und eine tumorspezifische Replikation würden im Hinblick auf die Sicherheit des Einsatzes replikationskompetenter AdV einen wesentlichen Fortschritt darstellen.

Der in vorliegender Arbeit generierte und die adenovirale E1A-13S-Region kodierende RRCA Ad5-pTRE-13S-bgh enthält einen Tetrazyklin-abhängigen Promotor für die Kontrolle der E1A-mRNA-Expression sowie eine E1B-Deletion für die Tumorzell-Spezifität, da Tumor-Zelllinien gegenüber E1B-defizienten AdV empfindlicher reagieren als gegenüber einem Wildtyp-Virus, und normale Körperzellen dagegen weniger empfindlich gegenüber E1B-deletierten AdV im Vergleich zum Wildtyp-Virus sind (Duque et al., 1998; Adachi et al., 2001; Chen et al., 2001; Kurihara et al., 2000; Li et al., 2001; Matsubara et al., 2001; Sauthoff et al., 2000).

Der Ad5-pTRE-13S-bgh wurde, nachdem überraschend seine „autonome Replikationsfähigkeit“ festgestellt wurde (s. 4.6.2.1.), hinsichtlich der Kompetenz zur *Trans*-Komplementierung und zur Expressionssteigerung eines koapplizierten Transgens mit einem RCA verglichen. Verschiedene *in vitro* Versuche zeigten, dass die RCA-vermittelte Expressionssteigerung des Transgens in Abhängigkeit von der

Zelllinie und von der Dosierung des RCA im Vergleich zur Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh in den meisten Fällen um ein vielfaches stärker ausfiel (s. 4.5.2.). Die Versuche zur Tumorzelllyse zeigten darüber hinaus, dass auch die zelldestruktive Wirkung des RCA stärker ausgeprägt war als die des Ad5-pTRE-13S-bgh (s. 4.5.3.). Beide Gegebenheiten scheinen auf das Vorhandensein der E1B-Region im RCA zurückzuführen zu sein, da die E1B-Region eine die virale Replikation fördernde Funktion inne hat (Shenk, 1996). In vorliegender Arbeit allerdings konnte zum einen durch eine massive Überexpression des E1A-13S-Proteins, zum anderen durch die Koapplikation des Transaktivators rtTA-M2 (AdV-rtTA-RRCA-System, s. 5.2.) sowohl hinsichtlich der Transgenexpressionssteigerung als auch hinsichtlich der Effektivität der Zelllyse mit dem RCA vergleichbare Werte erreicht werden (s. Abb. 4.13. und Abb. 4.32.). Diese Ergebnisse unterstreichen somit die bereits von anderen Wissenschaftlern demonstrierte Anwendbarkeit E1B-deletierten AdV für die Tumorzelldestruktion (Adachi et al., 2001; Chen et al., 2001; Kurihara et al., 2000; Li et al., 2001; Matsubara et al., 2001; Sauthoff et al., 2000).

Eine Ausnahme bildete die Zelllinie OE-33, die während einer RCA-vermittelten Transgenexpressionssteigerung kaum eine weitere Verstärkung durch die zusätzliche Infektion des Ad5-pTRE-13S-bgh zeigte (s. Abb. 4.12. und Tab. 4.3.). Ebenso ließ sich in dieser Zelllinie im Cell-Killing-Assay/Vitalitätstest keine gesteigerte Zelllyse durch den RRCA nachweisen (Tab. 4.4.). Eine Erklärung für den ausbleibenden additiven Effekt des Ad5-pTRE-13S-bgh könnte die Sättigung der zellulären Response-Elemente (Promotoren, Transkriptionsfaktoren, Transaktivatoren, etc.) mit dem E1A-13S-Protein sein.

## **5.2. Externe Kontrollierbarkeit eines adenoviralen Vektor-Replikations-Systems**

Verschiedene Vektorsysteme wurden bereits zur externen Kontrolle der Transgenexpression generiert, wobei sich das Tetrazyklin-kontrollierbare Vektorsystem (Tet-System) durch seine Unbedenklichkeit des Inducers hinsichtlich unbekannter Nebenwirkungen im menschlichen Organismus, der relativ schnellen Metabolisierung desselben und der dadurch bedingten Möglichkeit zur „Feinregulierung“ der Expressionskontrolle (Gossen et al., 1995) gegenüber anderen

Systemen (Progesteron-Antagonisten-, Rapamycin- oder Ekdyson-induzierbares Systeme) ausgezeichnete (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

Von den zwei möglichen Varianten des Tet-Systems, Tet-On und Tet-Off, schien bei direkter Gegenüberstellung der beiden Systeme das Tet-Off durch seine geringere Basalexpression im nicht-induzierten Zustand und die höher gelegene Maximalexpression, in der Anwendung praktikabler zu sein (Mizuguchi and Hayakawa, 2001), doch durch innovative Veränderungen des reversen Tetrazyklin-induzierbaren Transaktivators (rtTA-M2) konnten mittels des Tet-On Systems vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Urlinger et al., 2000). Der grundsätzliche Unterschied zwischen den beiden Systemen besteht in der Wirkungsrichtung des Transaktivators. Im Tet-Off vermittelt der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (tTA) eine Transgenexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin. Im Tet-On dagegen wird die Transgenexpression durch den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) in Anwesenheit von Tetrazyklin oder seinen Derivaten induziert. Somit erscheint mit dem Einsatz des rtTA die Applikation eines Inducers zur Induktion eines Systems in vielen Anwendungsbereichen zweckmäßiger als die Verwendung eines Transaktivators, der bei Applikation die Unterdrückung der Transgenexpression vermittelt, wie es im Tet-Off-System der Fall ist (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000; Kistner et al., 1996). Zudem tritt im Tet-Off-System die Induktion der Transgenexpression durch die vorerst erforderliche Metabolisierung von Tetrazyklin (oder seinen Derivaten) verglichen mit dem Tet-On verzögert ein (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000).

Für die Evaluierung des Tet-On-Systems wurden in dieser Arbeit zwei AdV entwickelt. Ein AdV exprimiert den reversen Transaktivator M2 (rtTA-M2) (Urlinger et al., 2000), der zweite die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle der TRE-Enhancer-Einheit, und diente somit hier als Response-AdV (AdV-rtTA-System). Die Transgenexpression konnte mit Hilfe dieses Systems erfolgreich reguliert werden (s. 4.6.1.1.). Wie auch sowohl von Mano et. al. (2000) als auch von Kringstein et. al. (1998) bereits beschrieben, war eine Graduierung der Transgenexpression durch unterschiedliche Doxyzyklin (Dox)-Dosierungen (0,5 ng/ml – 300 ng/ml) möglich, die sich in Abhängigkeit von der Zelllinie zwischen dem 1,35- bis 413-fachen bewegte. Zusätzlich konnte auch durch unterschiedliche Dosierungen des rtTA-M2 eine graduierte Regulation erzielt werden kann (s. 4.6.1.2.).

Der Nachweis der Reversibilität der Systeminduktion durch Abbruch der fortwährenden Dox-Administration zeigte den Rückgang der Transgenexpression innerhalb von nur 48 Stunden auf ca. 30% und demonstrierte somit den ON-OFF-Mechanismus im AdV-rtTA-System (s. 4.6.1.3.).

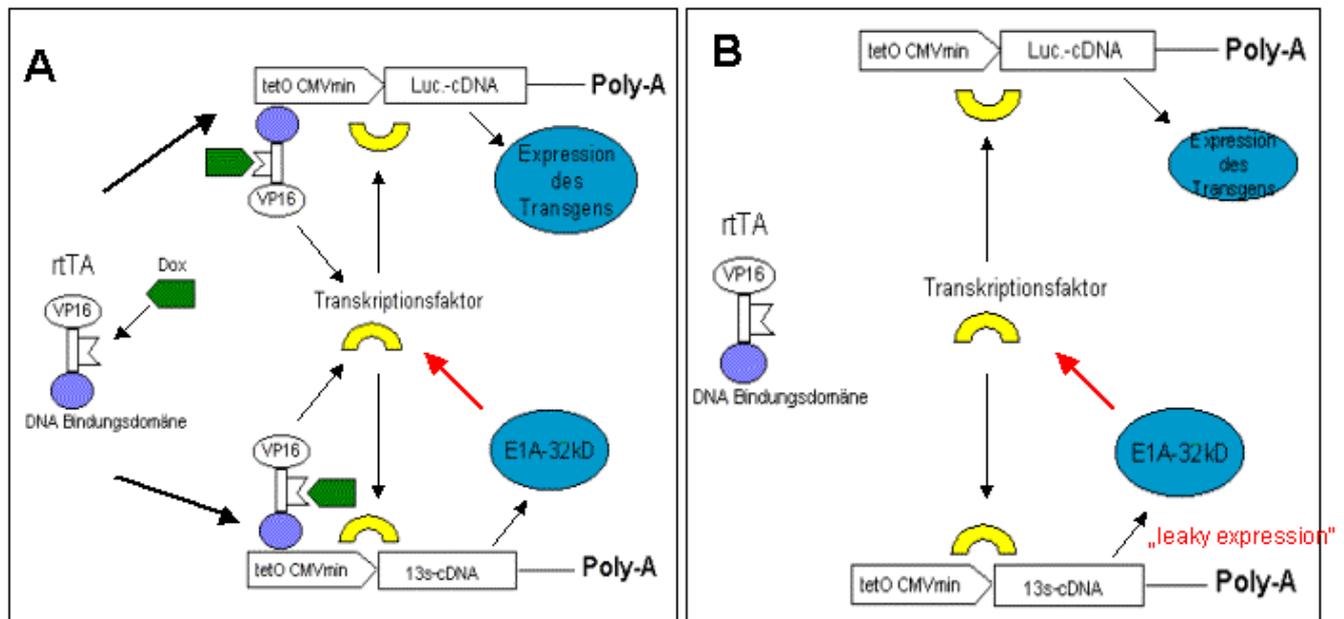
Die Untersuchungen zur Basalexpression im AdV-rtTA-System zeigten eine sehr geringe Restaffinität des rtTA-M2 zum Tet-Operon in Abwesenheit von Dox in den hier untersuchten Zelllinien (s. 4.6.1.4.) und stehen somit im Konsens mit den Untersuchungen von Urlinger et. al. (2000), in welchen der rtTA-M2 stabil in das Zellgenom integriert wurde und in Hinblick hierauf eine deutliche Verbesserung gegenüber dem rtTA der ersten Generation (Gossen et al., 1995) aufwies. In sämtlichen hier untersuchten Zelllinien konnte allerdings, wie auch von Baron und Bujard (2000) bereits erwähnt, die deutlich ausgeprägte Basalaktivität des CMV<sub>min</sub>-Promotors bei alleiniger Transduktion des TRE-kontrollierten Indikator-AdVs festgestellt werden, die in Abhängigkeit von der Zelllinie eine bis zu 40-fach höhere Transgenexpression gegenüber untransduzierten Zellen betrug (s. 4.6.1.4.). Dies wird durch die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt (Goukassian et al., 2001;Kringstein et al., 1998;Leuchtenberger et al., 2001;Mano et al., 2000;Ray et al., 1997). Die geringen Konzentrationen des exprimierten Transgens, die hierbei auftraten, erwiesen sich, soweit dies überprüft wurde, als unbedenklich (Mano et al., 2000;Ray et al., 1997). In anderen Studien hingegen, in denen das Tet-On-System zur Regulation biologisch hoch aktiver Transgene (z. B. Erythropoetin) eingesetzt wurde, limitierte die Basalexpression die Anwendbarkeit des Systems in der Gentherapie (Lamartina et al., 2002). Im Falle des Erythropoetins stimulierten selbst die geringen Mengen des Hormons, die im nicht-induzierten Zustand produziert wurden, einen deutlichen Anstieg des Hämatokrits (Bohl et al., 1998;Rizzuto et al., 1999). Wie sich im Laufe der Untersuchungen zu vorliegender Arbeit zeigte, stellte auch die Basalexpression des E1A-13S-Proteins zunächst ein Hindernis dar, da hierdurch die Regulation des Systems durch Dox stark beeinträchtigt wurde (s.u.).

Basierend auf den Erkenntnissen, die aus dem AdV-rtTA-System gewonnen wurden, sollte die Möglichkeit einer Dox-regulierbaren E1A-13S-Expression und damit die Möglichkeit einer kontrollierten adenoviralen Replikation untersucht werden. Die daraus resultierende regulierbare Zelllyse stellt somit einen neuen Therapieansatz in der Tumorgentherapie dar. Die adenovirale E1A-13S-Region wurde unter die Kontrolle des TRE gesetzt, und durch die Applikation von Dox konnte die Expression

des E1A-13S-Proteins sowie damit die virale Replikation induziert werden (s. 4.7.1.2.). In der Theorie sollte durch den Abbruch der Dox-Applikation nach einem beliebigen Zeitraum (z. B. nach der erfolgreichen Behandlung eines Tumors oder dem Auftreten von Intoleranzerscheinungen) die weitere virale Replikation unterbunden und die potenzielle Gefahr einer peripheren Gewebsschädigung durch den replizierenden Vektor vermieden werden. Durch die E1B-Deletion im Ad5-pTRE-13S-bgh sollte als zusätzlicher Sicherheitsfaktor die Replikation auf Tumorzellen beschränkt bleiben.

Dies führte in vorliegender Arbeit zur Entwicklung des AdV-rtTA-RRCA-Systems (bestehend aus den AdV rtTA-M2 und Ad5-pTRE-13S-bgh). Um die Funktionalität dieses Systems zu visualisieren, wurde der Response-AdV Ad5TRE-Luc koappliziert. Die Ergebnisse zeigen die *Trans*-Komplementierung durch den RRCA in Form einer deutlichen Steigerung der Transgenexpression (s. 4.5.2.). Ebenso konnte die effektive E1A-13S-vermittelte Tumorzellyse in den meisten hier untersuchten Zelllinien demonstriert werden (s. 4.6.3.5.). Gleichzeitig jedoch wurde während dieser Untersuchungen eine fehlende Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh durch Dox evident (s. 4.6.2.1.). Experimente anderer Untersucher haben gezeigt, dass selbst durch die minimale Aktivität des CMV<sub>min</sub>-Promotors eine Basalexpression des Transgens nachweisbar war („leaky system“) (Bohl et al., 1998; Rendahl et al., 1998; Mano et al., 2000; Mizuguchi and Hayakawa, 2001; Urlinger et al., 2000). In vorliegender Arbeit stellte E1A-13S das Transgen dar, und die Hypothese, dass dessen minimale Expression eine „Autoaktivierung“ des Systems durch Aktivierung des (downstream des TRE inserierten) CMV<sub>min</sub> induzierte, konnte aufgrund der Untersuchungen von Berk et. al. (1998) als wahrscheinlich angesehen werden. So konnte Berk et. al. (1998) demonstrieren, dass geringste Mengen des E1A-13S-Proteins ausreichen, um sowohl TATA-Box enthaltende Promotoren als auch die virale Replikation zu induzieren. Unsere Untersuchungen bestätigten sowohl die Ergebnisse von Berk et al. als auch die aufgestellte Hypothese. So induzierte die minimale Expression des E1A-13S-Proteins sowohl den CMV-Promotor als auch den CMV<sub>min</sub>-Promotor (s. Abb. 4.22.), wodurch durch die zwangsläufig ansteigende intrazelluläre E1A-13S-Konzentration eine Regulierbarkeit des AdV-rtTA-RRCA-Systems mittels Dox nicht mehr möglich war (s. 4.6.2.1. und 4.6.2.2.). Abbildung 5.1. verdeutlicht diesen Mechanismus der Autoaktivierung. Ausgangspunkt hierbei ist die

„leaky Expression“ des Tet-On-Systems, wodurch eine 13S-Expression initial induziert wird.



**Abbildung 5.70:** Autoaktivierung heterologer Promotoren im AdV-rTA-RRCA-System durch E1A-13S

**A:** AdV-rTA-RRCA-System im induzierten Zustand durch Dox-Applikation; **B:** AdV-rTA-RRCA-System im nicht induzierten Zustand; Auch ohne Dox-Applikation findet eine minimale Basalexpression („leaky expression“) des Ad5-pTRE-13S-bgh statt, die die Autoaktivierung des Systems verursacht.

Die Bedeutung der CR3-Domäne des adenoviralen E1A-13S-Proteins hinsichtlich der Aktivierung heterologer Promotoren konnte in einem weiteren Experiment dargelegt werden (s. 4.6.2.3.). Die Transfektion mit einem die E1A-12S-Region kodierenden Plasmid zeigte im Gegensatz zu der Transfektion mit dem pTRE-13S keine Erhöhung der Transgenexpression eines koapplizierten AdVs. Die einzige Differenz dieser Plasmide besteht im Fehlen der cDNA für die CR3-Domäne im 12S-Gen. Hierdurch wird die Bindung an bestimmte zelluläre Transkriptionsfaktoren verhindert (z. B. TATA-Box Binding Protein, TBP) (Lee et al., 1991;Shenk T., 1996), und die Transaktivierung eines koapplizierten replikationsdefizienten AdV bleibt aus. Das Vorhandensein der adenoviralen CR3-Domäne im Ad5-pTRE-13S-bgh kann somit hauptverantwortlich für die „Autoaktivierung“ des Systems gemacht werden.

Die Versuche zur Autoaktivierung des Systems durch den Ad5-pTRE-13S-bgh zeigten weiterhin, dass die Dosierung des RRCA einen bedeutenden Stellenwert einnimmt. Geringe Dosierungen (50-100 p/c) ließen eine gewisse Regulation des Systems zu, doch die Expressionssteigerung des koapplizierten Luciferase-

expremierenden Response-AdV wies lediglich Werte um das bis zu 6-fache auf, und die Basalexpression stieg dabei bereits auf das 2,7-fache an (s. 4.6.2.2.). Höhere Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh ( $500-1 \times 10^4$  p/c) ließen die Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der Zelllinie um das bis zu 397-fache (HT-29) ansteigen, wobei allerdings die Kontrolle der Transgenexpression durch Dox nahezu komplett aufgehoben wurde (s. 4.6.2.2.).

Diese Experimente zeigten außerdem, dass mit steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh eine Umkehr der Reaktion auf die Applikation bzw. das Fortlassen von Dox auftrat (Abb. 4.19.). Bei geringen Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh (100 p/c) trat bei Dox-Applikation erwartungsgemäß eine Induktion des Systems auf. Eine höhere Dosierung ( $500-1 \times 10^3$  p/c) erbrachte annähernd gleiche Werte der Transgenexpression in An- und Abwesenheit von Dox. Bei  $2,5 \times 10^3$  p/c bzw.  $5 \times 10^3$  p/c jedoch blieb der induzierende Effekt von Dox aus, und es konnte in Zellen, die nicht mit Dox inkubiert wurden, eine höhere Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden als in Zellen, deren Medium mit Dox versetzt wurde (s. Abb. 4.19.).

Ursache hierfür kann einerseits die hemmende Wirkung des Doxyzyklins auf die Proteinsynthese sein, da die Wirksamkeit dieses Antibiotikums im Einsatz gegen bakterielle Infekte auf eine Hemmung der Elongationsphase in der Proteinsynthese durch die Bindung an 70S-Ribosomen beruht. Diese antianabolen Effekte konnten auch in eukaryontischen Zellen nachgewiesen werden (Löscher, W.; 1997). Eine andere und wahrscheinlichere Erklärung wäre ein kompetitiver Effekt zwischen E1A-13S und rtTA-M2. Bei steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh könnte die Bindung des rtTA-M2 an das Tet-Operon verhindert werden. Erfolgt keine Dox-Administration, findet auch keine Bindung des rtTA-M2 an das Tet-Operon statt, und das 13S-Protein kann ungehindert den  $CMV_{min}$ -Promotor aktivieren. Wird Dox hingegen dem Medium hinzugefügt, erfolgt eine vermehrte Bindung des rtTA-M2 an das Tet-Operon, und die durch die VP16-Domäne im rtTA-M2 und die durch 13S aktivierten Transkriptionsfaktoren konkurrieren um die Bindung an  $CMV_{min}$ .

Diese Erkenntnisse machten deutlich, dass sowohl durch niedrige als auch durch höhere Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh keine befriedigende Funktionalität des AdV-rtTA-RRCS-Systems erzielbar war.

Auf eine geringe Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh würde eine ineffiziente Induktion der Tumorzelllyse erfolgen und therapeutisch relevante Expressionslevel eines koapplizierten Transgens würden vermutlich nicht erreicht werden. Andererseits stellt

bei einer hohen Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh die eingeschränkte Regulierbarkeit der adenoviralen Replikation und damit des gesamten Systems eine potenzielle Gefahr für das gesunde periphere Gewebe dar. Es ist zudem, wie in den Versuchen zum Einsatz eines RCAs *in vivo* gezeigt werden konnte, anzunehmen, dass die unkontrollierte Expression der E1A-13S-Region eine verstärkte Antwort des Immunsystems sowohl gegen den RRCA an sich als auch gegen den koapplizierten AdV hervorrufen würde, wodurch ein potenzieller Behandlungserfolg erheblich gemindert werden würde.

Eine erfolgversprechende Strategie stellt somit die Suppression der vorhandenen 13S-Basalexpression und der 13S-vermittelten Autoaktivierung des AdV-rtTA-RRCA-Systems dar. Um dies zu realisieren, wurde der bereits in vorangegangenen Studien bewährte Tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) (Freundlieb et al., 1999; Mizuguchi and Hayakawa, 2001; Rossi et al., 1998; Zhu et al., 2001) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors zusätzlich in das System involviert.

Eine zusätzliche Potenzierung der Wirkung von RRCAs in der Tumorgentherapie kann nach Motoi et. al. (2000) durch den Einsatz koapplizierter AdV erreicht werden. Als Folge der *Trans*-Komplementierung resultiert eine Vervielfachung der Transgenexpression, eine Aufrechterhaltung der Expression über einen längeren Zeitraum und eine Ausbreitung der AdV in primär nicht transduzierte Zellen. Die Insertion eines zelltoxischen Transgens oder der cDNA eines „Pro-Drug“ Converting Enzyms, wie zum Beispiel die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSVtk) oder die E.coli-Cytosindeaminase (CD), in die Expressionskassette eines koapplizierten replikationsdefizienten AdVs würde somit den therapeutischen Effekt der Tumorgewebs-Destruktion durch den RRCA drastisch verstärken.

### **5.3. Reduktion der Basalexpression mittels des Tetrazyklin-kontrollierbaren transkriptionalen Silencers (tTS) im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System**

Der Tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) ist ein Fusions-Protein aus der TetR-Bindungsdomäne und dem KRAB-Protein und vermindert effektiv die Basalexpression TRE-kontrollierter Transgene in Abwesenheit von Dox (Deuschle et al., 1995; Witzgall et al., 1994). Die zusätzliche Applikation des tTS im AdV-rtTA-System zeigte in Abhängigkeit von der Zelllinie eine Reduzierung der

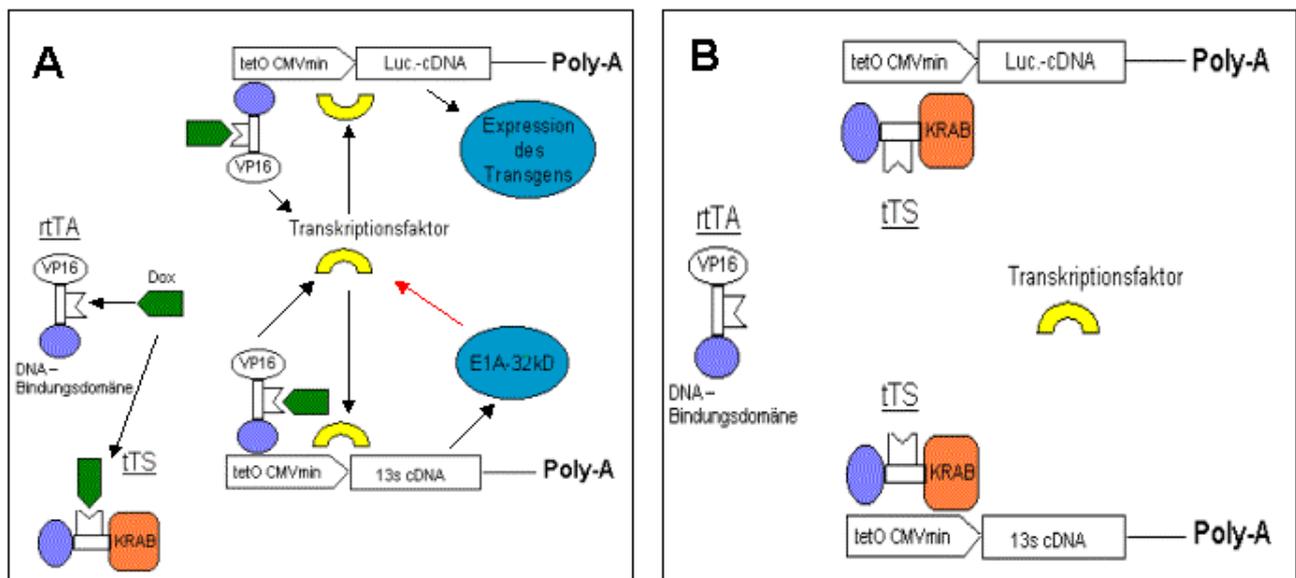
Basalexpression um das bis zu 3-fache, wobei die Maximalexpression des Systems bei Applikation von Dox nicht bzw. kaum beeinträchtigt wurde (s. 4.6.3.1.). Diese Resultate entsprachen den Ergebnissen, die von Sander et. al. (2000) vorgelegt wurden, wobei in jener Studie, im Gegensatz zu dieser Arbeit, eine das Transgen tragende Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Mizuguchi et. al. (2001) erzielten mit dem Einsatz von AdV (Indikator, rtTA, tTS) ähnliche Resultate und zeigten zusätzlich, dass eine Erhöhung der Vektorkonzentrationen in eine bis zu 7-fachen Reduktion der Basalexpression resultierte. Die beachtlichen Resultate, die von Zhu et. al. (2001) durch die Integration des tTS ins Genom transgener Mäuse erzielt wurden und eine vollständige Unterdrückung der Basalexpression demonstrierten, konnten in vorliegender Arbeit allerdings nicht erreicht werden. Die Effektivität des tTS konnte jedoch durch eine Transduktion desselben 24 Stunden vor den weiteren AdV beträchtlich gesteigert werden, da innerhalb dieser Zeitspanne die Maximal-expression eines AdVs erreicht wird (Russell, 2000) und somit der tTS seine volle Funktion zum Zeitpunkt der Applikation der weiteren AdV bereits entwickelt hat.

Der Einsatz des tTS im AdV-rtTA-RRCA-System zeigte, dass auch hier die Expression des E1A-13S-Proteins in Abwesenheit von Dox erheblich reduziert werden konnte, dabei allerdings eine deutliche Abhängigkeit von der Dosierung des koapplizierten Ad5-pTRE-13S-bgh bestand (s. 4.6.3.2. und 4.6.3.4.). Besonders deutlich wurde dies in der Zelllinie HT-29, in der bei einer Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh von  $1,5 \times 10^4$  p/c eine Reduzierung der Basalexpression (unspezifische Basalexpression plus Autoaktivierung) eines koapplizierten Transgens um das 8,6-fache erzielt werden konnte. Wurde der Ad5-pTRE-13S-bgh hingegen in einer Dosierung von 500 p/c transfiziert, konnte die Basalexpression des koapplizierten Transgens um das 28,4-fache reduziert werden (s. 4.6.3.2.). Der Nachweis der AdV-DNA-Replikation zeigte, dass mit steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh die DNA-Replikation im nicht-induzierten System auch bei Kotransduktion des Ad5CMV-tTS zunahm (s. 4.6.3.4.).

Unter Berücksichtigung dessen, dass die E1A-13S-vermittelte *Trans*-Komplementierung eine Steigerung der Transgenexpression sowohl durch die erhöhte AdV-DNA-Menge an sich, als auch durch die Aktivierung des CMV-/CMV<sub>min</sub>-Promotors nach sich zieht, kann ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der AdV-DNA-Replikation und den der gemessenen Transgenexpression gezogen werden. Hiernach zeigen die Resultate der AdV-DNA-Replikation im AdV-rtTA-tTS-RRCA-

System eine deutlich bessere Regulierbarkeit auf (Abb. 4.29. und 4.31.), als die Regulierbarkeit der Transgenexpression im AdV-rtTA-RRCA-System (s. 4.6.2.1., Abb. 4.19.). So wies das AdV-rtTA-tTS-RRCA-System in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh eine Induktionsrate (+/-Dox) von dem nahezu 8-fachen auf, im AdV-rtTA-RRCA-System betrug sie dagegen lediglich das 1,4-fache.

Abbildung 5.2. soll den Wirkmechanismus des tTS zur Suppression der Basal-expression im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System veranschaulichen.



**Abbildung 5.71:** Reduktion der Basalexpression durch den Einsatz des tTS im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System

**A:** AdV-rtTA-tTS-RRCA-System im induzierten Zustand; die Applikation von Dox verhindert hierbei die Bindung des rTA an das Tet-Operon; **B:** in Abwesenheit von Dox bindet der rTA an das Tet-Operon und verhindert mittels der KRAB-Domäne die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren an den CMV<sub>min</sub>-Promotor, sodass es zu keiner Transgenexpression kommt.

Verschiedene Versuche haben die Bedeutsamkeit der Dosierung der einzelnen Komponenten im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System dargelegt. Auch von Sander et. al. (2000) wurde bereits aufgezeigt, dass durch die Erhöhung der Konzentration des koapplizierten Transgens die Effektivität des tTS beeinträchtigt wird, wohingegen Mizuguchi et. al. (2001) zeigten, dass durch die gleichzeitige Erhöhung aller Komponenten im System eine weitere Reduzierung der Basalexpression möglich ist. Wie bereits die hier durchgeführten Untersuchungen zum AdV-rtTA-RRCA-System demonstrierten, waren nur minimale Konzentrationen des E1A-13S-Proteins ausreichend, eine Aktivierung des Systems zu induzieren und einer *Trans-*

Komplementierung koapplizierter AdV zu genügen. Mit steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh nahm die Regulierbarkeit des AdV-rtTA-RRCA-Systems rapide ab (s. 4.6.2.). Hierauf und auf den Resultaten von Sander et. al. (2000) und Mizuguchi et. al. (2001) basierend, wurden deshalb in dieser Arbeit vergleichsweise hohe Konzentrationen des tTS und niedrige Konzentrationen des Ad5-pTRE-13S-bgh und des Ad5TRE-Luc eingesetzt. Zwar zeichnete sich daraufhin ein vergleichbares Muster der Dosisabhängigkeit und damit ein Effektivitätsverlust des tTS bei höheren Konzentrationen des RRCA ab, doch konnte im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System die Kontrollierbarkeit der Transgenexpression durch Dox über einen deutlich ausgedehnten Dosierungsbereich aufrecht erhalten werden (s. Abb. 4.26.) als im AdV-rtTA-RRCA-System. Die Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh von 100-500 p/c erwies sich in den Zelllinien HT-29 und HepG2 hinsichtlich der *Trans*-Komplementierung und der Transgenexpressionssteigerung des koapplizierten AdVs und der gleichzeitigen Aufrechterhaltung der Regulierbarkeit des AdV-rtTA-tTS-RRCA-Systems am günstigsten (s. 4.6.3.4.).

Das Cell-Killing-Assay am Beispiel von EA.hy926 Zellen veranschaulichte vergleichend die hier untersuchten Systeme und demonstrierte die deutliche Überlegenheit des AdV-rtTA-tTS-RRCA-Systems sowohl gegenüber dem AdV-rtTA- als auch gegenüber dem AdV-tTS-RRCA-System (ohne rtTA-M2; Intention: Tumorzelllyse durch E1A-13S-induzierte Autoaktivierung des Systems, Dox-abhängige Regulation des tTS) hinsichtlich seiner mit dem RCA vergleichbaren Effektivität der Tumorzell-lyse und der gleichzeitigen Aufrechterhaltung der externen Regulierbarkeit durch Dox (s. 4.6.3.5.).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Sicherheit in der Tumorentherapie mittels des AdV-rtTA-tTS-RRCA-Systems besteht darin, dass die Option besteht, die Dox-vermittelte Induktion der adenoviralen Replikation zu revidieren.

Das Tet-On-System zeichnete sich bereits in Studien anderer Wissenschaftler durch seine relativ schnelle Reversibilität der Expressionsinduktion verglichen mit anderen induzierbaren Expressionssystemen (einschließlich des Tet-Off-Systems) aus (Agha-Mohammadi and Lotze, 2000; Xie et al., 1999). Auch in vorliegender Arbeit konnte die An- und Abschaltbarkeit der Transgenexpression im AdV-rtTA-System reproduziert werden, wobei die Expression nach anfänglicher Induktion bereits nach 48 Stunden nur noch ein Drittel des ursprünglichen Wertes aufwies, wenn die Dox-Applikation unterbrochen wurde (s. 4.6.1.3.). Der Vergleich mit den Resultaten von Xie et. al.

(1999), die ebenfalls nach 48 Stunden, nachdem die Dox-Applikation an transgene Mäuse abgebrochen wurde, eine signifikante Reduktion der Transgenexpression beschrieben und nach einer Woche keine mRNA-Expression des Transgens mehr nachweisen konnten, lässt einen ähnlichen weiteren Verlauf der Transgenexpression in dem hier durchgeführten Experiment annehmen.

Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass auch die adenovirale Replikation im AdV-rtTA-RRCA-tTS-System nach initialer Induktion wieder herabzuregulieren ist. Nach anfänglicher Replikationsinduktion mittels Dox konnte ein deutlicher Abfall der AdV-DNA-Replikation durch Fortlassen des Inducers erzielt werden. Bereits nach 72 Stunden reduzierte sich die relative DNA-Menge des koapplizierten AdVs auf die Hälfte (s. Abb. 4.33.). Der weitere Verlauf der DNA-Replikation wurde hier nicht untersucht, doch scheint dieses Ergebnis nur unwesentlich hinter dem zu liegen, das von Rendahl et. al. (2002) erreicht wurde, der mit dem Einsatz von Adeno-assoziierten AdV (AAV) bereits nach einer Woche keine Transgenexpression mit Hilfe eines ELISAs feststellen konnte.

Für den Einsatz des AdV-rtTA-tTS-RRCA-Systems in der Tumorgentherapie würde dies bedeuten, dass sowohl beim Auftreten von Intoleranzerscheinungen als auch nach einer potenziellen Tumorregression die RRCA-Replikation unterbunden werden könnte, und somit die Sicherheit gegenüber einer unbeabsichtigten, durch die unkontrollierte virale Replikation vermittelten Gewebsalteration sowie gegenüber anderen Begleiterscheinungen signifikant erhöht wird.

#### **5.4. Gewebsschutz mittels spezifischer Promotoren**

Verschiedene gewebs- oder tumorspezifische Promotoren wurden bereits für die Kontrolle der Transgenexpression in die Expressionskassette adenoviraler Vektoren inseriert. In der Tumorgentherapie wurden bislang sogenannte Suizidgene unter die Kontrolle spezifischer Promotoren gesetzt, deren Expression dadurch weitgehend auf das Zielgewebe beschränkt werden konnte (Lowe et al., 2001; Peng et al., 2001; Yoshimura et al., 2001). Eine andere Methode stellt dagegen die Positionierung der adenoviralen E1-Region unter die Kontrolle einer heterologen gewebsspezifischen Regulatoreinheit dar, wodurch die gerichtete Expression eine virale Replikation auf das Tumorgewebe limitieren sollte. Beispiele hierfür waren die Insertion des Prostata-spezifischen Antigen (PSA)-Promotors (Rodriguez et al.,

1997) oder des Kallikrein-Promotors (Yu et al., 1999). Hierbei wiesen die eingesetzten Promotoren zwar eine Spezifität für die Prostata auf, nicht jedoch eine spezielle Tumorselektivität. Auch in weiteren Studien konnte eine weitgehende zellspezifische Expression der E1A-Region zum Beispiel unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Fetoprotein-Promotors oder des DF3/MUC1-Promotors demonstriert werden (Hallenbeck et al., 1999;Kurihara et al., 2000). Obwohl hierbei die Spezifität für verschiedenen Zelltypen demonstriert werden konnte, wurde deutlich, dass bereits geringe Mengen viraler, für die Replikation essentieller Produkte, wie z. B. die E1A-Proteine, ausreichend sind, sowohl die Aktivität als auch die Spezifität TATA-Box-enthaltender Promotoren zu beeinflussen (Berk et al., 1998) und koapplizierte AdV in *trans* zu komplementieren (Fechner et al.; 2000). Zudem wurde aus vielen Arbeiten ersichtlich, dass in Abhängigkeit von den untersuchten Zelllinien eine absolute Spezifität der Promotoren nicht gegeben war, sondern eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Aktivität auch in anderen Zellen nachgewiesen werden konnte, wodurch gleichzeitig eine nicht-spezifische Transgenexpression und die daraus resultierende virale Replikation (Zellyse) evident wurde (Casado et al., 2001;Nicklin et al., 2001;Zheng et al., 2001).

Um die aufgezeigte Problematik der selektiven Replikation mit Hilfe einer neuen Strategie anzugehen, wurde in dieser Arbeit versucht, im Gegensatz zu der beschriebenen herkömmlichen Methodik, eine *gewebsspezifische Protektion* gegenüber der viralen Replikation und der Expression kotransduzierter (zelltoxischer) Transgene zu entwickeln, um eine Zellyse im peripheren gesunden Gewebe zu inhibieren. Um diesen Grundgedanken umzusetzen, wurde der Tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Silencer (tTS) stromabwärts eines spezifischen Promotors kloniert. Hierdurch sollte die Expression des tTS zielgerichtet auf das gesunde, den Tumor umgebende Gewebe beschränkt werden, so dass Fremdmetastasen in diesem Gewebe effektiv, und unbedenklich in bezug auf eine unbeabsichtigte Gewebsschädigung, durch eine TRE-vermittelte Viroonkolyse bekämpft werden können.

Für die gewebsspezifische Expression des tTS wurde der leberzellspezifische Promotor des humanen  $\alpha_1$ -Antitrypsin (hAAT) gewählt, da dieser sich bereits im Vergleich zu anderen leberspezifischen Promotoren mit einer bis zu 35-fach stärkeren Expression in retroviralen Vektorsystemen auszeichnete (Okuyama et al., 1996). Die Insertion des hAAT-Promotors für die Kontrolle eines Transgens in einem

adenoviralen Vektorsystem wurde anhand dieser Arbeit zum erstenmal vorgenommen und untersucht.

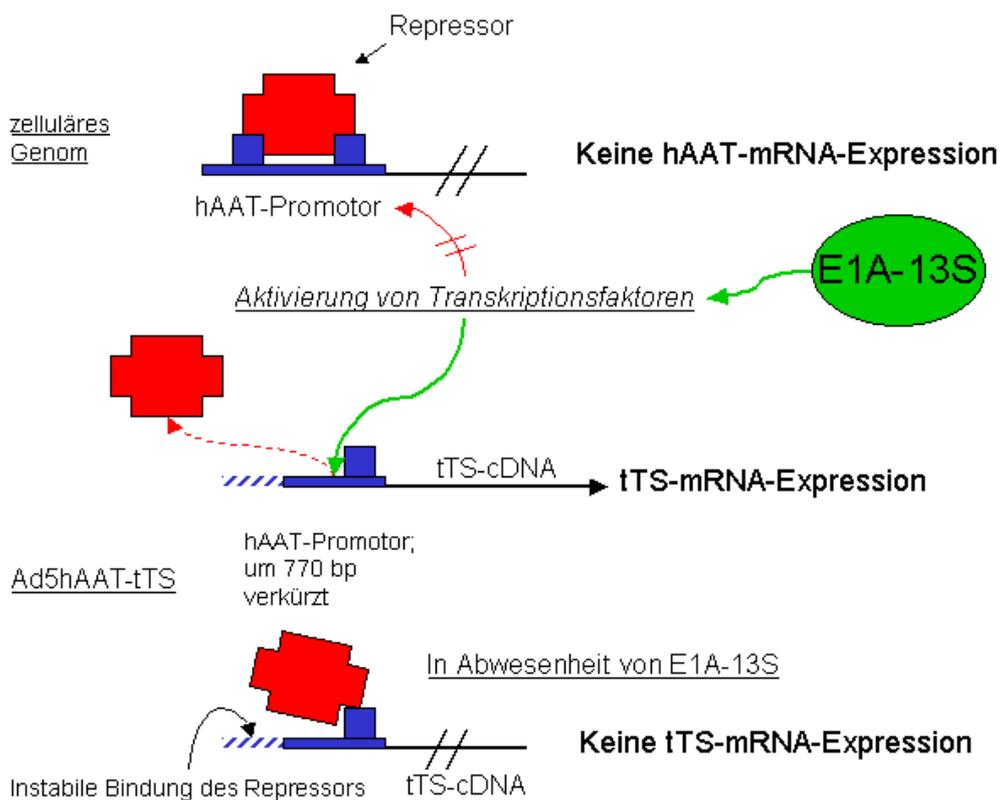
Der Nachweis der hAAT-mRNA zeigte erwartungsgemäß die starke Expression in hepatogenen HepG2 Zellen, doch wurde hierbei auch eine deutlich nachweisbare Expression in der kolorektalen Zelllinie HT-29 evident (s. Abb. 4.34.). Die daraufhin durchgeführte Untersuchung weiterer Zelllinien zeigte, dass auch in LS174-T (ebenfalls eine kolorektale Zelllinie) eine hAAT-mRNA-Expression nachweislich war, nicht jedoch in den Zelllinien EA.hy926 (endothelial/A549) und Kyse140 (Ösophagus-Karzinomzellen) (s. Abb. 4.35.). In sämtlichen hier untersuchten Zelllinien zeigte weder die Koinfektion mit dem Ad5CMV-rtTA-M2 und/oder dem Ad5-pTRE-13S-bgh noch die Applikation von Dox einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression des endogenen hAAT. Auch die tTS-mRNA-Expression unter der Kontrolle des hAAT-Promotors zeigte in HepG2 und LS174-T kaum eine Steigerung nach Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh auf. Extrem auffällig dagegen war, dass in den Zelllinien EA.hy926 und Kyse140, die keine endogene hAAT-Expression im Northern-Blot aufwiesen, eine deutliche Expression der hAAT-kontrollierten tTS-mRNA-Expression nach Koinfektion mit dem 13S-Vektor sichtbar wurde.

Dies führte zu der Annahme, dass in Zelllinien, die eine hohe endogene hAAT-Aktivität aufweisen (HepG2, HT-29, LS174-T), eine Transaktivierung des hAAT-Promotors im AdV durch den Ad5-pTRE-13S-bgh nur schwach ausfällt. In Zelllinien dagegen, die eine geringe bzw. keine endogene Aktivität des hAAT-Promotors zeigen (EA.hy926, Kyse140), ist eine Aktivierung des heterologen hAAT-Promotors durch E1A-13S deutlich vorhanden.

Weitere Untersuchungen zur Transaktivierung bestätigten diese Annahme (s. 4.6.4.2.), wobei eine Erklärung hierfür möglicherweise in den zellulären Repressor-Proteinen zu finden ist. Das Ausbleiben der Expression bestimmter Proteine in verschiedenen Zelltypen wird durch diese Repressoren vermittelt, indem sie die Bindungsstellen der Promotoren besetzen und eine Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren verhindern (Stryer L., 1994). Dies würde erklären, dass eine Aktivierung des endogenen hAAT-Promotors durch den Ad5-pTRE-13S-bgh in den Zelllinien EA.hy926 und Kyse140 ausbleibt, da die DNA-Bindungsstelle blockiert ist. In HepG2, HT-29 oder LS174-T dagegen, in denen ein solcher Repressor nicht bzw. in nur geringen Mengen vorhanden ist, hat die Anwesenheit des E1A-13S-Proteins kaum einen additiven Effekt auf die mRNA-Expression, da eine Aktivierung durch

zelluläre Transkriptionsfaktoren von sich aus gegeben und der Promotor bereits aktiv ist.

Der in vorliegender Arbeit in den Ad5hAAT-tTS einklonierte hAAT-Promotor wurde um 770 Basenpaare im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz (+ Enhancer-Einheiten) gekürzt (Ponder et al., 1991), woraus möglicherweise eine (partielle) Deletion der Repressor-Bindungsstelle resultierte. Somit ist der zelluläre Repressor (in EA.hy926/Kyse140) nicht in der Lage, stabil an den hAAT-Promotor des Ad5hAAT-tTS zu binden, sodass lediglich in den mit dem Ad5hAAT-tTS allein transduzierten Zellen eine Expression des tTS unterdrückt werden kann. Die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh dagegen bewirkt eine Verdrängung dieser wahrscheinlich instabil gebundenen Repressor-Proteine durch E1A-13S, das seinerseits die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren induziert und wodurch die Expression des tTS erfolgt (Abb. 5.3.).



**Abbildung 5.72.:** mögliche Erklärung für die Autoaktivierung des hAAT-Promotors durch E1A-13S bei fehlender endogener Promotor-Aktivität.

Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine (partielle) Deletion der Repressor-Bindungsstelle im hAAT-Promotor des Ad5hAAT-tTS. Es resultiert daraus eine instabile Bindung des zellulären Repressors. Bei Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh wird der Repressor durch E1A-13S von der Bindungsstelle verdrängt, und es kommt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer mRNA-Expression.

Die Untersuchung zur E1A-13S-vermittelten Transaktivierung des hAAT-Promotors in primären Keratinozyten demonstrierte sowohl im Nachweis der Luciferase-Aktivität als auch in der Analyse der relativen AdV-DNA-Replikation die geringe Funktionalität des tTS unter der Kontrolle des hAAT-Promotors. Es wurde hier trotz der Transduktion des AdV Ad5hAAT-tTS eine Virusreplikation und die damit einhergehende *Trans*-Komplementierung eines koapplizierten AdV durch E1A-13S offenbar, was die ausbleibende Expression des tTS unter der Kontrolle des hAAT-Promotors demonstrierte (s. Abb. 4.40. und 4.41.). Dabei kann in dieser Zelllinie ein Fehlen der endogenen hAAT-Expression vermutet werden, und entgegen dem vorher Gesagten bleibt hier die Aktivierung des hAAT-Promotors aus.

Aus diesem letzten Ergebnis lässt sich vermuten, dass auch die autonome Replikation der Tumorzellen zur Aktivierung des heterologen Promotors durch den Ad5-pTRE-13S-bgh beiträgt, was allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Ausschlaggebend ist, dass die fehlende Spezifität des hAAT-Promotors gegenüber einigen Tumorzelllinien unter Umständen ein Hindernis in der effektiven Zerstörung des Tumorgewebes (durch die daher verursachte ubiquitäre Expression des tTS) darstellt. Die Aktivierung und Expression des Ad5hAAT-tTS in den eigentlichen Target-Tumorzellen würde diese gegenüber einer Virusreplikation und der damit beabsichtigten Zelllyse protektieren.

Das Cell-Killing-Assay, das in den Zelllinien EA.hy926 (hAAT<sub>endogen</sub>-negativ) und HepG2 (hAAT<sub>endogen</sub>-positiv) vergleichend durchgeführt wurde (s. Abb. 4.41.), zeigte allerdings, dass das AdV-rtTA-hAAT-tTS-RRCA-System in EA.hy926 nur eine geringe protektive Wirkung gegenüber der RRCA-vermittelten Replikation aufweist, und die Zellen in Abwesenheit von Dox trotz Transduktion des Ad5hAAT-tTS lysiert wurden. Die Kotransduktion des Ad5CMV-tTS hingegen konnte eine Zelllyse nahezu vollständig unterbinden (AdV-rtTA-tTS-RRCA-System). In HepG2 dagegen demonstrierte sowohl das AdV-rtTA-tTS-RRCA-System als auch das AdV-rtTA-hAAT-tTS-RRCA-System die Funktionalität in dieser Zelllinie, und beide Systeme inhibierten in Abwesenheit von Dox effektiv eine Zelllyse.

Unter diesen Voraussetzungen ist auf einen möglichen Therapieansatz für disseminierte Fremdmetastasen im Lebergewebe zu schließen. Förderlich würde sich hierfür der natürliche Tropismus der AdV für das Lebergewebe nach systemischer Applikation auswirken. Die effektive Transduktion der in die Leber metastasierten Tumorzellen wäre durch die Replikationsfähigkeit des RRCA Ad5-

pTRE-13S-bgh wahrscheinlich, und die Zellyse durch den Einsatz des Ad5hAAT-tTS weitgehendst auf die Zellen der Fremdmetastase beschränkt.