

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, vorhandene replikationskompetente Adenoviren (RCAs) hinsichtlich ihrer Mechanismen und Nutzbarmachung für die Tumorthherapie zu untersuchen und basierend auf diesen Ergebnissen ein neues RRCA (bedingt-replikationskompetentes Adenovirus)-System zu entwickeln, das den Einsatz replizierender adenoviraler Vektoren (AdV) sicherer machen könnte.

1. Die Versuche zum Einsatz eines RCAs zeigten, dass durch die Koapplikation des RCA mit einem Luciferase-exprimierenden replikationsdefizienten AdV eine erhebliche Steigerung der Transgenexpression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erzielt werden konnte. RCAs führten zu einer effizienten Zerstörung von Tumorzellen *in vitro*. *In vivo* trat neben der Steigerung der Luciferase-Expression eine ausgeprägte Immunreaktion in der Leber nach RCA-Applikation an Mäuse auf. Trotz der signifikanten Expressionssteigerung des koapplizierten Transgens und der tumorzelltoxischen Wirkung des RCAs ist ein Einsatz von RCAs in dieser Form aufgrund der nicht tumorzellspezifischen Replikation und den zu erwartenden Nebenwirkungen für die Tumorthherapie obsolet.

2. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein neues Tetrazyklin-abhängiges RRCA-System (AdV-rtTA-RRCA-System) entwickelt, das eine externe Regulation der adenoviralen Replikation ermöglichen sollte. Hierfür wurde die E1A-13S-Region des Adenovirus Typ5 stromabwärts des Tetrazyklin-Response-Elements (TRE) kloniert, um eine Regulation durch die Applikation oder das Fortlassen von Doxyzyklin (Dox) in Gegenwart des reversen Tetrazyklin-induzierbaren Transaktivators M2 (rtTA-M2) zu erzielen. Die Infektion verschiedener Karzinomzelllinien mit dem die E1A-13S-Region exprimierenden RRCA Ad5-pTRE-13S-bgh zeigte, dass auch ohne Kotransduktion des rtTA-M2 sowohl eine Expressionssteigerung eines koapplizierten replikationsdefizienten AdV als auch eine mit dem RCA vergleichbare Zelllyse durch die Expression des adenoviralen E1A-13S-Proteins induziert wurde. Eine Dox-abhängige Regulation der E1A-13S-Expression war nicht möglich. Als Ursache hierfür wurde eine Autoinduktion sowohl des CMV- als auch des CMV_{min}-Promotors ausgemacht, die durch die minimale TRE-vermittelte Basalexpression der E1A-13S-Region verursacht wurde („leaky Expression“ des Tet-On-Systems).

Die Involvierung des Tetrazyklin-regulierbaren transkriptionalen Silencers (tTS) in das AdV-rtTA-RRCA-System (AdV-rtTA-tTS-RRCA-System) führte zu einer Reduzierung der Basalexpression von E1A-13S und zu einer Inhibierung der Autoaktivierung des CMV_{min} und ermöglichte die Regulierung der AdV-Replikation mittels Dox. Ein Vergleich zwischen dem AdV-rtTA-RRCA-, AdV-tTS-RRCA- (+tTS, +RRCA, ohne rtTA-M2) und dem AdV-rtTA-tTS-RRCA-System veranschaulichte die klare Überlegenheit der letztgenannten Systemvariante sowohl hinsichtlich ihrer effektiven Tumorzelllyse und deren Regulierbarkeit durch Dox als auch hinsichtlich der Regulierbarkeit der Transgenexpression eines koapplizierten AdV.

Anhand des Replikationsnachweises eines koapplizierten Indikator-AdV konnte im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System sowohl die Induktion des Systems als auch die Reversibilität der Induktion durch Fortlassen von Dox demonstriert werden (ON-OFF-Mechanismus).

3. Die gewebsspezifische Expression des tTS durch die Insertion des leberspezifischen humanen α_1 -Antitrypsin (hAAT)- Promotors (Ad5hAAT-tTS) für eine leberspezifische Protektion gegenüber einer TRE-vermittelten Transgenexpression bzw. adenoviralen Replikation erwies sich als richtungsweisender neuer Strategieansatz in der Tumorgentherapie.

Es zeigte sich, dass der Ad5hAAT-tTS in hAAT_{endogen}-negativen EA.hy926 Zellen eine Virusreplikation nicht verhindern konnte, und somit eine Tumorzelllyse unabhängig vom Dox-Status auftrat. In den hAAT_{endogen}-positiven HepG2 Zellen hingegen konnte der Ad5hAAT-tTS effektiv eine Virusreplikation in Abwesenheit von Dox inhibieren und somit die hepatischen Zellen vor einer Ad5-pTRE-13S-bgh-vermittelten Zelllyse schützen (Prinzip der „gewebsspezifischen“ Gentherapie).

Allerdings war eine Gewebsspezifität des in den AdV inserierten hAAT-Promotors nur bedingt gegeben (Expression auch in kolorektalen Zellen), und es trat eine Transaktivierung durch E1A-13S auf, die in Abhängigkeit von der zellspezifischen endogenen hAAT-Aktivität unterschiedlich stark ausgeprägt war. Eine Aktivierung des zellulären hAAT-Promotors erfolgte nicht. Die Insertion eines im Vergleich zum zellulären hAAT-Promotor verkürzten hAAT-Promotors in den AdV und die wahrscheinlich daraus resultierende Deletion der DNA-Bindungsstelle für zelluläre Repressor-Proteine, stellt eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen dar.

Generation of a Doxycycline-controlled adenoviral vector-replication-system for cancer gene therapy

7. Summary

This study aims to analyse the mechanism and advantages of existing replication-competent adenovirus (RCA) for cancer gene therapy and, based on these results, to develop a new RRCA (restricted replication-competent adenovirus) system which may help to improve the safety of using replicating adenoviral vectors in cancer gene therapy.

1. The investigations on the use of RCAs showed, that the coapplication of a RCA induce a significant increase of transgene expression of a replication-deficient adenoviral vector (AdV) *in vitro* and *in vivo*. RCAs conducted to an efficient lysis of tumorcells *in vitro*. *In vivo* additional to the increase of gene expression there was a obvious immune reaction in the liver after the application of the RCA in mice. Therefore, despite of the significant increase of gene expression of a coapplied AdV and the tumorcell toxicity of the RCA, the use of a RCA in this form is not practicable in gene therapy by virtue the no existing tumorspecificity of viral replication and the side effects to be expected.

2. Based on these cognitions a new system (AdV-rtTA-RRCA-system) was developed to make an extern pharmacological regulation of viral replication possible. Therefore the E1A-13S region of the Adenovirus Typ5 was cloned downstream of the Tetracyclin-Response-Element (TRE) to achieve a regulation by application or withdrawal of doxycyclin (dox) in presence of the reverse tetracycline-controlled transactivator M2 (rtTA-M2). The infection of several tumorcell lines with the RRCA expressing the E1A-13S region (Ad5-pTRE-13S-bgh) showed, that an increase of transgene expression of a coapplied replication-deficient AdV as well as a comparable to a RCA-induced cell killing was provoked by the expression of the adenoviral E1A-13S protein. A dox-dependent regulation was not possible. The reason was an autoinduction of the CMV as well as the CMV_{min} promotor, which was caused by the minimal TRE-induced basalexpression of the E1A-13S protein („leaky expression of the Tet-On-System“).

The additional use of the tetracyclin-controlled transcriptional silencer (tTS) in the AdV-rtTA-RRCA-system conducted to a reduction of E1A-13S basalexpression and to an inhibition of the autoactivation of the CMV_{min} and allowed the tight regulation of AdV replication by dox. A comparison between the different system-variants showed the obvious superiority of the AdV-rtTA-tTS-RRCA-system to the AdV-rtTA-RRCA- and the AdV-tTS-RRCA-system in respect of the potent tumorcell killing and its regulability by dox as well as the control of transgene expression of a coapplicated AdV.

In the AdV-rtTA-tTS-RRCA-system the induction by dox and also the de-induction by withdrawal of dox could be demonstrated by detection of the DNA replication of a coapplicated indicator-AdV (ON-OFF-mechanism).

3. For the liver-specific protection against a TRE-induced transgene expression or the adenoviral replication, respectively, the tissue-specific expression of the tTS by insertion of the livercell-specific human α_1 -antitrypsin (hAAT) promotor proofed itself to be a directive new strategy in cancer gene therapy.

The hAAT-controlled expression of tTS showed no potent inhibition of virus replication in hAAT_{endogen}-negative cells (EA.hy926), which induced a tumorcell killing independent of the dox status. On the other hand in the absence of dox the Ad5hAAT-tTS could actual prevent a virus replication in the hAAT_{endogen}-positive HepG2 cells and therefore it could protect the hepatic cells from Ad5-pTRE-13S-bgh-induced cell destruction (principle of "tissue-protective gene therapy").

Though, the tissue-specificity of the hAAT promotor inserted in the AdV was relative (there was also an expression in colorectal cells) and a transactivation by E1A-13S existed, whose intensity was dependent on the cell-intern endogen hAAT-activity. An activation of the cellular hAAT promotor did not emerge. The insertion of a shortened hAAT promotor in the AdV compared to the cellular hAAT promotor and the possibly resulting deletion of a DNA binding-site for cellular repressor proteins could be a feasible explanation for this phenomenon.