

Stephanie Sieger  
Dr.sc.hum.

## **Transfer von diagnostischen und therapeutischen Genen unter Kontrolle regulatorischer Elemente des Glucose-Transporters, mit Hilfe von rekombinanten Viren**

Geboren am 21.08.1973 in Sinsheim  
Reifeprüfung am 11.05.1993 in Eppingen  
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1994 - SS1999  
Vordiplom am 22.07.1996 an der Universität Konstanz  
Diplom am 31.08.1999 an der Universität Konstanz

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr.med. Uwe Haberkorn

Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung maligner Tumore sind eine alternative Therapieform dieser Erkrankung. Ein weit verbreitetes System in der Gentherapie von Tumoren ist die Negativselektion von Zellen nach einem erfolgten Gentransfer durch ein Suizidgen/Prodrug System. Damit die toxischen Wirkungen der Suizidgene auf die Tumorzellen beschränkt bleiben und möglichst keine gesunden Zellen geschädigt werden, muß die Expression der therapeutischen Gene auf die Tumorzellen beschränkt bleiben. Diese selektive Expression kann durch gewebespezifische genregulatorische Elemente (Promotoren, Enhancer) erreicht werden. Daher wurden die regulatorischen Sequenzen der Gene PPAR $\gamma$ 2 (p1000) und PPAR $\gamma$ 3 (p800) aufgrund ihrer Überexpression in Kolonkarzinomen und Liposarkomen, als gewebespezifische Promotoren für die tumorspezifische Aktivierung des HSVtk-Suizidgens in diesen Tumoren eingesetzt. Aufgrund der schwachen Promotoraktivität von p800 und p1000 konnte allerdings keine Aktivierung der von ihnen kontrollierten Gene in Tumorzellen erreicht werden. Die schwache Promotoraktivität von gewebespezifischen Genen und die zum Teil niedrige Infektionsrate bei Tumorzellen durch AAV führen zu keiner ausreichenden Aktivierung der HSVtk, um GCV in hinreichendem Ausmaß zum therapeutisch wirksamen Metaboliten umzusetzen. Da auch im Fall der regulatorischen Elemente p1000 und p800 keine ausreichende Aktivierung der HSVtk und somit keine therapeutische Dosis an GCV-3P in den Tumorzellen erreicht werden konnte, um auf diese einen therapeutischen Effekt auszuüben, wurde auf weitere Versuche mit den gewebespezifischen Elementen verzichtet.

Neben diesen gewebespezifischen Promotoren wurden regulatorische Elemente des Glucosetransportergens GLUT1 als tumorspezifische regulatorische Elemente für das HSVtk-Suizidgen eingesetzt. Zunächst wurden mit rAAV-Konstrukten, die das egfp-Reportergen unter Kontrolle des GLUT1-Promotors tragen, Tumor- und Nicht-Tumorzellen infiziert. Eine starke EGFP-Reportergenaktivität, vergleichbar zu der mit CMV als regulatorisches Element erreichte Fluoreszenz, konnte nur in Tumor- und onkogen transformierten Zellen gemessen werden. Konstrukte mit EGFP unter Kontrolle von GTI-1.3 ergaben keine oder nur eine sehr schwache Reportergenaktivität für Nicht-Tumorzellen, die mit rAAV-Partikeln infiziert wurden. In Versuchen zur Aktivität des Suizidgens HSVtk unter Kontrolle regulatorischer Elemente des GLUT1-Gens war diese ebenfalls auf Tumor- und onkogen transformierte Zellen beschränkt. In Tumorzellen, die mit rAAV mit HSVtk unter Kontrolle des GLUT1-Promotors infiziert wurden, zeigten Aufnahmeversuche mit GCV, dass dieses als Substrat der HSVtk erkannt, verstoffwechselt und in der Zelle zurückgehalten wurde. Der Einbau von Thymidin in die DNA wurde in Gegenwart von GCV gehemmt, und durch die Therapie mit GCV wurde in Tumorzellen ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen ausgeübt. In den Nicht-Tumorzellen HaCaT und HUVEC konnten solche Effekte nicht beobachtet werden. Hier wurde HSVtk ausschließlich unter Kontrolle von CMV aktiviert. Aufnahmestudien mit  $^{131}\text{I}$ -Deoxycytidin *in vivo* zeigten in mit HSVtk stabil transduzierten Tumorzellen eine schwache Anreicherung im Tumor. Die Substanz wurde nach einem kurzen Anstieg nach 6 h wieder aus dem Tumor ausgeschieden, war aber auch 48 h p.i. noch etwa 3-mal so hoch wie beim Wildtyp tumor und den meisten anderen Organen. In einem Tiermodell mit ACI-Ratten, denen Morris Hepatomzellen, die HSVtk unter Kontrolle des GLUT1-Promotors exprimieren, transplantiert wurden, konnte jedoch nach einer 12-

tägigen GCV-Therapie eine totale Tumorregression beobachtet werden, wohingegen die nicht modifizierten Wildtypzellen trotz GCV-Therapie weiter an Tumolvolumen zunahmen.

Die Promotorsequenz des GLUT1-Gens ist demnach ein starkes regulatorisches Element, das die ihm nachgeschalteten Gene in einer zum CMV-Promotor vergleichbaren Stärke aktiviert. Die Promotoraktivität ist auf Tumorzellen und onkogen transformierte Zellen beschränkt und ist ohne zusätzliche Enhancerelemente am stärksten. *In vivo* konnte die Aktivierung der HSVtk durch GTI-1.3 bestätigt werden.

Neben dem Suizidalen HSVtk wurde das Gen für den Natrium-Jodidsymporter unter Kontrolle des GLUT1-Promotors transferiert. Durch die GLUT1-Promotoraktivität konnte eine starke Jodaufnahme in Zellen, die durch Transfektion den Jodidsymporter stabil exprimieren, erreicht werden. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche mit MH3924A-Zellen bestätigten die Aktivität des Jodidsymporters. Die Szintigraphie von tumortragenden Ratten zeigen eine deutliche Anreicherung von <sup>131</sup>I in den gentechnisch modifizierten Tumorzellen. In diesen modifizierten Zellen findet jedoch keine Bindung von Jod an Tyrosinreste statt, so dass ein Jodefflux aus den Zellen zu beobachten ist. Durch den Efflux von Jod wird in den hNIS-exprimierenden Zellen keine therapeutisch wirksame Dosis erreicht. Wir konnten nach Applikation von 18,5 MBq <sup>131</sup>I eine Dosis von 830 mGy für den hNIS-exprimierenden Tumor und 85 mGy für den Wildtyp-Tumor erreichen. Allerdings ist diese Dosis zu gering, um einen therapeutischen Effekt auf den Tumor auszuüben. Die Halbwertszeit von <sup>131</sup>I im hNIS-Tumor betrug 14,5 h.

Der Jodidsymporter unter Kontrolle des GLUT1-Promotors führt also zu einer Anreicherung von Jod in genetisch modifizierten Tumorzellen. Die Jodanreicherung in Tumorzellen mit NIS unter Kontrolle von GTI-1.3 ist aber nicht ausreichend, um einen therapeutischen Effekt auf das Tumorgewebe auszuüben.