

5. Zusammenfassung

Die Intention der vorliegenden Promotionsarbeit war, mit Hilfe des Telomerase-Promotors (TERT) eine tumorselektive Gentherapie zu entwickeln. Wir wählten den Telomerasepromotor, weil die katalytische Untereinheit der Telomerase bei über 85% der Tumoren stark exprimiert ist. In gesunden differenzierten Zellen ist die Telomerase jedoch inaktiv. Lediglich in einigen speziellen Zellarten wie Keimzellen oder Stammzellen ist Telomeraseaktivität nachweisbar.

Nach Auswahl einiger Tumorzelllinien wurde zunächst die *hTERT*-Expression (humane Telomerase Reverse Transkriptase) der Tumorzellen mit Hilfe von RT-PCR untersucht. *hTERT* ist die enzymatisch aktive, der Regulation unterliegende Untereinheit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase. Die *hTERT*-Expression korreliert mit der Aktivität des Telomerasepromotors. Als weitere Untereinheit benötigt die Telomerase die ubiquitär vorliegende, nicht der Telomerase-Regulation unterliegende Telomerase-RNA, welche als Vorlage für die Telomerverlängerung dient.

Die Telomeraseaktivität in den Zelllinien wurde mit Hilfe des TRAP-Assays (Telomeric Repeat Amplification Protocol) nachgewiesen. Nach Untersuchung der *hTERT*-Expression und der Telomeraseaktivität in den ausgewählten Tumorzelllinien wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Zelllinien durchgeführt.

Als DNA-Vektoren wurden zwei unterschiedliche adenovirale Konstrukte verwendet. Die Vektoren enthielten zum einen das Luciferase Reportergen unter Kontrolle des *hTERT*-Promotors (Ad-*hTERT*-Luc) und zum anderen das Reportergen unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors (Ad-CMV-Luc). Die Luciferaseexpression in den Zellen ist quantitativ messbar und korreliert mit der jeweiligen Promotoraktivität. Nach *in vitro*-Nachweis der *hTERT*-Expression in den Tumorzelllinien wurden die Vektoren *in vivo* im Hinblick auf die Tumorspezifität des Telomerasepromotors getestet. Die Versuche wurden mit NMRI- Nude Mäusen durchgeführt. Als Xenotransplantatmodell wählten wir die etablierte Zelllinie H1299 eines humanen kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Diese Tumorzelllinie zeigte bei den *in vitro*- Versuchen eine hohe Telomerasepromotoraktivität im Vergleich zum CMV- Promotor und ist zur Tumorinduktion *in vivo* gut geeignet. Nach Tumorinduktion wurde den Mäusen Virussuspension in die Schwanzvene injiziert. Nach 72 Stunden wurden Organe und Gewebe präpariert. Bei den Untersuchungen wurde Virus- DNA in sämtlichen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch, dass die durchaus hohe Telomerase- bzw. Luciferaseaktivität sich nicht nur auf Tumorgewebe beschränkte, sondern in anderen Geweben ebenfalls sehr hoch war. Die Aktivität in der Leber war sogar höher als im Tumorgewebe, was durch den natürlichen Hepatotropismus der Adenoviren begründet sein kann. Beim Vergleich der Tumor-Leber-Aktivitätsverhältnisse von Ad-*hTERT*-Luc und Ad-CMV-Luc konnte man erkennen, dass die Aktivität in der Leber bei Ad-*hTERT*-Luc etwa das 50 fache und bei Ad-CMV-Luc das 100 fache von der Aktivität im Tumorgewebe betrug. Die Aktivitäten in einigen anderen Geweben ergaben ebenfalls sehr hohe Werte. Die Aktivitätsmuster der beiden Konstrukte Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc zeigten außer den unterschiedlichen Aktivitätsmaxima kaum Unterschiede, insbesondere war keine Tumorspezifität zu erkennen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem *hTERT* Promotor im gewählten Ansatz keine Tumorselektivität erzielt werden kann.