

Christoph Peter Fiola

Dr. med.

Untersuchungen zur Tumorselektivität der Replikation des Newcastle Disease Virus

Geboren am 15.10.1973 in Heidelberg

Staatsexamen am 27.11.2003 an der Ruprecht-Karls-Universität

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. P. Altevogt

Das Ziel der Promotionsarbeit war die Untersuchung der Zusammenhänge der Tumorselektivität der NDV-Replikation im direkten Vergleich von gesunden, nicht-transformierten zu transformierten, potentiell tumorigenen Zellen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde die Replikation einer rekombinanten Variante von NDV (NDFL-EGFP) mittels Fluoreszenz-Mikroskop und FACS betrachtet. Ferner wurden die Unterschiede des Proteinmetabolismus, der Signaltransduktion und der Virusreplikation in den verschiedenen Zielzellen nach Ko-Inkubation mit NDV (Stamm Ulster) unter Anwendung mikrobiologischer Methoden untersucht. Um die Abhängigkeit der Veränderungen in den Zielzellen von der Replikationsfähigkeit des Virus zu bestimmen, wurde zusätzlich UV-inaktiviertes Virus eingesetzt.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Das rekombinante, EGFP-modifizierte Newcastle Disease Virus (NDFL-EGFP) wurde in den Tumorzelllinien stark und anhaltend exprimiert, was sowohl unter dem Fluoreszenz-Mikroskop als auch am FACS nachgewiesen werden konnte. Dies war nur nach Ko-Inkubation mit Lebend-Virus zu beobachten. Bei den nicht-transformierten Zellen war die Produktion des fluoreszierenden EGF-Proteins nach Ko-Inkubation mit Lebend-Virus nur sehr schwach und transient ausgeprägt oder blieb sogar ganz aus. Die Untersuchung auf Expression viraler Antigene auf der Oberfläche der Zielzellen ergab, dass ausschließlich in den Tumorzelllinien nach Infektion mit Lebendvirus ein Übergang von niedriger (LAD = low antigen density) zu hoher Antigen-dichte (HAD = high antigen density) stattfand. Die nicht-

transformierten Zellen zeigten dieses Phänomen nicht. Hier konnte nur das oberflächlich gebundene Virus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass NDV sich Tumor-selektiv vermehrt.

Die Analyse der Produktion von NDV-Positivstrang- und NDV-Negativstrang-RNA in gesunden, nicht-transformierten und in transformierten, potentiell tumorigenen Zellen ergab, dass nur in den Tumorzelllinien sowohl Positivstrang- als auch Negativstrang-RNA von NDV in großen Mengen produziert wurde. In den nicht-transformierten Zellen konnte zwar viel NDV-Positivstrang-RNA, jedoch nur sehr geringe Mengen NDV-Negativstrang-RNA nachgewiesen werden. Es muss also eine Inhibition der Transkription von NDV-Antigenom zu NDV-Genom in den gesunden Zellen bestehen. Eine Ko-Inkubation mit UV-NDV ergab keine messbaren Veränderungen.

Die Resultate der RNA- und Proteinanalysen belegen, dass die Interferon-induzierte Abwehr in PBMC gesunder Spender durch die frühzeitigere und stärkere Expression antiviraler Proteine nach Ko-Inkubation mit NDV effizienter aktiviert wurde als es bei den Tumorzellen der Fall war. Durch Herunterregulierung des Initiationsfaktors eIF-2 α konnte die Proteinsynthese in den Ribosomen der PBMC inhibiert werden. Die Zellen des T-Zell-Lymphoms (JCD-28) wiesen eine Zunahme der Produktion von eIF-2B nach NDV-Infektion auf. Dies steigert die Empfänglichkeit transformierter Zellen gegenüber Virusinfektionen. Die gesunden Zellen konnten also den „antiviralen Status“ nach Ko-Inkubation mit Lebend-Virus schneller und effizienter etablieren als es für die Tumorzellen möglich war.

Die Untersuchungen mit UV-inaktiviertem NDV ergaben, dass es in PBMC zu einer Stimulation der Interferon-induzierten, antiviralen Proteine nach Ko-Inkubation kam, jedoch in den Tumorzelllinien die Produktion stagnierte oder sogar abnahm. Zusätzlich dazu kam es in PBMC zu einer Drosselung der Produktion des Initiationsfaktors eIF-2 α , während sie in den getesteten Tumorzelllinien zunahm.

Daraus lässt sich schließen, dass die Ko-Inkubation von PBMC mit UV-inaktiviertem NDV ausreicht, um die Interferon-induzierte Abwehr zu mobilisieren. Diese Reaktion blieb bei den Tumorzellen aus. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der Untersuchungen mit Lebend-Virus, deutet dies darauf hin, dass die gesunden Zellen nicht nur frühzeitiger und stärker, sondern auch sensitiver auf die virale Bedrohung reagieren können.

PBMC von gesunden Spendern und die Zellen aus dem T-Zell-Lymphom, beide lymphohämatopoietischen Ursprungs, produzierten zu keinem Zeitpunkt und unabhängig davon, ob NDV oder UV-NDV eingesetzt wurde, das Protein HSP-27-P. Im Gegensatz dazu konnte in den epithelialen Brustkrebslinien BT-20 und MCF-7 eine starke Zunahme von HSP-27-P verzeichnet werden. Die Produktionssteigerung war bei Gebrauch des Lebend-Virus stärker ausgeprägt als bei Gebrauch des UV-inaktivierten Virus.

Zukünftige Einsatzmöglichkeiten für das Newcastle Disease Virus:

Vektoren, die bisher für den Einsatz in der Krebstherapie getestet wurden, wiesen oftmals Probleme, wie zum Beispiel, ineffiziente Replikation in vivo, ineffizientes Tumortargeting oder Unvereinbarkeit mit den bestehenden Sicherheitsstandards auf. Die Verwendung von rekombinantem Newcastle Disease Virus könnte eine Lösung dieser Probleme darstellen. Professor Schirmmayer und sein Forscherteam haben bereits vielversprechende präklinische und klinische Daten mit nicht-rekombinantem NDV erhoben. Die Weiterentwicklung dieser Erkenntnisse und die Bestückung von NDV mit therapeutischen Genen könnte zur Entwicklung neuer, erfolgversprechender NDV-Varianten als Vektoren für die klinische Anwendung führen.