

Simone Berlinghoff

Dr. med.

Rekombinante Adeno-assoziierte-Virus-2-Suizidgentherapie für die Behandlung des diffusen malignen Pleuramesothelioms

Geboren am 26.09.1978 in Ludwigshafen am Rhein

Staatsexamen am 15.11.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. St. Frühauf

Obwohl es Fortschritte bei der Verbesserung der konventionellen Therapie des diffusen malignen Pleuramesothelioms gegeben hat, bleibt die mittlere Überlebenszeit der Patienten fast unverändert schlecht. Durch die besondere Lokalisation dieser Tumorentität in der Pleurahöhle sind lokoregionale Therapiemöglichkeiten das Ziel verschiedenster Bemühungen, die Chancen der Patienten zu verbessern. In diesem Zusammenhang könnte die lokoregionäre Gentherapie mit Hilfe des rekombinanten Adeno-assoziierten Virus-2 (rAAV-2) eine solche neue Strategie sein. Der hier verwendete AAV-2-Vektor enthielt ein Fusionsgen, welches aus dem Gen der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus (HSV-TK) und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) bestand. Das HSV-TK-Gen diente als Suizidgen, indem es das Virostatikum Ganciclovir (GCV) in einen toxischen Metaboliten überführte und so die transduzierten Tumorzelle abtötete. Neben Zelllinien aus dem Kolon-Karzinom (CaCo-2), Rektum-Karzinomen (HRT-18, SW 707), Zervix-Karzinom (CaSki), und Melanom (MELKL-2) ließen sich drei Zelllinien aus Mesotheliomen (H-Meso-1, MSTO-211H, NCI-H28) gut mit dem rAAV-2-Vektor transduzieren. Zur besseren Charakterisierung der Tumormodelle wurden diese drei Zelllinien mikroskopisch dokumentiert, wachstumskinetisch und zytogenetisch mittels Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH) charakterisiert. Es wurden unterschiedliche Vektorkonstrukte getestet, die verschiedene Promotoren enthielten (Zytomegalie-Virus (CMV) Elongationsfaktor 1-alpha (EF-1 alpha), retroviraler „long terminal repeat“ (LTR) und Phosphoglycerinkinase (PGK)). Der Vektor mit dem EF-1 alpha-Promotor zeigte in allen drei Zelllinien die höchste GFP-Expression, die durch Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein zusätzlich noch gesteigert werden konnte. Mit dem rAAV-2-Suizidgenvektor-System konnte im In-vitro-Experiment eine fast komplette

Eliminierung der Tumorzellen erreicht werden. In einem weiteren Schritt wurde ein NOD/SCID-Mausmodell für Mesotheliome etabliert. Dabei konnte zwar eine signifikante Verlängerung des Überlebens nicht erreicht werden ($p = 0,5$), da die Mäuse offenbar an der Expansion der nicht-transduzierten bzw. der zu schwach das Suizidgen exprimierenden Tumorzellen starben, aber es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen, die im ausreichenden Maße des Suizidgen exprimierten, durch die anschließende GCV-Therapie abgetötet werden konnten. Diese Arbeit zeigt, dass das rAAV-2-Suizidvektor-System bei Mesotheliomzellen in In-vitro-Versuchen zu einer fast kompletten Tumorzellabtötung führt. Bei den In-vivo-Experimenten wurde gezeigt, dass der Vektor in der Lage ist, Tumorzellen zu transduzieren und abzutöten, es bedarf aber weiterer Optimierung sowohl des Vektorsystems als auch des Tumormodells. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Ansätze von rAAV-2-basierter Suizidgentherapie zur innovativen Behandlung des malignen Pleuramesothelioms in einem sehr frühen experimentellen Stadium. Obwohl die vorgelegten experimentellen Ergebnisse insgesamt eher als ernüchternd eingeordnet werden können, besteht auf Grund der nachgewiesenen Wirksamkeit des Ansatzes (*in vitro* und *in vivo*) die berechtigte Hoffnung, diese Therapieform durch Modifizierung des Modellsystems so weiter zu entwickeln, dass sie zur klinischen Anwendung gelangen könnte.