

Christine Germann

Dr.sc.hum.

Erfassung der induzierten Enzymaktivität bei Genterapie maligner Tumore mit Suizidgenen: In-vitro-Studien mit dem Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Gen in Hepatomzellen

Geboren am 13.01.1969 in Erbach

Reifeprüfung am 15.06.1988 in Michelstadt

Studiengang der Fachrichtung Pharmazie vom WS 1988 bis WS 1993

1. Staatsexamen am 22.03.1991 an der Philipps-Universität Marburg

2. Staatsexamen am 30.03.1993 an der Philipps-Universität Marburg

Approbation am 07.09.1994

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr.med. Uwe Haberkorn

Das Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Gen ist in Kombination mit dem Virusstatikum Gancyclovir ein vielversprechendes Suizidsystem, das vor allem bei Hirntumoren momentan in präklinischen Genterapiestudien erprobt wird. Ein limitierender Parameter ist die schlechte Infektionseffizienz bei Übertragung des Suizidgens auf die zu behandelten Tumorzellen. Dadurch sind mehrere Infektionen nötig, um eine ausreichende Thymidinkinaseaktivität zu erreichen. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie steht eine nicht invasive, nuklearmedizinische Methode zur Verfügung, mit der die induzierte Enzymaktivität im Tumorgewebe erfaßt werden kann. Dafür sind in-vitro Untersuchungen mit Substraten der Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase und mit entsprechenden Stoffwechseltracern auf ihre Anwendbarkeit als Radiotracer eine grundlegende Voraussetzung und zugleich Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Das Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase-Gen (HSVtk) wurde in Morris-Hepatom-Zellen der Ratte eingeschleust und die Expression der HSVtk durch Bestimmung der Gancyclovir-Sensitivität überprüft. Die Anreicherung des Nukleosidanalogen Gancyclovir und des Substrates Difluordeoxycytidin erhöhte sich mit steigender Gancyclovirkonzentration, Inkubationsdauer und mit zunehmendem Anteil HSVtk-exprimierender Zellen. Die hohe Korrelation der Gancyclovir- und Difluordeoxycytidin-Anreicherung mit der Wachstumshemmung, erlaubt Rückschlüsse über die Effizienz einer veranschlagten Therapie. Experimente zum Transport zeigen, daß Gancyclovir und Difluordeoxycytidin überwiegend über Nukleosidtransportproteine in die Zellen aufgenommen werden. Verglichen mit dem Gancyclovir-Uptake war die Difluordeoxycytidin-Anreicherung 3-4-fach höher in den HSVtk-exprimierenden Zellen und 5-fach höher in den Kontrollzellen. Ein möglicher Grund ist, daß Difluordeoxycytidin aufgrund seiner molekularen Struktur auch ein Substrat der humanen Thymidinkinase sein kann.

Aufgrund seiner geringen Anreicherung in den HSVtk-exprimierenden Zellen erwies sich das ebenfalls untersuchte Nukleosidanalogen Fluorodeoxycytidin als ungeeignetes HSVtk Substrat. Die Ergebnisse liefern die Grundlage für eine Nutzung von Gancyclovir und Difluordeoxycytidin als Indikatoren zur Bestimmung der induzierten HSVtk-Aktivität mit PET.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Experimente zur Aufnahme verschiedener Stoffwechseltracer nach Gancyclovirtherapie durchgeführt. In den HSVtk-exprimierenden Zellen kam es trotz zurückgehender Zellzahl zu einem Anstieg der Fluorodeoxyglucose und der 3-O-Methylglucose-Anreicherung bis zu 195 %. Dies kann am ehesten als Stressreaktion der Tumorzellen interpretiert werden. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine Umverteilung von Transportproteinen von intrazellulären Lagern an die Zellmembran diskutiert. Experimente mit Mischungen aus Kontrollzellen und HSVtk-exprimierenden Zellen zeigen eine Abhängigkeit dieser Effekte von der Anzahl HSVtk-exprimierender Zellen. Die verminderte Anreicherung der synthetischen Aminosäure Aminoisobuttersäure und die verminderte Methionin-Anreicherung belegen eine Hemmung des Aminosäuretransportes und der Proteinsynthese unter Gancyclovirtherapie. Die verminderte Thymidinanreicherung spricht für einen Rückgang der DNA Synthese. Difluordeoxycytidin kann aufgrund seiner Affinität zur zelleigenen Thymidinkinase nicht als Stoffwechseltracer eingesetzt werden. Die gewonnenen in-vitro Daten belegen, daß mit der Positronen-Emissions-Tomographie und den verwendeten Stoffwechseltracern frühzeitig die Beurteilung einer veranschlagten Gancyclovirtherapie möglich wird.