

Schlussbericht für das Verbundprojekt

Gentherapie für die selektive Induktion von Apoptose durch TRAIL beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom

Zuwendungsempfänger: 01GU0611 Universität Heidelberg, Prof. Dr. Ingrid Herr (TP1)

Laufzeit: 01.10.2006 bis 31.12.2010

1. Aufgabenstellung und Zusammenfassung

Ziel des Verbundprojektes war die präklinische Etablierung einer Gen-Immuntherapie gegen das Prostatakarzinom. Der gentherapeutische Ansatz unter Verwendung von primären Lymphozyten, die mittels Lentiviren den tumorselektiven Todesliganden TRAIL überexprimierten, wurde von der Arbeitsgruppe I. Herr (TP1) durchgeführt. Die Kopplung der Lymphozyten an Tumorzellen, welche den Tumorstammzellmarker EpCAM überexprimierten wurde mithilfe des bispezifischen Antikörpers EpCAMxCD3 von der Arbeitsgruppe G. Moldenhauer (TP2) durchgeführt. Im letzten Teil des Projekts wurden beide therapeutischen Ansätze miteinander gekoppelt. Die Experimente wurden in sehr enger Zusammenarbeit der beiden Arbeitsgruppe durchgeführt und sind inzwischen publiziert bzw. zur Publikation eingereicht. Aufgrund eines Wechsels der AG I. Herr von der Urologie an die Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg, wurde der Ansatz nicht nur für das Prostatakarzinom, sondern auch für das Pankreaskarzinom etabliert. Dies hat sich angeboten, da das Europäische Pankreaszentrum an der Chirurgischen Universitätsklinik angesiedelt ist und ein großer Bedarf neuer Therapieoptionen für den aggressiven Bauchspeicheldrüsenkrebs besteht. Beide Tumorentitäten exprimieren das Zielgen EpCAM (ESA), das nach Antragstellung als Tumorstammzellmarker bekannt geworden war. Deshalb lag es nahe die Untersuchung der Wirkung der Gen-Immuntherapie auf die Tumorstammzellen als neuen Schwerpunkt mit in das Verbundprojekt aufzunehmen. Die zielgerichtete Eliminierung von Tumorstammzelle erscheint von großer Bedeutung, da nach der Theorie eine Therapie nur dann längerfristig das Tumorstammwachstum hemmen kann, wenn die therapieresistenten Tumorstammzellen angegriffen werden. In Subprojekt 1 des Klinikpartners wurde die Gentherapie erfolgreich etabliert. Hierzu wurden primäre Lymphozyten aus Blut isoliert und mit dem tumorselektiven Todesliganden TRAIL zur Verstärkung der Immunantwort transduziert. In Subprojekt 2 des DKFZ-Partners wurden die Lymphozyten mit dem bispezifischen Antikörper EpCAMxCD3 verknüpft, wodurch die Lymphozyten zielgerichtet hin zu EpCAM-positiven Tumorstammzellen gelenkt und diese effizient eliminiert werden konnten. Die Arbeiten von Subprojekt 2 ist als gemeinsame Publikation der beiden Antragsteller veröffentlicht (Salnikov et al., 2009). Eine zweite Publikation des Subprojekts 1 ist ebenfalls als gemeinsame Publikation der Antragsteller beim Fachjournal GUT (Kallifatidis 2009) veröffentlicht und eine dritte Publikation ist gerade bei "Cell Death and Differentiation" eingereicht. Weitere gemeinsame Publikationen der Antragsteller sind aufgrund der guten Zusammenarbeit im Rahmen des Verbundprojekts entstanden, welche jedoch nicht das Thema des Verbundprojekts behandeln - in diese Manuskripte ist die Expertise mit eingeflossen, welche im Rahmen des Verbundprojekts erworben wurde. Durch die beiden Haupt-Manuskripte ist belegt, dass die Antragsteller wie ursprünglich geplant die Gen-Immuntherapie erfolgreich in präklinischen Untersuchungen etablieren konnten. Es konnte gezeigt werden dass beide Einzeltherapien für sich eine Anti-Tumor Wirkung zeigen, dass jedoch die Kombination einen synergistischen Effekt zeigt. Im

Mausmodell konnten keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet werden. Deshalb könnte sich die Gen-Immuntherapie zur begleitenden Anwendung neben der konventionellen Tumortherapie beim Patienten eignen.

2. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse

2.1 Klonierung eines Tetrazyklin-induzierbaren lentiviralen Vektors zur Expression von TRAIL

In der Studie geplant war die Überexpression des Todesliganden TRAIL in zytotoxischen T Zellen, um dadurch selektiv Apoptose in Tumorzellen, nicht aber in normalen Zellen induzieren zu können. Um TRAIL effizient in Lymphozyten einzubringen und die Expression an- und abschaltbar zu machen, wurde Tet-regulierter lentiviraler Vektor verwendet. Dieser wurde für das Verbundprojekt modifiziert indem das Luziferasegen des Ursprungsvektors durch ein eGFP-TRAIL Fusionsgen ersetzt wurde. Damit kann das therapeutische Gen TRAIL zusammen mit dem Markergen eGFP exprimiert werden und transduzierte Lymphozyten fluoreszieren grün. Das Konstrukt hat sich in Expressionsstudien als geeignet für die Überexpression von TRAIL in Zielzellen erwiesen.

2.2 Transduktion humaner Lymphozyten mit lentiviralem TRAIL

Die Methode der lentiviralen Transduktion primärer Lymphozyten wurde erfolgreich etabliert. Da die Etablierung anfänglich schwierig war, hat eine Mitarbeiterin die Methodik im Labor von Prof. M. Grez im Georg-Speyer-Haus Frankfurt erlernt. Optimiert wurden die eingesetzte Virenzahl, der Zeitpunkt der Transduktion und die Zytokinzusammensetzung des Zellkulturmediums. Die Transduktionseffizienz konnte dadurch auf 75% gesteigert werden was sehr hoch bei primären Lymphozyten ist und ausreicht für eine erfolgreiche Überexpression von TRAIL in Lymphozyten. Die Wirksamkeit der hergestellten TRAIL-Viren wurde bei etablierten Zelllinien des Pankreas- und Prostakarzinoms in vitro und an 3D Modellen getestet, welche der Partner des SP1 etabliert hat. Zum Einsatz kamen FACS-Analysen, Apoptose-Assays, Antikörper-Arrays und Immunhistochemie.

2.3 Untersuchung der TRAIL-Gentherapie an Tumorxenografts auf der Maus

Um die Wirksamkeit der TRAIL-Lymphozyten auf Xenografttumoren zu testen wurden etablierte Zelllinien des Pankreas- und des Prostatakarzinoms subkutan auf immundefiziente Mäuse transplantiert. Durch Injektion der TRAIL-Lymphozyten wurde das Tumorwachstum reduziert. Durch RT-PCR Analysen der Genexpression in den Xenografttumoren wurde gefunden, dass TRAIL-Lymphozyten im Vergleich zu normalen Lymphozyten eine Vielzahl an Veränderungen in der Expression von pro- und anti-apoptotischen Genen hervorrufen.

2.4 Etablierung von Testmethoden zum Nachweis von Tumorstammzellmarkern

Um die Wirkung der Gen-Immuntherapie gegen Tumorstammzellen zu testen, war es notwendig die entsprechende Methodik zu etablieren. Wir haben daher Methoden zum Nachweis des Selbsterneuerungspotentials (Spheroïd- und Colony-forming Assay), der ALDH1-Aktivität und der Expression von Tumorstammzellmarkern (CD133, EpCAM/ESA, CD24, CD44) in Einfach- und Doppelfärbungen mittels Immunhistochemie und Detektion in der FACS-Analyse oder in der Fluoreszenz-Mikroskopie etabliert. Diese Methoden haben wir zusammen mit dem Nachweis der