

Onkolytische Viren im Einsatz gegen Tumor(stamm)zellen



Quelle: MedIDesign Frank Geisler, Berlin

Viren haben keinen guten Ruf. Sie zählen zu den größten Geißeln der Menschheit, weil die durch sie ausgelösten Erkrankungen zumeist schwer zu therapieren und sie damit für Millionen von Todesfällen jedes Jahr verantwortlich sind. Darüber hinaus sind Viren selbst höchst spezifisch, widerstands- und anpassungsfähig und können sich in ihren Wirtszellen verstecken, bis diese in der Regel von ihnen zerstört werden.

Doch so wie es aussieht, könnte sich der Ruf zumindest einiger Viren in Zukunft deutlich verbessern. Denn gerade ihr lytisches Potenzial für humane Zellen im Verlauf ihres viralen Vermehrungszyklus wollen sich Wissenschaftler im Kampf gegen Krebs zunutze machen. Untersuchungen laufen weltweit mit verschiedenen Viren, die auf ihre Wirkung gegen Darm-, Brust-, Leber-, Prostata- und/Hirntumoren erforscht werden. Zudem besitzen onkolytische Viren im Gegensatz zu gängigen Tumorthérapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie für Prof. Christian J. Buchholz, Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie und Gentherapie des Paul-Ehrlich-Instituts in Langen, einen besonderen Vorteil: „Da onkolytische Viren sich in den von ihnen infizierten Tumorzellen vermehren, erreichen wir durch sie quasi eine Vervielfältigung des Wirkstoffs

im Tumor selbst.“ Dies könnte im besten Fall bei einmaliger Anwendung eine sich selbst verstärkende, antitumorale Wirkkaskade auslösen. Zusätzlich macht der Molekularbiologe darauf aufmerksam, dass bei der Zerstörung von Tumorzellen durch onkolytische Viren gleichzeitig das Immunsystem auf die dabei freigesetzten Tumorantigene aufmerksam gemacht wird.

„Onkolytische Viren bieten damit zwei große Vorteile im Gegensatz zu herkömmlichen Tumorthérapien“, fasst Buchholz zusammen. „Zum einen zerstören sie im Zuge ihres Vermehrungszyklus ihre Wirtstumorzelle und infizieren eine Vielzahl weiterer Tumorzellen und zum zweiten triggern sie letztlich noch eine Immunantwort durch die Freisetzung von Tumorantigenen.“

In seiner Arbeitsgruppe beschäftigen sich Buchholz und Kollegen mit dem Masernvirus, genauer mit bestimmten Masern-Lebendimpfstoffstämmen. Diese attenuierten Masernviren nutzen für die Infektion das membranständige Oberflächenprotein CD46 als Andockstelle, das an der Oberfläche von Tumoren in höherer Konzentration exprimiert wird als an gesunden Zellen [1]. „Somit können die verwendeten Masernvirusstämme gezielt Tumorzellen angreifen“, erklärt Buchholz, „und das, ohne größere Gefährdungen für normale Zellen.“

von
Dr. Eva A. Schulte

Der Molekularbiologe ist mit seinen Kollegen aber noch einen Schritt weiter gegangen, da „ein großes Problem für eine langfristig erfolgreiche Tumorthherapie häufig die sogenannten Tumorstammzellen sind“, wie Buchholz ausführt.

Krebsstammzellen spezifisch ausschalten

Krebs- oder Tumorstammzellen (CSC, engl. cancer stem cells) werden für die Genese, Proliferation, Rezidivierung und/oder Metastasierung von Tumoren verantwortlich gemacht [2]. Sie sind normalen, zum Beispiel hämatopoetischen Stammzellen in vielen ihrer Eigenschaften ähnlich, da CSC auch über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie ein hohes Proliferationspotenzial und Differenzierungsvermögen verfügen.

Im Gegensatz zu normalen Stammzellen stehen diese Fähigkeiten aber nicht (mehr) unter der Regulation diverser Wachstumsstimuli, sondern laufen dereguliert ab: Das Resultat ist die Entwicklung eines unkontrollierten Zell- und damit Tumorstammwachstums.

Erschwerend kommt hinzu, dass sich CSC häufig resistent gegenüber konventionellen Tumorthérapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie zeigen [3,4]. Zu den Mechanismen, mit denen sich CSC den gängigen Therapien entziehen können, gehören Resistenzen gegenüber Apoptosestimuli, hohe Expressionsraten von Transportmolekülen, die auch für den Abtransport von Arzneistoffen genutzt werden (z.B. ABC-Transporter), effiziente DNA-Reparaturmechanismen sowie die differenzierte Expression und Phosphorylierung verschiedenster Kinasen zum Schutz gegen das körpereigene Immunsystem [5].

Bis jetzt bestand eine Therapie gegen CSC vor allem in einer Dosiserhöhung und/oder Neukombination verschiedener zytotoxischer Krebsmedikamente, durch die in der Regel aber nur eine minimale Verbesserung bei den Überlebensraten mit deutlich gesteigerter Toxizität für den Organismus beobachtet wurde [6]. Dies kann besonders bei pädiatrischen Tumoren dramatische Folgen für den sich noch entwickelnden Organismus von Kindern und Jugendlichen haben. Aus diesem Grund sind CSC ein wichtiges therapeutisches Ziel bei der Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden gegen Krebs bei Kindern, aber natürlich auch bei Erwachsenen.

Auch die Wissenschaftler vom Paul-Ehrlich-Institut haben die CSC im Visier. „Uns ist es gelungen, Masernviren zu designen, die für ihre Infektion den Oberflächenmarker CD133 benötigen“, erklärt Buchholz. CD133 ist einer der Oberflächenmarker, mit denen CSC identifiziert werden können [7]. In ihren Untersuchungen gelang es der Arbeitsgruppe aus Langen, spezifisch CD133-positive Tumorzellen in einem Mausmodell mit onkolytischen Masernviren zu eliminieren [8]. Damit verbindet sich die Hoffnung, in der Zukunft auch im Menschen CD133-positive Tumorzellen und besonders CSC ausschalten zu können.

Herpesviren gegen Hirntumoren

Diese Hoffnung teilt auch Dr. Gregory Friedman von der Universität Alabama, Birmingham USA, der onkolytische Herpes-simplex-1-Viren (oHSV) unter anderem im Einsatz gegen hochmaligne Formen von Hirntumoren, Glioblastoma multiforme (GBM), untersucht [9]. Die Überlebensraten bei GBM liegen bei Erwachsenen und Kindern bei weniger als 20 Prozent [10], was vor allem auf die glialen Krebsstammzellen (gCSC) zurückzuführen ist. Diese möchte Friedman mithilfe von oHSV gezielt ausschalten.

„Eine onkolytische Virustherapie verhält sich dabei zu einer Chemotherapie wie ein zielgerichteter Marschflugkörper zu einer Atom Bombe“, verdeutlicht Friedman die Vorteile einer viralen Tumorthérapie. „Mithilfe der Viren können Krebszellen und vor allem Krebsstammzellen spezifisch anvisiert und ausgeschaltet werden, was weniger toxische Nebeneffekte für den Patienten bedeutet.“ Oder, um im Bild zu bleiben, weniger Kollateralschäden. Und gerade diese unerwünschten toxischen Nebeneffekte können für den menschlichen Organismus in jedem Lebensalter dramatische Folgen haben. Diese hofft Friedman mit seinen Forschungen in der Zukunft deutlich zu minimieren.

Zu den Vorteilen des oHSV für eine Tumor- und CSC-Thérapie gehört unter anderem, dass der lytische Zyklus des oHSV nicht vom Zellzyklus der Wirtszelle abhängig ist. Dadurch ist es oHSV möglich, typische Mechanismen der gCSC zu umgehen, mit denen sich diese Stammzellen vor der Zerstörung durch Chemotherapie oder Bestrahlung schützen. Ein weiterer Vorteil des oHSV ist, dass es sich um ein neurotropes Virus handelt, das sich grund-

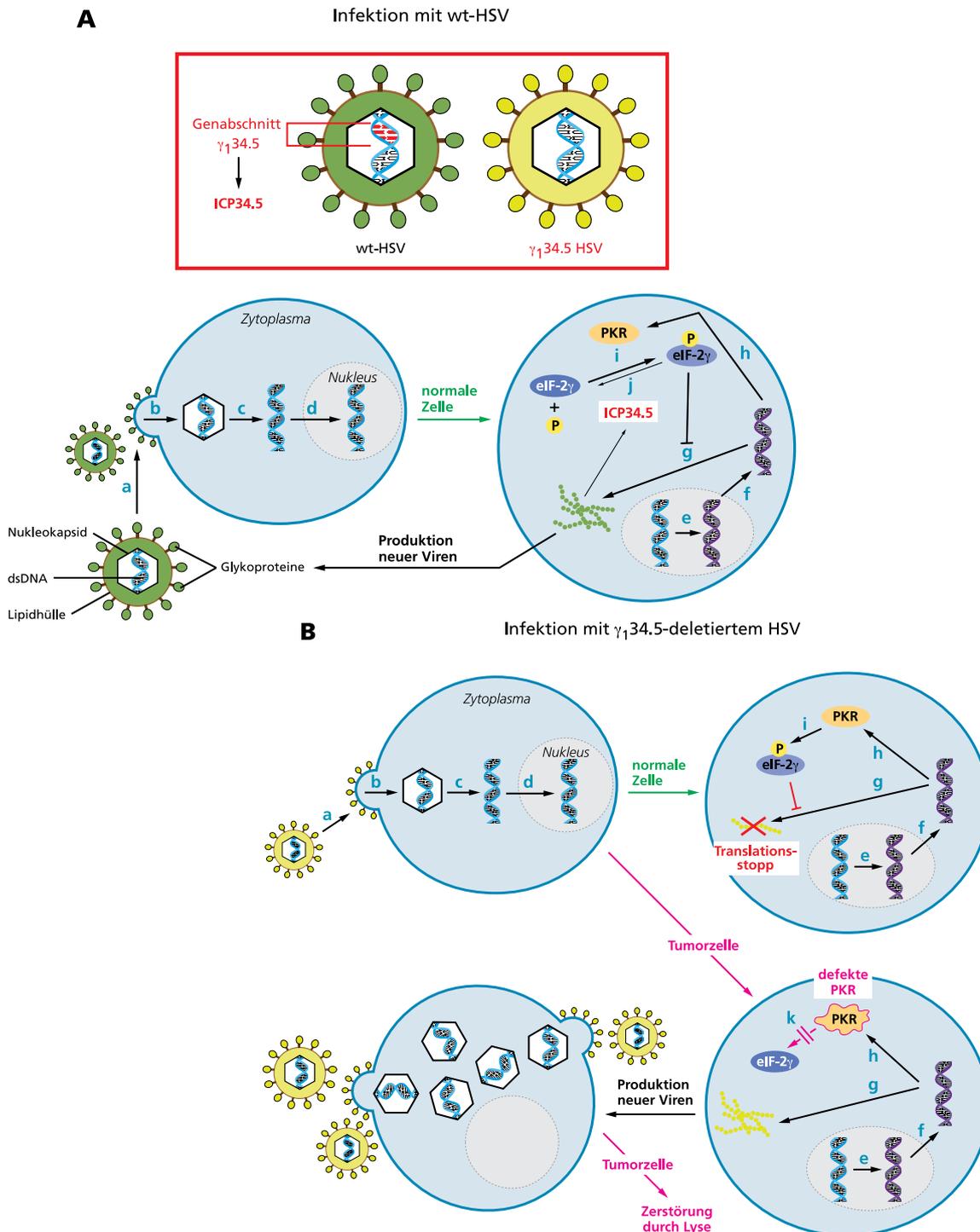
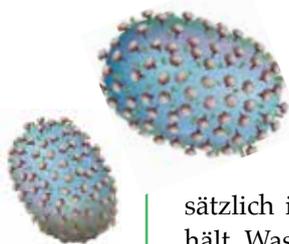


Abbildung: Schematische Darstellung der zellulären Vorgänge in einer gesunden Zelle nach einer Infektion mit HSV-1

(A) im Vergleich zu den zellulären Vorgängen in einer normalen und einer Tumorzelle nach einer Infektion mit einem $\gamma_{134.5}$ -mutierten HSV (B)

Quelle: Erika Heil/ art for biomed, modifiziert nach [9]

- Infektion mit Herpes-simplex-1-Virus (HSV), entweder mit Wildtyp HSV (A) oder mit $\gamma_{134.5}$ -mutiertem HSV (B)
- Fusion der viralen Lipidhülle mit der Plasmamembran
- Nukleokapsid setzt virale, doppelsträngige DNA (vdsDNA) frei
- vdsDNA gelangt in den Zellkern
- vdsDNA wird zu viraler, doppelsträngiger (vds) RNA transkribiert
- vdsRNA verlässt Zellkern
- Translation von vdsRNA; Synthese viraler Proteine darunter ICP34.5
- vdsRNA aktiviert PKR
- PKR stoppt über Phosphorylierung von eukaryotischen Initiationsfaktor-2 γ (eIF-2 γ) die Proteinbiosynthese; Produktion neuer Viruspartikel wird gestoppt
- ICP34.5 sorgt für Dephosphorylierung von eIF-2 γ und damit für eine Produktion viraler Proteine
- PKR durch Mutationen inaktiviert, Phosphorylierung von eIF-2 γ entfällt, Produktion neuer Viruspartikel mit anschließender Lyse der Tumorzelle läuft ungehindert ab



sätzlich in Nervenbahnen und Neuronen aufhält. Was aber nicht bedeutet, dass oHSV nicht auch gegen andere Tumoren eingesetzt werden kann. Schließlich „haben oHSV auch vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien zu soliden Tumoren außerhalb des Zentralnervensystems gezeigt“, betont Friedman. „Und gegenwärtig werden Probanden für Phase-I-Studien mit Brust- oder Hautkrebs rekrutiert“ [11]. Womit der Wissenschaftler auf einen weiteren interessanten Aspekt einer viralen Tumorthherapie eingeht – Viren sind im Körper vielfach einsetzbar. „Es ist durchaus denkbar“, so Friedman, „dass in der Zukunft einige wenige Viren allein oder auch in Kombination gegen eine Vielzahl durchaus unterschiedlichster Tumoren eingesetzt werden könnten.“

Eine Idee, die auch Buchholz für realisierbar hält. Dies sei allerdings derzeit noch Zukunftsmusik, da zunächst einmal Vorteile, Nutzen und Grenzen einzelner Viren im Kampf gegen unterschiedliche Tumoren untersucht werden müssten.

Zelluläre Schwächen von Tumorzellen ausnutzen

Beim oHSV sieht Friedmann einen großen Nutzen in dem genetisch relativ leicht zu modifizierenden 152 kb (Kilobasen) großen Genom des Virus: „Die Neurovirulenz eines HS-Virus wird durch das $\gamma_134.5$ -Gen verursacht, dessen Deletion aber weder die Infektions- noch die Replikationsfähigkeit des Virus vermindert“ [12]. Vielmehr scheint die Deletion bestimmter HSV-Gene, wie des $\gamma_134.5$ -Neurovirulenz-Gens, die virale Replikation in gCSC sogar zu fördern [13]. Dies liegt daran, dass das 263 Aminosäuren große Genprodukt ICP34.5 (infected cell protein) des $\gamma_134.5$ -Gens neben der Neurovirulenz von HSV-1 auch dafür verantwortlich ist, zelleigene Verteidigungsmechanismen gegen virale Infektionen zu umgehen.

Ein solcher Schutzmechanismus der Wirtszelle ist in einer normalen Zelle zum Beispiel ein Proteinkinase-R (PKR)-vermittelter Translationsstopp, der durch Bindung der PKR an doppelsträngige (ds)RNA-Transkripte (des Virus) aktiviert wird (Abbildung Seite 22) [14]. Solche dsRNA-Transkripte werden normalerweise von HSV-1 für seine Proteinbiosynthese in einer Wirtszelle produziert. Bindet die PKR an dsRNA-Transkripte, wird durch Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors-2 γ (eIF-2 γ) durch die PKR die Proteinbiosynthese

gestoppt und die Produktion viraler Proteine eingestellt [15]. ICP 34.5 in Wildtyp-HSV (wt-HSV) umgeht diese PKR-vermittelte Virusabwehr, indem es wichtige Proteine wie eIF-2 γ wieder dephosphoryliert und somit eine virale Proteinbiosynthese ermöglicht [15]. $\gamma_134.5$ deletierte oHSV können dies nicht mehr, wodurch die virale Replikation in normalen Zellen mit funktionierender PKR limitiert wird [16]. Da bei Tumorzellen und gCSC die PKR aber häufig defekt ist [17], können sich diese Zellen nicht vor einem viralen Angriff durch oHSV schützen. Neue oHSV-Viruspartikel werden produziert und weitere Tumor(stamm)zellen werden letztlich durch Lyse zerstört.

Somit sind mutierte oHSV mit einer $\gamma_134.5$ -Deletion für normale Zellen ungefährlich, für Tumorzellen aber so tödlich wie wt-HSV für normale Zellen. Prinzipiell ähnlich funktioniert auch der Ansatz mit den attenuierten Masernvirusstämmen der Arbeitsgruppe von Buchholz. Auch hier nutzt man eine Schwäche der Tumorzellen aus: Während normale Zellen zumeist durch Immunität vor Masernviren geschützt sind, haben Tumorzellen diesen Schutz häufig verloren und sind damit leichte Beute für entsprechende Masernviren.

Genetisches Tuning für Schutz oder größere Wirkung

Alle onkolytischen Viren haben zudem den Vorteil, dass sie ohne größeren Aufwand genetisch optimiert werden können, in dem man zum Beispiel Mechanismen einbaut, um sie zu eliminieren, falls sie selbst toxische Effekte vermitteln sollten. Dies ist zum Beispiel bei oHSV G207 der Fall, das neben einer Deletion in beiden Kopien des $\gamma_134.5$ -Gens (HSV sind doppelsträngige DNA-Viren) noch eine Mutation aufweist, die es besonders sensitiv gegenüber dem Virostatikum Aciclovir macht. Sollte es also bei einer oHSV-G207-Therapie wider Erwarten zu Toxizitäten durch das Virus kommen, könnte es aufgrund seines genetischen Tunings effektiv mit dem Virostatikum ausgeschaltet werden.

Zusammen mit HSV1716, das ebenfalls keine $\gamma_134.5$ -Kopie mehr besitzt, wurde G207 in einer Phase-I-Studie bei Erwachsenen mit wiederkehrenden GBM erfolgreich eingesetzt [18].

HSV1716 befindet sich derzeit bereits in einer klinischen Studie zu wiederkehrenden soliden Tumoren außerhalb des Zentralnervensystems bei Kindern älter als sieben Jahre [19].

Genetisches Tuning kann auch so aussehen, dass das Virus bestimmte Zytokine produziert, die eine zusätzliche Immunantwort gegen die Tumorzelle stimulieren, oder spezifische Enzyme, welche die Mikroumgebung des Tumors beeinträchtigen. Ersteres ist bei dem oHSV OncoVEX GM-CSF der Fall, das bereits in einer Phase-III-Studie gegen metastasierende Melanome untersucht wird [20]. Das rekombinante HS-Virus kodiert für den humanen Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), durch den das Immunsystem zusätzlich stimuliert werden soll.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse stellen sowohl Friedman als auch Buchholz klar, dass es noch eine Menge zu tun gibt: „Unsere nächsten Schritte sollten sich vor allem darauf konzentrieren herauszufinden, welche Tumoren am besten auf welche Viren reagieren.“ Zudem gäbe es im Bezug auf Dosierung und Verabreichung der onkolytischen Viren noch eine Vielzahl von Fragen zu klären. Gerade in Bezug auf die Verabreichung der Viren sehen beide Wissenschaftler noch großen Bedarf, da sowohl gegen Masern- wie auch Herpesviren eine hohe Immunität in der Bevölkerung herrscht. Eine Verabreichung über die Blutbahn ist derzeit somit nur eingeschränkt möglich, da die onkolytischen Viren frühzeitig vom Immunsystem erkannt und vernichtet würden. „Hier müssen wir unbedingt einen Weg finden“, unterstreicht Friedmann seine Forschungsziele für die nächsten Jahre. Doch trotz dieser Hürden sehen er und sein deutscher Kollege Buchholz großes Potenzial für die onkolytischen Viren.

Literatur

- Russell SJ et al.: Measles virus for cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 2330: 2213-2241
- Shiozawa Y et al.: Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(2): 285-293
- Vlashi E et al.: Radiation responses of cancer stem cells. *J Cell Biochem.* 2009; 108(2): 339-342
- Rich JN et al.: Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(4): 353-355
- Friedman GK et al.: Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancers (Basel).* 2011; 3(1): 298-318
- Friedman GK et al.: Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res.* 2012; 71(4 Pt 2): 500-510
- Dimov I: Glioblastoma multiforme stem cells. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11: 930-958
- Bach P et al.: Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2013; 73(2): 865-874
- Friedman GK et al.: Pediatric glioma stem cells: biologic strategies for oncolytic HSV virotherapy. *Front Oncol.* 2013; 3: 28
- Cohen KJ et al.: Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol.* 2011; 13(3): 317-323
- <http://clinicaltrials.gov>, Identifizierungsnummer NCT01017185
- Shah AC et al.: Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2003; 65(3): 203-226
- Markert JM et al.: Reduction and elimination of encephalitis in an experimental glioma therapy model with attenuated herpes simplex mutants that retain susceptibility to acyclovir. *Neurosurgery.* 1993; 32(4): 597-603
- Williams BR: Signal integration via PKR. *Sci STKE.* 2001; 2001(89)
- He B et al.: The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(3): 843-848
- Shah AC et al.: Enhanced antiglioma activity of chimeric HCMV/HSV-1 oncolytic viruses. *Gene Ther.* 2007; 14(13): 1045-1054
- Smith K et al.: Activated MEK suppresses activation of PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by $\Delta\gamma(1)34.5$ mutants of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 2006; 80: 1110-1120
- Markert JM et al.: Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther.* 2009; 17(1): 199-207
- <http://clinicaltrials.gov>, Identifizierungsnummer NCT00931931
- <http://clinicaltrials.gov>, Identifizierungsnummer NCT00769704

