

Aus der Neurochirurgischen Klinik der  
**Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Wolfgang Joachim Bock

---

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von F98 Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* nach stabiler Transduktion mit cDNA für humanen Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF $\alpha$ )

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Tim Uhden**

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Sabel

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Christof Kramm

Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organisation
AAV	Adeno Assoziiertes Virus
HSV-1/2	Herpes Simplex Virus Typ 1/2
LTR	Long Terminal Repeat
(h)TNF $\alpha$	(humaner) Tumor Nekrose Faktor Alpha
TNFR-1/2	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Typ 1/2
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNS	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
Kb	Kilobase(n)
Bp	Basenpaar(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
F98-hTNF $\alpha$	hTNF $\alpha$ exprimierender Vektor pWG29-del170hTNF $\alpha$ Klon 1
F98-pWG	Leervektor pWG29-del170
F98-WT	F98-Wildtyp
OD	Optische Dichte

<b>1</b>	<b><i>Vorwort und Problemstellung</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Inzidenz und Prognose maligner Gliome</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Therapie der Gliome</b> .....	<b>8</b>
1.2.1	Chirurgische Resektion .....	8
1.2.2	Postoperative Bestrahlung .....	8
1.2.3	Chemotherapie .....	9
1.2.4	Gentherapie .....	9
1.2.5	Vektorsysteme.....	12
1.2.5.1	Vektoren, auf RNS-Viren basierend.....	12
1.2.5.1.1	<i>Retrovirale Vektoren</i> .....	12
1.2.5.2	Vektoren, auf DNS-Viren basierend.....	14
1.2.5.2.1	<i>Adenoviren</i> .....	14
1.2.5.2.2	<i>Adeno-Associated-Virus</i> .....	15
1.2.5.2.3	<i>Herpes Simplex Virus 1</i> .....	16
<b>1.3</b>	<b>Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF<math>\alpha</math>)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>F98 Tumor Modell</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Hintergrund der vorliegenden Untersuchung</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Versuchsbedingungen</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	Versuchstiere .....	21
2.1.2	Versuchstierhaltung.....	21
2.1.3	Anlage des Bohrloches und Durchführung der Zellimplantation.....	22
<b>2.2</b>	<b>Verwendete Materialien und Geräte</b> .....	<b>22</b>
2.2.1	Laborgeräte .....	22
2.2.2	Plastikwaren und sonstige Einwegartikel .....	23
2.2.3	Chemikalien .....	23
2.2.4	Zellkulturmedien und Zusätze für eukaryotische Zellkulturen .....	24
2.2.5	Molekularbiologische Kits .....	25
2.2.6	Primer.....	25
2.2.7	ELISA .....	25
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Arbeiten</b> .....	<b>25</b>
2.3.1	Zelllinien .....	25
2.3.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	26
2.3.3	Anzucht der Zellen .....	26
2.3.4	Einfrieren der Zellen .....	26
2.3.5	Auftauen der Zellen.....	27
2.3.6	Aufbereiten der Zellen .....	27
2.3.7	Zellproliferation-Test (MTT-Test) .....	27
2.3.8	TNF $\alpha$ –Bioassay.....	28
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b> .....	<b>28</b>
2.4.1	RNS-Isolierung .....	28
2.4.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	29
2.4.3	cDNS-Synthese .....	29
<b>2.4.4</b>	<b>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</b> .....	<b>30</b>
2.4.5	Nukleinsäurechromatographie.....	31
2.4.5.1	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarosegelen</i> .....	31
<b>2.5</b>	<b>Färbungen</b> .....	<b>31</b>
2.5.1	Hämalaun-Eosin-Färbung .....	31
<b>2.6</b>	<b>Proteinchemische Arbeiten</b> .....	<b>31</b>
2.6.1	Zytokinnachweis durch ELISA .....	31
2.6.2	Proteinbestimmung und TNF $\alpha$ -ELISA im MDC-Berlin .....	32
<b>2.7</b>	<b>Bestimmung der durchschnittlichen Tumorfläche</b> .....	<b>33</b>

<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der in vitro Versuche</b> .....	<b>34</b>
3.1.1	Verifizierung des Transfektionserfolges .....	34
3.1.1.1	PCR.....	34
3.1.1.2	ELISA.....	35
3.1.2	Zellproliferation-Test (MTT-Test) .....	36
3.1.3	TNF $\alpha$ -Bioassay .....	36
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der in vivo Versuche</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Tierversuche.....	38
3.2.2	TumorgroÙe.....	38
3.2.3	ELISA .....	39
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b><i>Literatur</i></b> .....	<b>50</b>
<b>6</b>	<b><i>Tabellenanhang</i></b> .....	<b>56</b>

## 1 Vorwort und Problemstellung

### 1.1 Inzidenz und Prognose maligner Gliome

Die Inzidenz bösartiger Tumore der Glia, sogenannter maligner Gliome (Anaplastische Gliome WHO Grad III und Glioblastome WHO Grad IV) beträgt in den westlichen Industrienationen etwa 6/100.000 Einwohner pro Jahr. Der Anteil maligner Gliome an allen Krebsarten liegt somit aktuell bei ca. zwei Prozent, wobei die Häufigkeit dieser Tumore zunimmt [1]. Der bedauerlicherweise häufigste, weil gleichzeitig bösartigste hirneigene Tumor, ist das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV). Die Zusatzbezeichnung *multiforme* bezieht sich hierbei auf das durch Einblutungen und Nekrosen gekennzeichnete „bunte“ Bild der Tumorschnittfläche. Entsprechend der malignen Wachstumstendenz dieser Tumore ist die Anamnesedauer bei Glioblastomen meist sehr kurz. Mit einer mittleren Überlebenszeit von ungefähr 11 Monaten trotz maximaler Therapie gehört dieser Tumor zu den bösartigsten Tumoren des Menschen überhaupt. Glioblastome kommen mit deutlicher Bevorzugung der Männer ab dem mittleren Lebensalter bis hin zum Greisenalter vor (Häufigkeitsgipfel 45.-55. Lebensjahr). Sie wachsen praktisch immer im Großhirn mit einer gewissen Präferenz der vorderen Hirnabschnitte, gelegentlich multifokal. Demgegenüber unterscheiden sich Anaplastische Astrozytome, Anaplastische Oligodendrogliome und Anaplastische Oligoastrozytome (WHO Grad III) zwar bezüglich der längeren Überlebenszeit von immerhin 3-5 Jahren vom Glioblastoma multiforme, sind jedoch ebenfalls bis heute unheilbare Tumore. Die multimodale Standardtherapie maligner Gliome umfasst die möglichst radikale Tumoresektion mit anschließender Bestrahlung. Trotz einer optimierten interdisziplinären Therapie mit Verbesserung der Früherkennung und der Operationsplanung, der Neueinführung und Optimierung bildgebender Verfahren, Einführung mikrochirurgischer Operationstechniken, Einführung der Neuronavigation sowie Optimierung und Etablierung neuer Bestrahlungstechniken hat sich leider keine wesentliche Verlängerung der Überlebenszeit ergeben [2]; [3]. Selbst aggressives Vorgehen mit Tumoresektion im Gesunden und anschließender hochdosierter Radiatio hat bisher zu keiner signifikanten Verbesserung der Lebenserwartung, bei allerdings erheblicher Einschränkung der Lebensqualität, Morbidität und sogar Mortalität geführt.

Im Wesentlichen erklärt sich diese ausgesprochen schlechte Prognose durch die Fähigkeit der Gliomzellen zur aktiven Migration und Invasion [4]. Dies führt in aller Regel zu einer diffusen Infiltration des umliegenden funktionellen Hirngewebes, aber durchaus auch wesentlich weiter entfernter Hirnregionen (Abb. 1).

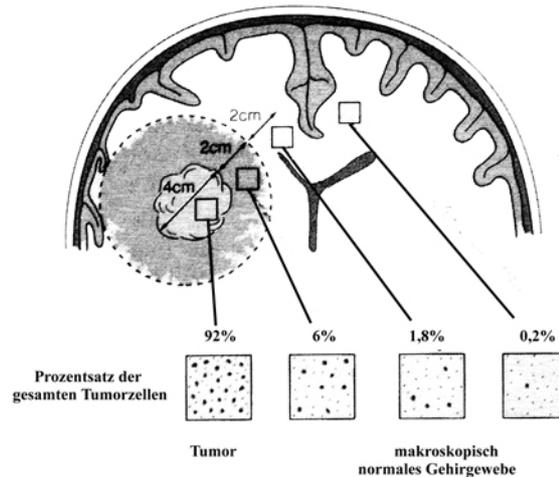


Abb.1: Darstellung der Infiltration des umliegenden Hirngewebes durch Tumorzellen maligner Gliome. Beachte, daß 8% der Tumorzellen in makroskopisch unauffälligem Hirngewebe vorliegen. Abb. modifiziert nach Enam et al. 1998.

Nicht selten kommt es zur schmetterlingsförmigen Ausbreitung über den Balken (Corpus callosum) auf die balkennahen Regionen der kontralateralen Hemisphäre. Als weitere Ausbreitungswege dienen die Capsula interna, Commissura anterior, die Radiatio optica oder perivaskuläre Räume. Eine Infiltration der Gefäßlumina oder des Subarachnoidalraumes ist ausgesprochen selten.

Die Problematik einer erfolgversprechenden Therapie ergibt sich nun aus der herausragenden Stellung und der hohen Funktionalität des Gehirns. So ist eine großzügige Resektion, bei der mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand im Gesunden reseziert wird, im Rahmen der Hirntumorchirurgie nicht möglich. Insbesondere in eloquenten Hirnregionen muß die umgebende Infiltrationszone des Tumors, die noch aus funktionellem Nervengewebe besteht und radiologisch als perifokales Ödem imponiert, zur Verhinderung zusätzlicher, eventuell verheerender postoperativer Defizite unbedingt geschont werden. Diese Maßregel gilt im Übrigen nicht nur für den operativen Eingriff, sondern gleichwohl für die sich in der Regel postoperativ anschließende Bestrahlung.

Folglich sind maligne Gliome zwar lokale Tumore, die aber aufgrund ihres infiltrativen und mikroinvasiven Wachstums nicht in toto operativ entfernt werden können. Eine systemische Therapie der Gliome, wie sie zum Beispiel für Leukämien, Lymphome oder Keimzelltumoren mittels Chemotherapie erfolgreich durchgeführt wird, existiert bisher nicht. Hieraus ergibt sich das Interesse an der Suche sowie der Etablierung neuer therapeutischer Strategien.

### 1.2 Therapie der Gliome

#### 1.2.1 Chirurgische Resektion

Grundlage der bereits oben erwähnten multimodalen Therapie bei Gliomen ist die neurochirurgische Resektion [5] mit einer möglichst vollständigen Entfernung des Tumors. Eine kurative Resektion in Abhängigkeit von der Lokalisation ist, wie schon gesagt, nur bei nicht infiltrativ wachsenden Gliomen des WHO Grades I, wie z.B. dem Pilozytischen Astrozytom, nicht jedoch bei diffusen Gliomen (WHO Grad II, III und IV), möglich. Ziel der neurochirurgischen Resektion bei malignen Gliomen sollte eine Verlängerung der Überlebenszeit bei gleichzeitig erhaltener guter Lebensqualität sein.

Beim Glioblastom werden allerdings durch alleinige Operation ohne adjuvante Radio- und/oder Chemotherapie mediane Überlebenszeiten nach Diagnosestellung von lediglich 3-4 Monaten erreicht. Nach heutiger Auffassung wird auch beim Rezidiv eines malignen Glioms und insbesondere bei jüngeren Patienten in gutem klinischem Zustand zu einer erneuten Operation geraten. Die Komplikationsrate des Eingriffs variiert je nach Operationszentrum und wird, bezüglich der Resektion von supratentoriellen Gliomen, in einer Studie mit einer Morbidität von 32% und einer Mortalität von 3% angegeben [6].

#### 1.2.2 Postoperative Bestrahlung

Bestrahlt werden alle Tumoren der WHO-Grade III und IV. Die Indikationsstellung zur Strahlentherapie der Gliome des WHO Grades II wird hingegen immer noch kontrovers diskutiert [7]. Ziel der konventionellen externen Herd- oder Ganzschädelbestrahlung ist die möglichst selektive Tumorzellschädigung durch Erzeugung eines differentiellen Effekts mittels Fraktionierung. Die Bestrahlung erfolgt entweder unter Einbeziehung des gesamten Gehirns und einer zusätzlichen Herd-Dosis oder durch Fokussierung auf das Tumorfeld allein. Die Bestrahlung wird in Einzelfractionen von 1,8-2 Gy pro Tag, etwa 5 mal pro Woche bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy durchgeführt [8]. Nebenwirkungen der Strahlentherapie umfassen akute Strahlenreaktionen wie Kopfschmerz, Müdigkeit, Übelkeit, Alopezie und Epithelschäden sowie das Risiko des Auftretens von Spätschäden in Form von Leukoencephalopathien, Verschlechterung des neurologischen Zustandes, Strahlennekrosen, Kataraktbildung, Myelopathien und nicht zuletzt der Induktion von Zweitumoren.

Durch die postoperative Bestrahlung erhöhen sich, wie bei allen aktuell anwendbaren Therapiekonzepten, bestenfalls die Überlebenszeit sowie die Lebensqualität. Eine Heilung ist auch durch diese Maßnahme nicht möglich.

### 1.2.3 Chemotherapie

Zwar hat sich die Behandlung maligner Gliome mit Nitrosoharnstoffen als Standard in der adjuvanten Behandlung dieser besonders bösartigen Tumore etabliert [9] [10], eine wesentliche Verlängerung der mittleren Überlebenszeit bei Patienten mit Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) und Anaplastischen Astrozytomen konnte hierdurch allerdings nicht erreicht werden. Interessant ist jedoch eine deutliche Steigerung individueller Überlebenszeiten, was ein individuelles Ansprechen auf die Nitrosoharnstofftherapie impliziert [11].

Aufgrund der insgesamt jedoch sehr schlechten Ergebnisse der Monotherapien wurde die Suche nach polychemotherapeutischen Behandlungsschemata intensiviert. Die Einführung der Kombinationschemotherapie mit Procarbazine, Lomustine und Vincristine (PCV) führte zu mäßigen, im Vergleich zu nicht therapierten Patienten allerdings überlegenen Ergebnissen bei der Behandlung des Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) und Anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III). In der Gruppe der Anaplastischen Oligodendrogliome (WHO Grad III) und Anaplastischen Oligoastrozytome (WHO Grad III) sprechen circa zwei Drittel der Tumore auf diese Therapie an [12-14]. Nichtsdestotrotz hat auch die Anwendung von Polychemotherapieschemata bei der Behandlung von malignen Gliomen lediglich adjuvanten Charakter.

### 1.2.4 Gentherapie

Die Grundlage für die Hoffnung, in der Gentherapie ein theoretisch erfolgsversprechendes und zukunftsträchtiges therapeutisches Mittel im Kampf gegen zahlreiche bisher unheilbare Krankheiten gefunden zu haben, bildet die Erkenntnis, daß eben viele dieser menschlichen Erkrankungen genetischen Ursprungs sind. Kleinste Veränderungen des Genoms in Form von Deletionen, Mutationen, Translokationen oder gar Allel-Verlust können zu erheblichen und nicht selten zwangsläufig zum Tode führenden Funktionsstörungen führen. Daraus ergibt sich ein wachsendes Interesse an der Vorstellung, mit Hilfe der Gentherapie, das heißt durch Transfer genetischen Materials, in aller Regel DNS, die aus diesen kleinsten Veränderungen des menschlichen Genoms resultierenden schweren Krankheitsbilder kausal behandeln zu können. Der Vorgang der Insertion von DNS wird mit dem Begriff „*Transfektion*“, das inserierte Gen als „*Transgen*“ bezeichnet. Die Palette der therapeutischen Möglichkeiten reicht von der Korrektur hereditärer Erkrankungen wie z.B. Cystischer Fibrose, LDL-Rezeptor Mangel, Hämophilie A und B, Sichelzellanämie oder Phenylketonurie und der

Bekämpfung erworbener viraler Erkrankungen wie z.B. AIDS, bis hin zur der Verlangsamung des Wachstums von Tumoren oder dem Aufhalten neurodegenerativer Erkrankungen. Besonders bei der Behandlung von bestimmten Tumoren des Gehirns, die, wie oben beschrieben, trotz maximaler Ausschöpfung aller aktuell zu Verfügung stehenden therapeutischen Optionen nicht kurativ behandelt werden können [15], verspricht die Genterapie bisher ungeahnte therapeutische Möglichkeiten. Bezüglich der Behandlung von Tumoren des Gehirns lassen sich die Therapieregime in fünf Kategorien einteilen:

1. Suizid-Gen-Therapie (*gene-directed enzyme prodrug therapy*): Die Grundidee ist der Versuch, selektiv ein Gen in eine Tumorzelle einzuschleusen, was die Zelle vulnerabel gegenüber einem bestimmten Medikament macht, das normalerweise auf die betreffende Zelle keinen Einfluß hätte. Die bekanntesten klinischen Untersuchungen wurden mit murinen Zellen durchgeführt, die einen retroviralen Vektor enthielten, der für die *Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase* (HSV-TK) kodierte. Diese Zellen wurden intrakraniell platziert, die Patienten anschließend systemisch mit dem antiviralen Medikament Ganciclovir behandelt. Die *Thymidin Kinase* phosphoryliert das Ganciclovir, was zur Bildung eines toxischen Nukleotid Analogons führt, das dann die Funktion der *DNS-Polymerase* blockiert. Dies führt zwangsläufig zum Tod der Zelle, sobald sie im Rahmen des Zellzyklus die Phase der DNS-Synthese erreicht [15].

2. Strategien, die die Immunantwort gegen Tumorzellen verstärken: Tumorzellen werden *in vitro* kultiviert, genetisch so manipuliert, daß sich ihre Immunogenität verstärkt und anschließend als Vakzine subkutan reimplantiert [16].

3. Verwendung von Viren mit onkolytischer Potenz: Es handelt sich hierbei um Viren, denen, im Gegensatz zu den meisten anderen im Rahmen genterapeutischer Bemühungen verwendeten Vektoren, die Kompetenz zur Replikation nicht genommen wurde. Die virale Replikation innerhalb der Tumorzelle führt zur Lyse dieser Zelle sowie zur Produktion von nachkommenden Virionen, die wiederum angrenzende Tumorzellen infizieren können [15]. Auch hier ist der Gebrauch von HSV-1 sehr gebräuchlich, wobei der HSV-Wildtyp sehr virulent ist und beim Menschen durchaus eine schwere Enzephalitis verursachen kann. Aus diesem Grund wurde ein genetisch verändertes Herpes Virus mit geringer Virulenz für normale Zellen, aber unveränderter Virulenz für Gliomzellen entwickelt [17, 18].

4. Transfer potentieller therapeutischer Gene in Tumorzellen: Der Prototyp dieser Therapiestrategie ist der Transfer des Tumor Suppressor-Gens p53 in Tumorzellen, das z.B. in einer Reihe untersuchter maligner Gliome funktionell inaktiviert war [19]. Aber auch andere Ansätze, wie z.B. die Transfektion des Gens, das für hTNF $\alpha$  kodiert, was unter anderem zytotoxisch auf eine Vielzahl maligner Zellen wirkt, sind denkbar.

5. „Antisense“-Therapie: Kurze DNS-Segmente werden in eine Tumorzelle übertragen. Ziel innerhalb der Tumorzelle sind dabei unerwünschte Gene wie z.B. TGF $\beta$ , IGF-1 oder VEGF. Der transfizierte therapeutische DNS Strang ist komplementär zur Gensequenz des Ziel-Gens. Die transfizierte DNS bindet an die gewünschte mRNA (Hybridisierung) und führt so zur Geninaktivierung. Entweder durch sterische Blockade des Ribosomenkomplexes oder durch Triggerung der Spaltung durch RNAse H [20]. Die Transfektion erfolgt entweder mit komplementärer cDNS oder mit komplementären Oligodesoxynukleotiden.

Um die Vision einer sicheren und erfolgreichen klinischen Anwendung dieser Therapieregime Wirklichkeit werden zu lassen, ist zunächst die Entwicklung von speziellen Gen-Transfer-Systemen notwendig, die das gewünschte Gen mit hoher Effektivität und hoher Spezifität in die Zielzelle bzw. das Zielgewebe transferieren und dort für eine, abhängig von der zu behandelnden Erkrankung, ausreichend lange Zeit die Expression des erwünschten Gens sichern bzw. eine Weitergabe an die Tochterzellen gewährleisten, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Der effiziente und insbesondere auch sichere Transfer eines Gens in die Zielzelle bzw. das Zielgewebe ist allerdings schwieriger als man bisher angenommen hatte. Der menschliche Körper hat über viele tausend Jahre gelernt, sich selbst vor Umweltangriffen zu schützen, was besonders auch die Inkorporation fremder DNS in das menschliche Genom beinhaltet. Am Anfang der Gentherapie wurden in erster Linie physikalische Methoden wie direkte Mikroinjektion, pneumatische Übertragung (die „Gen-Kanone“), Elektroporation oder die Calcium Phosphat Transfektion verwendet. Später kam dann die Verwendung kationischer Liposomen hinzu. Die zurzeit populärsten DNS Trägersysteme (Vektoren) sind modifizierte Viren. Dabei ist festzustellen, daß die Effizienz des Gentransfers durch virale Vektoren wesentlich höher ist als bei nicht viralen Methoden. Grundsätzlich kann genetisches Material entweder durch direkten Transfer in die Zellen des Zielorgans (*in vivo* Technik) oder durch Manipulation von Zellen *in vitro* erfolgen, die anschließend an den gewünschten Ort, wie z.B. in die Resektionshöhle nach der Operation eines Glioblastoms, gebracht werden (*ex vivo* Technik) [21].

### 1.2.5 Vektorsysteme

Wie bereits angedeutet stellen die Trägersysteme für die zu transferierende DNS die „Achilles-Ferse“ der Gen-Therapie dar. Ein idealer Vektor, also ein ideales Trägersystem, müßte nach heutigem Kenntnisstand mehrere Eigenschaften in sich vereinen. Er sollte in hoher Konzentration applizierbar ( $> 10^8$  Viruspartikel pro ml) sowie leicht und zuverlässig reproduzierbar sein, die Fähigkeit besitzen, das virale Genom ausschließlich an einer spezifischen Stelle im Chromosom des Empfängers zu integrieren bzw. in episomaler Lage Stabilität aufzuweisen. Darüber hinaus über die Eigenschaft verfügen, den gewünschten Zelltyp spezifisch zu treffen sowie in aller Regel keine Komponenten zu enthalten, die das Immunsystem des Empfängerorganismus in unerwünschter Weise aktivieren, da es hierdurch zu schweren, eventuell nicht beherrschbaren Immunreaktionen kommen kann. Die Transkriptionseinheit sollte in der Lage sein, auf Manipulationen der regulatorischen Elemente reagieren zu können. Bis heute gibt es allerdings keinen Vektor, der all diese Eigenschaften besitzt, auch wenn jede Eigenschaft für sich genommen in ganz unterschiedlichen Vektorsystemen längst existiert [22]. Die aktuell üblicherweise gebräuchlichen viralen Vektoren basieren auf RNS bzw. DNS Viren. Sie wurden als Überträgersystem aufgrund ihrer Fähigkeit gewählt, fremde Gensequenzen mit hoher Effizienz in zahlreiche verschiedene Zelltypen zu übertragen. Weltweit finden in mehr als 70% aller klinischen Gen-Therapie-Studien virale Vektoren Verwendung [23]. Die aktuell verwendeten Vektorsysteme basieren auf der Verwendung von Retroviren, Adenoviren, Adeno-Assoziierten-Viren (AAV), Herpesviren (HSV) und Poxviren. Das prominenteste Vektorsystem ist der „Retrovirale Vektor“. Dieser Vektor verfügt über eine hohe Effektivität, das betreffende Gen zu transferieren, und führt somit zu einer hohen Expression des therapeutischen Gens.

#### 1.2.5.1 Vektoren, auf RNS-Viren basierend

##### 1.2.5.1.1 *Retrovirale Vektoren*

Retrovirale Vektoren stellen ein effizientes und das zurzeit am häufigsten verwendete Transfer-System zur Übertragung bzw. Insertion von Fremd-Genen in eine Zielzelle dar. Sie leiten sich von RNS-Viren ab, die als besonderes und charakteristisches Merkmal die Fähigkeit besitzen, mit Hilfe einer *Reversen Transkriptase* ihr virales RNS-Genom innerhalb der infizierten Zelle in eine virale Doppelstrang-DNS umzuschreiben, die dann stabil in die DNS der Wirtszelle eingebaut wird [23]. Das Genom retroviraler Vektoren umfaßt drei Gene,

die mit *gag*, *pol* und *env* bezeichnet werden, flankiert von den sogenannten *Long Terminal Repeats* (LTRs). Diese Elemente sind notwendig für die Integration der viralen DNS in das Genom der Wirtszelle. Außerdem definieren sie Anfang und Ende des viralen Genoms und fungieren darüber hinaus als Verstärker-Promoter (*Enhancer-Promoter*) Sequenzen. Das heißt, sie kontrollieren die Expression viraler Gene [22]. Durch Manipulation am viralen Genom können nun virale Gene durch therapeutische Gene ersetzt werden, wie z.B. durch das Gen für *humanen Tumor Nekrose Faktor alpha* (hTNF $\alpha$ ). Die Kontrolle der Transkription dieser Fremdgene erfolgt entweder durch virale LTRs oder durch künstlich eingebaute Verstärker-Promoter Sequenzen. Die Vorzüge retroviraler Vektoren liegen im Besonderen in der beschriebenen Eigenschaft, viele verschiedene Zelltypen infizieren und die virale DNS stabil in das Wirtsgenom integrieren zu können [23]. Fremd-Gene können in angemessener Größe (< 8 kb) [24] aufgenommen und transferiert werden. Die stabile Integration der viralen DNS in das Genom der Empfängerzelle ist die Grundvoraussetzung für die Persistenz des therapeutischen Gens in der transfizierten Zelle sowie für die Weitergabe der genetischen Information an die Tochterzellen. So wird in der Regel eine lange und auf hohem Level stattfindende Expression des transfizierten Gens erreicht, was z.B. für die Korrektur einer genetischen Erkrankung bzw. zum Erzielen eines therapeutischen Effekts essentiell sein kann. Trotz dieser vielen Vorteile retroviraler Vektoren existieren Nachteile und Hindernisse, die die klinische Anwendung problematisch machen. Limitiert wird die Anwendung retroviraler Vektoren durch die Unfähigkeit, *sich nicht teilende* Zellen, wie z.B. im Gehirn, zu infizieren. Die Zellen des Zielgewebes müssen entnommen, *in vitro* kultiviert und mit dem retroviralen Vektor inkubiert werden. Das zu transfizierende Gen wird mit Hilfe des Vektors in die Wirtszelle transportiert, die dann das gewünschte Protein produzierenden Zellen anschließend reimplantiert (*ex vivo* Technik). Ein Grundproblem von retroviralen Vektoren ist die Tatsache, daß die virale DNS theoretisch überall im Chromosom der Wirtszelle eingebaut werden kann. Das kann unter Umständen zu ungewollter Aktivierung von Onkogenen bzw. der Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen führen und somit die Neigung der betroffenen Zelle zur Entartung verstärken. Auch wenn diese theoretische Möglichkeit eines solchen Ereignisses als relativ gering eingeschätzt wird, ist sie dennoch von nicht unerheblicher Bedeutung [21, 22, 24].

### 1.2.5.2 Vektoren, auf DNS-Viren basierend

Im Gegensatz zu Retroviren enthalten DNS-Viren Einzel- oder Doppelstrang-DNS als virales Genom. Die prominentesten Vertreter aus dieser Gruppe viraler Vektoren sind das Adenovirus (insbesondere die Serotypen 2 und 5), das AAV, ein weit verbreitetes, nicht pathogenes Einzelstrang-DNS Virus aus der Gruppe der Parvoviren und das Herpes Simplex Virus.

#### 1.2.5.2.1 Adenoviren

Adenoviren sind unbehüllte humane Viren, deren Genom aus linearer ds-DNS besteht. Der Vorteil dieser Viren bei der Entwicklung weiterer Vektorsysteme liegt in der ausgesprochen großen Aufnahmekapazität für Fremd-DNS (bis zu 35 kb), der Fähigkeit, zahlreiche verschiedene humane Zelltypen und vor allem *sich nicht teilende* Zellen zu infizieren und das gewünschte Gen effizient zu übertragen. *In vitro* liegt die Infektionsrate bei nahezu 100 % [24]. Die Herstellung ist unkompliziert. Die Basis der Modifikation des adenoviralen Genoms bildete das Entfernen der sogenannten „*early region 1*“ (E1A). Den Viren wurde somit die Fähigkeit genommen, sich aktiv zu replizieren. Um mehr Platz für die Insertion von Fremd-DNS zu schaffen, wurde bei den ersten Vektor-Generation dieser Gruppe zusätzlich die sogenannte E3 Region entfernt [23]. Leider riefen E1/E3 defizitäre Vektoren ausgeprägte Entzündungs- und Immunreaktionen hervor [25], vermutlich da die E3 Einheit als Suppressor der Immunantwort des Wirtsorganismus funktioniert, an der Replikation aber nicht beteiligt ist [24]. Darüber hinaus machte man die Produktion von adenoviralen Proteinen für diese unerwünschten Reaktionen verantwortlich, da die ersten Generationen dieser Vektoren noch die meisten viralen Gene enthielten. Durch weitere Entfernung von viralen Genen aus dem adenoviralen Genom erhoffte man sich, dies vermeiden zu können [24]. Die Maximalvariante solcher Vektoren sind Viren, denen alle viralen Gene entfernt wurden. Man spricht von sogenannten „*gutless*“-Vektoren. Diese haben eine Aufnahmekapazität von bis zu 35 kb an Fremd-DNS. Immer mehr virale Gene zu entfernen, bietet allerdings nicht nur Vorteile, da einige dieser Gene durchaus positive Attribute, wie z.B. das bereits erwähnte Unterdrücken der Immunantwort, besitzen. Ihre Entfernung kann die Rate der Vektoreliminationen durchaus erhöhen und somit dem therapeutischen Erfolg entgegenstehen.

Der große Nachteil adenoviraler Vektoren ist zum einen ihr episomaler Verbleib in der Wirtszelle, was lediglich eine vorübergehende Expression des therapeutischen Gens zur Folge hat, da dieses nicht an die Tochterzellen weitergegeben wird. Zum anderen die durch

adenovirale Vektoren hervorgerufenen Entzündungs- und Immunreaktionen. Diese nachteiligen Eigenschaften verhindern zurzeit sowohl die wiederholte Applikation dieser Vektoren als auch die Anwendung bei erblichen Leiden. Gerade aber die immunologische Reaktion des Wirtsorganismus könnte z.B. bei der Behandlung von Tumoren neue, vielversprechende Möglichkeiten eröffnen. So könnte z.B. die zytotoxische Wirkung von adenoviralen Vektoren, die z.B. die genetische Information zur Produktion von hTNF $\alpha$  enthalten, durch die gegen die transfizierte Zelle gerichteten immunologischen Angriffe verstärkt werden [22].

### 1.2.5.2.2 *Adeno-Associated-Virus*

Bei AAV handelt es sich um ein Virus mit einer Einzelstrang-DNS, das, um sich replizieren zu können, zusätzliche Gene benötigt, die von sogenannten Helfer-Viren zur Verfügung gestellt werden, in aller Regel von Adenoviren oder Herpes Simplex Viren [26, 27]. Interessant als Vektorsystem war AAV anfänglich deshalb, weil es das einzige bisher bekannte Säugetiervirus ist, das mit ausgesprochen hoher Präferenz an einer ganz spezifischen Stelle im Genom der Wirtszelle integriert (kurzer Arm von humanem Chromosom 19) [28]. Da die natürliche Infektion mit AAV an sich keine Erkrankung hervorzurufen scheint [29, 30], geht man davon aus, daß die Insertionsstelle eine sichere Region innerhalb des Genoms der infizierten Zelle darstellt. Leider verlieren rekombinante AAVs (rAAV) diese Eigenschaft, wahrscheinlich durch Verlust des sogenannten *rep* Gens, das bei der Konstruktion von rAAV Vektoren, genauso wie die *cap*-Einheit, entfernt und durch therapeutische Gene ersetzt wird. Eine positive Eigenschaft, die auch durch Manipulation am viralen Genom nicht verloren geht, ist die im Gegensatz zu Adenoviren nur schwach ausgeprägte Immunogenität, was für die therapeutische Anwendung am Menschen von großer Bedeutung ist [23]. Trotz der Entfernung der viralen Gene bietet das Genom von AAV nur Platz für die Insertion von ca. 4,5 kb Fremd-DNS [31]. Die Herstellung ist nach wie vor sehr aufwendig, obwohl die Entwicklung geeigneter „*Packaging*“-Zellen bis heute enorme Fortschritte gemacht hat [32, 33]. Nichtsdestotrotz erhofft man sich, in Zukunft besonders bei der Korrektur solcher genetischer Erkrankungen Erfolge erzielen zu können, die zur Erlangung eines therapeutischen Effekts eine langzeitige und auf hohem Niveau stattfindende Expression des therapeutischen Gens voraussetzen [23].

### 1.2.5.2.3 *Herpes Simplex Virus 1*

HSV-1 ist ein DNS Virus mit linearer Doppelstrang-DNS und einer, in der Größe des Genoms begründeten Aufnahmekapazität von Fremd-DNS zwischen 30 und 50 kb. Das Virus infiziert ein breites Spektrum von *sich teilenden* und vor allem *sich nicht teilenden* Zellen, insbesondere des Nervensystems [34, 35]. Die Vermeidung der neurotoxischen Effekte des HSV-1-Wildtyps wird durch Entfernung der Gene, die für sogenannte „*infected cell proteins*“ (ICP) kodieren, erreicht [36]. Die große Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNS sowie der natürliche Tropismus in Bezug auf neuronale Zellen macht HSV-1 besonders bei der Therapie von neurogenen Tumoren sehr wertvoll [37]. Die meisten Forschungen im Rahmen der genterapeutischen Behandlung von Hirntumoren wurden und werden mit HSV-1 durchgeführt, die die Kompetenz zur Replikation beibehalten haben. Durch die Fähigkeit zur Replikation zeigte sich in proliferierenden Tumoren eine onkolytische und damit den Tumor zerstörende Wirkung [38]. Zur Weiterentwicklung dieser onkolytischen Potenz bei gleichzeitiger Reduzierung der neurotoxischen Wirkungen wurden Vektoren entwickelt, die auf der Verwendung von attenuierten Viren basierten, das heißt mit geringer Virulenz für normale Zellen, aber unveränderter Virulenz für Gliomzellen [17, 18]. Weitere Manipulationen am viralen Genom richteten sich gegen die Gene, die unmittelbar mit den neurotoxischen Effekten dieser viralen Vektoren in Verbindung gebracht wurden. Trotz der bereits weit verbreiteten Verwendung dieser HSV-1 Vektoren bei der Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten humaner Glioblastome sind einige Probleme, die insbesondere die Sicherheit bei der klinischen Anwendung betreffen, noch zu lösen. Hierunter fallen z.B. die weitere Reduzierung der Toxizität, die Vermeidung der Inaktivierung zirkulierender Vektoren durch Antikörper des Wirtsorganismus sowie der sichere Ausschluß der möglichen Entstehung virulenter Viren [23].

### 1.3 **Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF $\alpha$ )**

TNF $\alpha$  ist ein aus 157 Aminosäuren bestehendes Monokin. Das codierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 6, ganz in der Nähe des MHC-Gens. Insgesamt wird das Vorliegen von zwei verschiedenen TNF $\alpha$  Formen diskutiert. Zum einen eine membrangebundene mit einer Molekülmasse von 26 kD und eine aktive, lösliche Form mit einer Molekülmasse von 17 kD [39]. TNF $\alpha$  ist ein Homotrimer, dessen Untereinheiten nicht kovalent verknüpft sind. [40]. Es handelt sich um ein multipotentes Zytokin mit einer ganzen Reihe physiologischer Effekte einschließlich zytotoxischer Effekte gegen viele maligne

Zellen *in vitro* und *vivo* [40-51]. Erste Hinweise auf die Existenz eines Tumor zerstörenden Faktors lieferten Beobachtungen zu Beginn diesen Jahrhunderts, daß Tumoren von Patienten, die gleichzeitig unter einer akuten bakteriellen Infektion litten, besser bekämpft werden konnten. Diese Beobachtungen konnten im Versuch mit Mäusen wiederholt werden, denen lebende oder abgetötete gramnegative Bakterien injiziert wurden. 1975 gelang es L. Old und seinen Mitarbeitern, dieselbe Wirkung mit LPS (Lipopolysaccharid) oder BCG (Bacille Calmette-Guerin) zu erreichen. Darüber hinaus stellt TNF $\alpha$  einen zentralen Mediator bei Immun- und Entzündungsreaktionen dar. Zellulär bewirkt TNF $\alpha$  die Aktivierung von neutrophilen Granulocysten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Eine wichtige Rolle spielt es ebenfalls bei der Abwehr viraler, bakterieller und parasitärer Infektionen [52]. Dennoch hat TNF $\alpha$  in Ausnahmefällen auch zur fortschreitenden Malignisierung beigetragen [53-57]. Die natürliche Induktion von TNF $\alpha$  hat zunächst protektiven Charakter, während eine Überproduktion eng mit Erkrankungen wie Morbus Crohn, Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose assoziiert ist bzw. sogar tödlich sein kann [48, 58, 59]. Im Rahmen des septischen Schocks, charakterisiert durch Hypotension und Multiorganversagen, stellt es einen der entscheidenden Mediatoren dar [39, 59-61]. Die insbesondere bei der systemischen Gabe von TNF $\alpha$  auftretenden ausgeprägten toxischen Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Hypotension, Anorexie, Kopfschmerzen, Rigor Übelkeit und Erbrechen [62-64] sowie das rasche Abfluten von systemisch zugeführtem TNF $\alpha$ , sind zur Zeit die limitierenden Faktoren im Rahmen der klinischen Applikation [63-65]. TNF $\alpha$  bindet an zwei strukturell verwandte, aber funktionell sehr unterschiedliche transmembrane Rezeptoren an der Zelloberfläche, die auf den meisten Zellen koexprimiert werden. TNFR-1 (p55) und TNFR-2 (p75) [60]. Die Bindung von TNF $\alpha$  an TNFR-1 führt zu einer Änderung der Tertiärstruktur des Rezeptors sowie zu einer sich anschließenden Aktivierung verschiedener Signal-Proteine wie „*TNFR-1-associated death domain protein*“ (TRADD), „*receptor-interacting protein 1*“ (RIP1), „*Fas-associated death domain protein*“ (FADD) oder „*TNF-receptor-associated factor 2*“ (TRAF2). Die Rekrutierung dieser Proteine bedingt wiederum die Aktivierung verschiedener Effektoren, die über komplexe Signalkaskaden zur Aktivierung von *Caspasen* sowie den zwei Transkriptionsfaktoren *AP-1* (Activating Protein 1) und *NF- $\kappa$ B* (NFkappaB) führt [66-68]. Die klassischen, dem TNF $\alpha$  üblicherweise zugeschriebenen Effekte werden durch p55 vermittelt. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der sogenannten „Todes-Rezeptoren“ und kann sowohl den Zelltod mittels Apoptose wie auch die Zellproliferation über Aktivierung von *NF $\kappa$ B* vermitteln [69]. P75 hingegen ist in erster Linie für die Vermittlung lymphoproliferativer und inflammatorischer Effekte, das heißt unter anderem für

die unerwünschten Nebenwirkungen nach der Gabe von TNF $\alpha$ , verantwortlich. Die Besonderheit bei der Verwendung von humanem TNF $\alpha$  im Tiermodell ist nun, daß es zwar mit dem murinen p55 Rezeptor, nicht aber mit dem murinen p75 Rezeptor interagiert [70, 71]. Hierdurch lassen sich zumindest im Tiermodell die in erster Linie durch p75 vermittelten toxischen Nebenwirkungen vermeiden. Im Rahmen der Therapie beim Menschen könnten p55 spezifische Agonisten Verwendung finden. Die Tumor zerstörende Aktivität des TNF $\alpha$  erklärt sich zum einen über die direkte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, zum anderen durch immunologische Prozesse im Sinne einer T-Zell-Aktivierung und einer daraus resultierenden spezifischen Immunantwort gegen Tumorzellen. Erwähnenswert ist jedoch, daß viele Zellen resistent gegenüber der oft beschriebenen direkten zytotoxischen Wirkung des TNF $\alpha$  sind [54]. Insbesondere lassen sich solche Zellen in ihrem Wachstumsverhalten schlecht beeinflussen, denen TNFR-1 und TNFR-2 fehlen [72]. Ein weiterer und sicherlich entscheidender Mechanismus, über den TNF $\alpha$  eine Tumorrogression bewirkt, ist sein Einfluß auf die Vaskularisierung des Tumors. So konnte gezeigt werden, daß TNF $\alpha$  den thrombotischen Verschuß von Tumorgefäßen induziert und so die Ausbildung ischämischer Nekrosen fördert [73-77].

### **1.4 F98 Tumor Modell**

Verglichen mit anderen, weit verbreiteten Modellen maligner glialer Tumoren, wie z.B. C6 oder 9L, ist das F98 Tumor Modell lediglich schwach immunogen. Es weist eine hohe Invasivität, begleitet von einer hohen Letalität in Fisher Ratten auf. Es wird allgemein als eines der zuverlässigsten, hoch malignen und nicht immunogenen Tumor Modelle bei Nagetieren angesehen [78].

### **1.5 Hintergrund der vorliegenden Untersuchung**

Die bisher ungelösten Probleme im Rahmen zahlreicher Bestrebungen, bei der Behandlung maligner Gliome Therapien mit kurativer Zielsetzung zu entwickeln, sind, ebenso wie die zur Zeit limitierenden Faktoren bei der systemischen Gabe von TNF $\alpha$ , weiter oben ausführlich beschrieben worden.

Idee der vorliegenden Untersuchung war die Entwicklung eines neuen Therapiemodells mit dem Ziel der späteren klinischen Anwendung. Durch Transfer des Gens für hTNF $\alpha$  in Zellen der F98-Gliomzelllinie *in vitro* (*ex vivo* Therapie) und anschließende Implantation der

transfizierten Zellen in das Gehirn von CD Fisher Ratten wollten wir die lokalen TNF $\alpha$ -Level erhöhen. Hierdurch sollte eine erhöhte Anti-Tumor Antwort bei gleichzeitiger Reduzierung der im Rahmen der systemischen Anwendung auftretenden toxischen Nebenwirkungen erzielt werden. Eine weitere Reduzierung unerwünschter Begleiteffekte sollte die Verwendung von humanem TNF $\alpha$  bewirken. Zur Transfektion wurde ein spezielles Vektorsystem verwendet, bei dem die lokale hTNF $\alpha$ -Expression durch das Glucocorticoid Dexamethason stimulierbar war [40].

Zum anderen konzentrierte sich die Arbeit auf die bisher unzureichend geklärte Frage, ob, und wenn ja in welcher Form, die genetische Manipulation am Genom einer Zelle Einfluß auf das Wachstums- und Proliferationsverhalten der betroffenen Zellen hat. Die generelle Annahme, eine transfizierte Zelle habe die gleichen Eigenschaften wie die ursprüngliche, nicht manipulierte Zelle, scheint nicht unbedingt gerechtfertigt [79].

Erstmalige Ernüchterung in Bezug auf die mögliche klinische Anwendung gentherapeutischer Therapiemodelle brachte die erst kürzlich von Zhixiong et al. beobachtete Induzierung leukämischer Blutbilder im Rahmen eines retroviralen Transfers des Markierungsgens dLNGFR im Tiermodell [80]. Als wirklich herber Rückschlag auf dem Feld der Gentherapie jedoch werden aktuelle Berichte über das Auftreten von mittlerweile drei Leukämiefällen (Sept./Dez. 2002 und Jan. 2003) in einer klinischen Studie zur gentherapeutischen Behandlung von Kindern mit *X-linked-SCID* (severe combined immunodeficiency) im Necker-Hospital-for-Sick-Children in Paris gewertet [81-89]. Diese machen deutlich, welche großen Risiken die Gentherapie in sich birgt. So wurde zwar in der gängigen Literatur immer wieder die theoretisch bestehende Möglichkeit erörtert, durch die im Rahmen der gentherapeutischen Forschungen verwendeten viralen Vektoren, insbesondere durch Verwendung retroviraler Vektoren, auch unerwünschte Wirkungen, wie z.B. die Aktivierung von Onkogenen, die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen [21, 22, 24, 90] sowie die Veränderung von grundlegenden Zellcharakteristika provozieren zu können, doch hatten diese Risiken bis dato eher theoretischen Charakter. In der erwähnten klinischen Studie im Necker-Hospital in Paris kam es nun tatsächlich bis heute zur Erkrankung dreier Studienteilnehmer an Leukämie. Bei der Suche nach der Ursache wurde man relativ schnell fündig. Bei der genanalytischen Untersuchung der manipulierten Zellen fiel auf, daß der zum Transfer des therapeutischen Gens verwendete retrovirale Vektor an insgesamt 40 verschiedenen, nicht vorhersehbaren Stellen innerhalb des Genoms verschiedener Zellen geführt hatte [88]. Bei den unkontrolliert wachsenden Tumorzellklonen der drei erwähnten jungen Patienten war es zur Insertion des Vektors im *LMO2-Onkogen* auf Chromosom 11 zwischen dem ersten und

zweiten Exon gekommen, einem Gen, daß in Zusammenhang mit der Entwicklung von T-Zell-Leukämien steht [82, 88, 89]. Ganz offensichtlich hatte diese „Fehlinsertion“ ein unkontrolliertes Zellwachstum mit der Folge der Entstehung leukämischer Blutbilder verursacht. Einigkeit herrscht allerdings darüber, daß die unerwünschte Insertion im *LMO2-Onkogen* für sich alleine genommen vermutlich nicht ausreicht, um das Entstehen von leukämischen Blutbildern zu provozieren. Erst das Vorliegen weiterer prädisponierender Faktoren scheint letztendlich zur manifesten Erkrankung geführt zu haben. So wiesen die Leukämiezellen eines der im Rahmen der französischen Studie erkrankten Jungen als weitere Anomalie die Translokation eines Teils des Chromosom 6 auf Chromosom 13 auf [89]. Erst im Zusammenspiel von therapieinduzierter und bestehender Veränderung des Genoms scheint es zum Auftreten der T-Zell-Leukämie gekommen zu sein. Zusammenfassend bleibt jedoch unbestritten, daß die drei bisher bekannten Leukämiefälle der französischen Studie letztendlich therapieinduziert waren, was jedem, der bisher nicht daran geglaubt haben mag, die zur Zeit noch unkalkulierbaren Risiken bei der gentherapeutischen Behandlung von Patienten vor Augen geführt haben dürfte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsbedingungen**

#### 2.1.1 Versuchstiere

Sämtliche nachfolgend beschriebene Untersuchungen wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Leitung Frau Dr. med. vet. A. Treiber, Sitz des Neurochirurgischen Tierlabors) durchgeführt. Der Regierungspräsident Düsseldorf erteilte dem Projekt unter der Nummer 111/99 eine Genehmigung zur Durchführung der Versuche nach dem Tierschutzgesetz. Die Untersuchungsreihen an normalen Rattengehirnen wurden an ausgewachsenen männlichen CD-Fisher-Ratten (Körpergewicht 180-230 g) einer identischen Population durchgeführt, da der verwendete Tumor F98 in Fischerratten generiert wurde. Das syngene Rattengliommodell stellt ein standardisiertes und international anerkanntes Tumormodell dar, welches verlässliche und reproduzierbare Untersuchungen des Tumorwachstums bei malignen Gliomen ermöglicht. Die Gliome der Versuchstiere wurden durch intrazerebrale Transplantation von stabilem, in Zellkultur kultiviertem Zellmaterial generiert. Insgesamt wurden 18 Versuchstiere behandelt, von denen 18 Tiere in die Studienauswertung aufgenommen werden konnten. 1 Tier verstarb vor dem geplanten Ende des Versuchs.

#### 2.1.2 Versuchstierhaltung

Die Tiere wurden in Edelstahldrahtkäfigen mit einer maximalen Belegung von fünf Tieren pro Käfig gehalten. Damit lag die maximale Auslastung bei  $1\text{g}/\text{cm}^2$ . Im Käfig war grobes und entstaubtes Weichholzgranulat eingestreut, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 55%, die Außentemperatur bei  $22^\circ\text{C}$ . Von 7-19 Uhr war Kunstlicht eingeschaltet, seine Stärke betrug in der Mitte des Raumes 100 cm über dem Boden 300 Lux. Das Futter bestand aus einer pelletierten Alleindiät, Altromin 1314 ad libitum. Die umsetzbare Energie dieser Diät betrug 13.600 KJ/kg, die Nährstoffe waren zu 47,5% aus N-freien Extraktstoffen und zu 23% aus Rohprotein zusammengesetzt. Alle essentiellen Mineralstoffe, Vitamine sowie Spurenelemente wurden zugesetzt.

### 2.1.3 Anlage des Bohrloches und Durchführung der Zellimplantation

In Allgemeinanästhesie durch intramuskuläre Injektion von 0,17 ml Hypnorm™ und 0,07 ml Valium™ pro 100g Körpergewicht erfolgte nach zusätzlicher Lokalanästhesie der Kopfhaut mit 1% Lidocain die Inzision des Fells über dem Kranium. Nach Abschieben des Periosts erfolgte die Anlage eines 1,5 mm großen Bohrloches rechts frontal. Die Lagerung der Ratte erfolgte in einem speziell für Kleintiere entwickelten stereotaktischen Kopffrahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, Californien/USA). Die Implantation der Zellen mittels einer sterilen Hamilton-Spritze erfolgte stereotaktisch geführt, so daß  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in das Marklager des rechten Frontalhirns appliziert wurden. Danach wurde die Wunde vernäht und das Tier zum Aufwachen in den Käfig zurückgelegt. Die Tiere erwachten nach dem Eingriff innerhalb von 30 Minuten und verhielten sich innerhalb der nächsten Stunden völlig normal, ohne eine Beeinträchtigung zu zeigen. Im Folgenden wurden die Tiere mindestens zweimal täglich visitiert und umfassend neurologisch untersucht. Die intrazerebral wachsenden Tumoren wurden bis zur klinisch apparenten Symptomatik erhalten. Sobald die Tiere Hinweise auf ein neurologisches Defizit aufwiesen, wie z.B. Somnolenz oder Hemiparese, wurden sie umgehend aus dem Versuch genommen und sakrifiziert. Die Gehirne wurden entnommen und sofort schockgefroren.

## 2.2 Verwendete Materialien und Geräte

### 2.2.1 Laborgeräte

CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank	Heraeus (Hanau), CO <sub>2</sub> -Auto-Zero
ELISA-Reader	SLT (Crailsheim), Spectra
Eppendorffzentrifuge	Eppendorf (Hamburg), Centrifuge 5403
Gelaufnahmegerät	Intas (Göttingen), Modul-Digit-Store-Duo
Gelkammern	AGS (Heidelberg), versch. Modelle
Heizblock	Thermo Dux (Wetheim), Dri-Block DB2A
Kryostat	Leika (Germany), 1720 digital
Kühlzentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5403
Korkplättchen	Slee Technik GmbH (Mainz)
Mikroskop	Olympus (Hamburg), CK2
Netzgeräte	Pharmacia (Uppsala, Schweden), GPS 200/400
Pipetten	Labsystems (München), Finnpipette
Pipettenhilfe	Hirschmann, pipetus-akku

Quarzküvetten	Hellma, 100 µl
Spektralphotometer	Perkin-Elmer, Lamda 5
Sterilbank	Heraeus, Lamin Air HA2448
Thermocycler	Biometra (Göttingen), UNO Thermoblock
Vortex	Janke Kunkel, Modell VF2
Zählkammer	Neubauer

### 2.2.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Adhäsions-Objektträger	Marienfeld (Germany), Histo-Bond
Deckgläschen, Glas	Menzel-Gläser (Germany)
Einmalspitzen	Polylab
Einmalspitzen für PCR	Biozym (Oldendorf)
Reaktionsgefäße, 0.5-2.0 ml	Eppendorf
Einmalspritzen, 1ml	Ersta, Asik (Dänemark)
Kanülen, versch. Größen	Microlance, Terumo
Mikrotiterplatten, 96 well	Greiner (Solingen)
Multiwellplatten	Greiner
Plastikpipetten	Greiner
Sterilfilter	Microgon (Laguna Hill, USA), MediaKap 5
Zellkulturflaschen, 75cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellschaber	Greiner (Nürtingen)
Zentrifugenröhrchen, Polypropylen	Greiner (Solingen), 15 ml/ 50 ml

### 2.2.3 Chemikalien

Agarose	Sigma (Deisenhofen)
BSA	Pharmacia (Germany)
Compound-Kleber	Sakura (Niederlande), Tissue-Tek®
Diff-Quick-Fixierlösung	Merz + Dade AG (Düdingen, H)
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Eosin G	Merck
Ethanol	Riedel-de-Häen

Ethidiumbromid	Roth
Eukitt	Riedel-de-Häen
Formamid	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA (Österreich)
Hämalaun nach Mayer	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck
L-Glutamin	Gibco
Magnesiumsulfat	Sigma
Mineralöl	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
MTT-Salz	Sigma
PBS-Puffer	Serag/ Wiessner (Naila, Germany)
Schlittenbahnöl	Leica (Nußloch), Nr. 601
Trypanblau	Roth
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA
Xylol	Merck

#### 2.2.4 Zellkulturmedien und Zusätze für eukaryotische Zellkulturen

<b><i>Basismedium</i></b>	DMEM/ HAM'S T-12 (1:1) Medium	Biochrom
<b><i>Serum hitzeinaktiviert (58°C, 30 min)</i></b>	10% FCS	PAA
<b><i>L-Glutamin</i></b>	2 mM	Gibco
<b><i>Zusätze</i></b>	je 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Mix mit je 10.000 U/ml) 2,5 U/ml Amphotericin-B (250 U/ml)	Gibco Gibco
<b><i>kultivierte Zelllinien</i></b>	F98-hTNF $\alpha$ , F98“Wildtyp“, F98-pwG (Leervektor)	MDC-Berlin
<b><i>Herkunft</i></b>	Glioblastomzelllinie (Ratte)	MDC-Berlin

Komplementkomponenten im FCS wurden durch 30-minütiges Erhitzen auf 56°C im Wasserbad inaktiviert. Aliquots lagerten bis zum Gebrauch bei -20°C

### 2.2.5 Molekularbiologische Kits

dNTP`s (Nucleotide)	Gibco
High Pure RNS Isolations-Kit	Boehringer Mannheim
Random Hexamer Primer pd (N) <sub>6</sub>	Pharmacia
rRNSsin	Promega
Taq-Polymerase	Eurogentec
Super Script Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Gibco

### 2.2.6 Primer

Für das PCR Experiment wurden die unten aufgeführten Oligonucleotide der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) bezogen:

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5' ⇌ 3'</i>	<i>Position im hTNFα-Gen</i>
<b>TNFα-RT/ F</b>	<b>GAG ACG GCG ATG CGG CTG</b>	<b>3402-3823</b>
<b>TNFα-RT/ R</b>	<b>CGA GTG ACA AGC CTG TAG C</b>	<b>3402-3823</b>

### 2.2.7 ELISA

Quantikine TNFα R&D Systems (Wiesbaden, Germany)  
(Katalog-Nummer RTA00)

## 2.3 Zellbiologische Arbeiten

### 2.3.1 Zelllinien

Alle Untersuchungen wurden ausschließlich unter Verwendung von Zellen der Glioblastomzelllinie (Ratte) F98 durchgeführt. Die stabil transfizierten F98 Glioblastomzellklone sowie der F98-Wildtyp (F98-WT) wurden vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin (Dr. W. Walther) zur Verfügung gestellt. Folgende Klone wurden zur Verfügung gestellt: Klon mit Leervektor pWG29-del170 transf. (F98-pWG), *Klone 1* und *4* mit hTNFα exprimierendem Vektor pWG29-del170hTNFα transf. (F98-hTNFα). Alle Klone wurden mit DAPI-Test negativ auf Mycoplasmen getestet. Die Expression des hTNFα ergab für 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 24 h im hTNFα-ELISA für *Klon 1* >10

ng/ml, für *Klon 4* 2,3 ng/ml. Wegen der deutlich höheren Exprimierung von hTNF $\alpha$  des Klon 1 wurden alle Untersuchungen mit Zellen dieses Klons durchgeführt. Die Zellen wurden in 10% Medium in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert und nach der Ernte in gewünschter Verdünnung neu ausgesät.

### 2.3.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

- 10% CO<sub>2</sub>
- 37°C
- Wassergesättigte Atmosphäre

### 2.3.3 Anzucht der Zellen

Die Zelllinien F98-WT, F98-pWG und F98-hTNF $\alpha$  wurden aus der Kultur übernommen. Das Umsetzen der Zellen auf neue Kulturflaschen wurde wie folgt durchgeführt. Das alte Medium wurde entfernt, die Zellschicht mit einer kleinen Menge PBS einmal gespült. Anschließend Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung im Kulturgefäß. Einwirkzeit von ~3 Minuten, maximal 10 Minuten bei 4°C, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst haben (Mikroskopkontrolle). Abschließend Überführung der Zellen in eine mit frischem FCS-haltigem Medium gefüllte Kulturflasche. Durch die Zugabe von FCS wird die Enzymaktivität des Trypsins gestoppt.

### 2.3.4 Einfrieren der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden durch Trypsin-EDTA-Lösung auf die oben beschriebene Weise vereinzelt, in einem Zentrifugationsröhrchen abzentrifugiert, dann in einer Neubauerkammer gezählt (*siehe unten*) und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in Aliquots á 5x 10<sup>6</sup> Zellen in Einfriergefäße (Nunc, 1.8 ml) auf Eis abgefüllt. Die Röhrchen wurden einige Stunden bei -70°C vorgefroren und dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

### 2.3.5 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen muß relativ schnell erfolgen, um eine Schädigung der Zellen durch das im Einfriermedium enthaltende DMSO zu vermeiden. Hierzu werden die Zellen aus dem Stickstofflager entnommen und auf Eis transportiert. Die Zellsuspensionen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner gefrorener Kern vorhanden war. Die Zellen konnten nun in ein mit Medium gefülltes Zentrifugationsröhrchen überführt und gewaschen werden (120x g, 10 Minuten, 4°C). Das Zellpellet wurde in dem gewünschten Medium suspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

### 2.3.6 Aufbereiten der Zellen

Die Zellen wurden unter Zellkulturbedingungen bis zu 70-80% Konfluenz in Kulturflaschen kultiviert (250 ml/ 75 cm<sup>2</sup>). Eine mit der angegebenen Konfluenz bewachsene Kulturflasche kann 1:5 bis 1:10 gesplittet werden. Der Monolayer wurde ein Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen durch Behandlung mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung suspendiert. Hiernach Spülung mit FCS-haltigem Medium. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugationsröhrchen (15 ml) überführt und die Röhrchen mit PBS aufgefüllt. Anschließend Pelletierung durch 10-minütige Zentrifugation mit 120x g bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Zellzahlbestimmung. Dabei wurden die Zellen mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Zellzahl in 16 Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10.000 = Zellzahl/ml). Abschließend wurde die Zelldichte in PBS-Puffer auf die gewünschte Zellzahl zur Verwendung im Tierexperiment eingestellt.

### 2.3.7 Zellproliferation-Test (MTT-Test)

Die Zellen wurden nach abgeschlossener Zellzählung in Konzentrationen von 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 und 100000 Zellen pro Plattenvertiefung in einem Gesamtvolumen von 100 µl in Zwölfachwerten in 96-Lochplatten (Mikrotiterplatten) ausgesät und mit 50 µl Medium versetzt. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde das Medium abgenommen und jeweils 100 µl MTT-Salz-Verdünnung (0,75 mg MTT in 1 ml Medium) in jede Plattenvertiefung gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen

und die Reaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl DMSO gestoppt und das eingebaute MTT-Salz aus den Zellen gelöst. Der so entstandene blau-violette Farbkomplex wurde anschließend photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei 750 nm bzw. 540 nm bestimmt. Die beschriebene Versuchsreihe wurde in dreifacher Bestimmung durchgeführt.

### 2.3.8 TNF $\alpha$ –Bioassay

Zum Nachweis der biologischen Aktivität (direkte Zytotoxizität) des TNF $\alpha$  in den Zellkulturüberständen der Zellreihen F98-hTNF $\alpha$ , F98-pWG und F98-WT bzw. zur Testung der F98-Gliomzellen auf Sensibilität gegenüber hTNF $\alpha$  wurde ein TNF $\alpha$ -Bioassay durchgeführt. Dazu wurden  $2 \times 10^4$  Zellen der TNF $\alpha$  sensiblen Zellreihe L929 bzw.  $2 \times 10^4$  F98-WT Gliomzellen auf 96-Lochplatten (Mikrotiterplatten) in 100 µl DMEM/HAM's F-12 Medium (PAA, Linz/Österreich) ausgesät. Anschließend wurden 100 µl eines seriell verdünnten hTNF $\alpha$ -Standards (R&D Systems, Wiesbaden/Germany) bzw. die jeweiligen Testproben der Überstände hinzu pipettiert und für 24 h inkubiert. Zur Gewinnung der Überstände der Tumorzellklone F98-hTNF $\alpha$  wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium auf 24-Lochplatten ausgesät und für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Die Vitalität der L929 bzw. F98-WT Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Hierzu wurden die Überstände abgenommen und jeweils 100 µl MTT-Salz-Verdünnung (0,75 mg MTT in 1 ml Medium) in jede Plattenvertiefung gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl DMSO (Merck, Darmstadt/Germany) gestoppt sowie das eingebaute MTT-Salz aus den Zellen gelöst. Der so entstandene blau-violette Farbkomplex wurde anschließend durch Bestimmung der optischen Dichte bei 540 nm bzw. 450 nm photometrisch bestimmt.

## 2.4 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.4.1 RNS-Isolierung

Zur RNS-Isolierung wurden die in Zellkulturflaschen kultivierten Zelllinien F98-WT, F98-pWG und F98-hTNF $\alpha$  durch leichtes Klopfen oder mittels eines Zellkulturschabers vorsichtig vom Boden der Kultuflasche gelöst. Besonders adhärente Zellen wurden durch Behandlung mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung gelöst. Die Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen (15 ml) überführt, dieses mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten mit 120x g bei 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die

sich anschließende RNS-Isolierung erfolgte gemäß des Standard-Protokolls des „*High Pure RNS Isolation Kit*“ der Firma Boehringer Mannheim (Germany). Die Zellen wurden durch Zugabe von 400 µl Lyse-/Bindepuffer lysiert und die Probe in das in ein Auffanggefäß eingesetztes *High Pure* Filter-Tube pipettiert. Anschließend Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge für 15 s bei 10 000 rpm (~8000x g). Der Durchlauf wurde verworfen und das Filter-Tube erneut in das Auffanggefäß eingesetzt. Hiernach wurden 90 µl DNase Inkubationspuffer in ein Reaktionsgefäß gegeben, 10 µl DNase I dazugegeben und die Lösung in das obere Reservoir des Filter-Tubes direkt auf das Glasvlies pipettiert. Danach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend Zugabe von 500 µl Waschpuffer I und erneute Zentrifugation wie oben beschrieben und Verwerfen des Durchlaufs. Jetzt Zugabe von 500 µl Waschpuffer II und abermalige Zentrifugation. Hiernach Zugabe von 200 µl Waschpuffer II und Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (~ 13 000x g), um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Abschließend wurde das Filter-Tube in ein steriles Reaktionsgefäß eingesetzt. Zur Elution der RNS wurden nun mit 50–100 µl Elutionspuffer dazugegeben und 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert.

### 2.4.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNS oder RNS erfolgte spektralphotometrisch. Für eine gereinigte Präparation ds-DNS mit  $E_{260\text{nm}/280\text{nm}} = 1,8$  gilt die Beziehung  $E_{260\text{nm}} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Entsprechend gilt bei einer gereinigten RNS-Präparation mit  $E_{260\text{nm}/280\text{nm}} = 2$  die Beziehung  $E_{260\text{nm}} = 1$  entspricht 40 µg/ml.

### 2.4.3 cDNS-Synthese

Zur Synthese von cDNS wurden 3 µg RNS mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 6 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zur Denaturierung der Sekundärstrukturen 3 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zu dem abgekühlten Reaktionsansatz gab man in den folgenden Endkonzentrationen RT-Puffer:

<i>Reagenz</i>	<i>1x für eine Probe (µl)</i>	<i>10,5x für 10 Proben (µl)</i>
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	23,4	246,0
<b>5x H-RT-Puffer</b>	10,0	105,0
<b>pd(N)<sub>6</sub></b>	3,0	31,5
<b>dNTP-Mix (100 µl pro dNTP)</b>	2,5	26,3
<b>BSA</b>	1,7	17,9
<b>RNSsin</b>	1,0	10,5
<b>DTT</b>	0,4	4,2

Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 42 µl wurde vor Zugabe von 200 U *Super Script* Reverse Transkriptase auf 37 °C gebracht. Die cDNS-Synthese erfolgte während der folgenden 120-minütigen Inkubation bei 37 °C. Die so gewonnene cDNS wurde bei -20°C eingefroren.

#### 2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Primer wurden so ausgewählt, daß keine palindromischen Sequenzen vorhanden waren. Die Amplifikation von zytokinspezifischen Sequenzen erfolgte unter Verwendung von ~200 ng cDNS, was 1µl der erhaltenen cDNS entspricht. Der PCR-Ansatz enthielt außerdem die in der folgenden Tabelle aufgeführten Reagenzien in angegebener Konzentration:

<i>Masternix</i>	<i>1x für eine Probe (µl)</i>
<b>Template (cDNS)</b>	1
<b>10x PCR-Puffer</b>	2,5
<b>2 mM dNTPs</b>	2,5
<b>For Primer Zielgen</b>	1,25
<b>Rev Primer Zielgen</b>	1,25
<b>5%ig DMSO</b>	1,25
<b>Aqua ad injectabile</b>	15,05
<b>Taq Polymerase</b>	0,2

Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl. Die Reaktionsansätze wurden mit je einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Zur Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Template mitgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: Biometra .7 / Temp 60°C / 30 Zyklen.

### 2.4.5 Nukleinsäurechromatographie

#### 2.4.5.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarosegelen

DNS-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 20 kb wurden in 3%igen Agarosegelen, die unter Zusatz von 3 µl Ethidiumbromid in einer Gelkammer gegossen wurden, aufgetrennt. Die Auftragung der Proben erfolgte mit  $\frac{1}{10}$  Vol. Blaumarker [50% Glycerin (v/v), 0,25% Xylencyanol (w/v)]; als Gel- und Laufpuffer diente 0,5x TBE. Als DNS-Längenstandard wurde der 100 bp DNS-Leiter der Firma Gibco (Germany) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei 80 mV für 120 min. Mit dem Gelaufnahmegerät „Modul-Digit-Store-Duo“ wurde das Gel bei 340 nm fotografiert.

## 2.5 Färbungen

### 2.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Mit einem Schlittenmikrotom wurden bei einer Innenraum-Temperatur des Kryostaten von -20°C 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf spezial beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach ca. 30-sekündiger Fixierung mit Diff-Quick-Fixierlösung wurden die Schnitte für 3 min in ein Farbbad mit Hämalaun nach Mayer gegeben und anschließend für 1 min unter fließendem Wasser und für eine weitere Minute in Aqua dest. gespült. Hiernach erfolgte die Kernfärbung mit 1%igem Eosin (wässrig/alkoholisch) für 20 sec. Danach erneute Spülung für 1 min unter fließendem Wasser sowie 1 min in Aqua dest.. Abschließend Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol sowie das abschließende Eindecken in Eukitt.

## 2.6 Proteinchemische Arbeiten

### 2.6.1 Zytokinnachweis durch ELISA

Die Bestimmung der Zytokinsekretion erfolgte im Zellkulturüberstand. Zur Gewinnung der Kulturüberstände wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium auf 24-Lochplatten ausgesät und für

24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand abpipettiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren. Zur Bestimmung der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration wurde ein  $\text{TNF}$ -ELISA (R&D Systems, Germany) verwendet. Bei dem verwendeten System handelte es sich um einen Festphasen-ELISA nach dem Sandwich-Prinzip. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper. Der Sekundärantikörper zur Detektion war Peroxidasegekoppelt. Die Peroxidase katalysierte Farbreaktion wurde bei 540 nm bzw. 450 nm gemessen. Der ELISA wurde gemäß Beschreibung im Datasheet durchgeführt. Die hier im Standardmeßverfahren bestimmten Konzentrationen (pg/ml) wurden mit dem Gesamtvolumen der Zellkulturüberstände und den eingesetzten Zellzahlen auf die Gesamtproduktion des Zytokins pro 24 h, angegeben als  $\text{pg}/5 \times 10^5 \text{ Zellen} \times 24 \text{ h}$ , umgerechnet.

### 2.6.2 Proteinbestimmung und $\text{TNF}\alpha$ -ELISA im MDC-Berlin

Die Gewinnung des Materials zur Durchführung der Proteinbestimmung und des ELISAs erfolgte mit Hilfe des Schlittenmikrotoms. Hierzu wurden jeweils 10-20 Schnitte von je 8  $\mu\text{m}$  Schnittdicke aus der Tumormitte der jeweiligen Präparate angefertigt und in Reaktionsgefäße gegeben. Der Transport der angefertigten Proben ins Max-Delbrück-Centrum in Berlin erfolgte unter permanenter und sorgfältiger Kühlung auf Trockeneis. Die Proteinbestimmung sowie der  $\text{TNF}\alpha$ -Elisa im MDC-Berlin erfolgten nach folgender Methode. Die gelieferten Proben wurden in 300  $\mu\text{l}$  eiskaltem, den Protease Inhibitor Aprotinin (10 mg/ml) und PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthaltenden TE Puffer (pH 8.0) homogenisiert, zum Aufschließen der Zellmembran dreimalig nach der Einfrier-Auftau-Methode weiterbehandelt und anschließend bei 14.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  10 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der  $\text{TNF}\alpha$  Elisa (Cytoscreen ELISA, Biosource, Camarillo, CA) mit  $2 \times 100 \mu\text{l}$  des Überstandes in Zweifachbestimmung gemäß Datasheet durchgeführt. Die OD wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm (SLT-Labinstruments, Crailsheim, Germany) gemessen. Der entsprechende  $\text{TNF}\alpha$ -Wert wurde anhand der jeweiligen  $\text{TNF}\alpha$  Standardkurve unter Verwendung der *EasySoftG200/Easy-Fit* Software (SLT-Labinstruments) bestimmt. Anschließend wurden die Werte in zu dem korrespondierenden Gesamt-Protein-Gehalt der Tumor Homogenisate normalisiert, der mit Hilfe des *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* ermittelt wurde (Pierce, Rockford, IL).

## 2.7 Bestimmung der durchschnittlichen Tumorfläche

Zunächst erfolgte die Auswahl der zu vermessenden Präparate. Begonnen wurde hierbei mit dem ersten Schnitt durch das Frontalhirn, bei dem der Tumor makroskopisch sicher zu sehen war. Beendet wurde die Serie mit dem Schnitt, bei dem makroskopisch sicher kein Tumor mehr zu sehen war. Die dazwischen liegenden Schnitte wurden jeweils im Abstand von 24  $\mu\text{m}$  ausgewählt. Die Präparate wurden mit Hämalaun nach Mayer gefärbt, wie oben beschrieben entwässert und mit Eukitt eingedeckt. Anschließend wurden die fertigen Objektträger unter Hinzunahme eines Zentimeterpapiers in jeweils 10er Gruppen mit einem Flachbettscanner als Tischvorlage eingescannt und die Daten in *USIRIS*® (Uni-Genf) als TIF-Datei eingelesen. Anschließend wurde im Programm mit Hilfe des eingescannten Zentimeterpapiers das Maß von 1 cm definiert. Als zu vermessende Regionen wurden nun die auf den jeweiligen Schnitten makroskopisch sichtbaren Tumorflächen festgesetzt. Die Berechnung der Flächeninhalte wurde automatisch durchgeführt. Die Flächeninhalte der jeweiligen Serie wurden addiert und die somit errechneten Gesamtflächen der einzelnen Tumoren einander gegenüber gestellt.

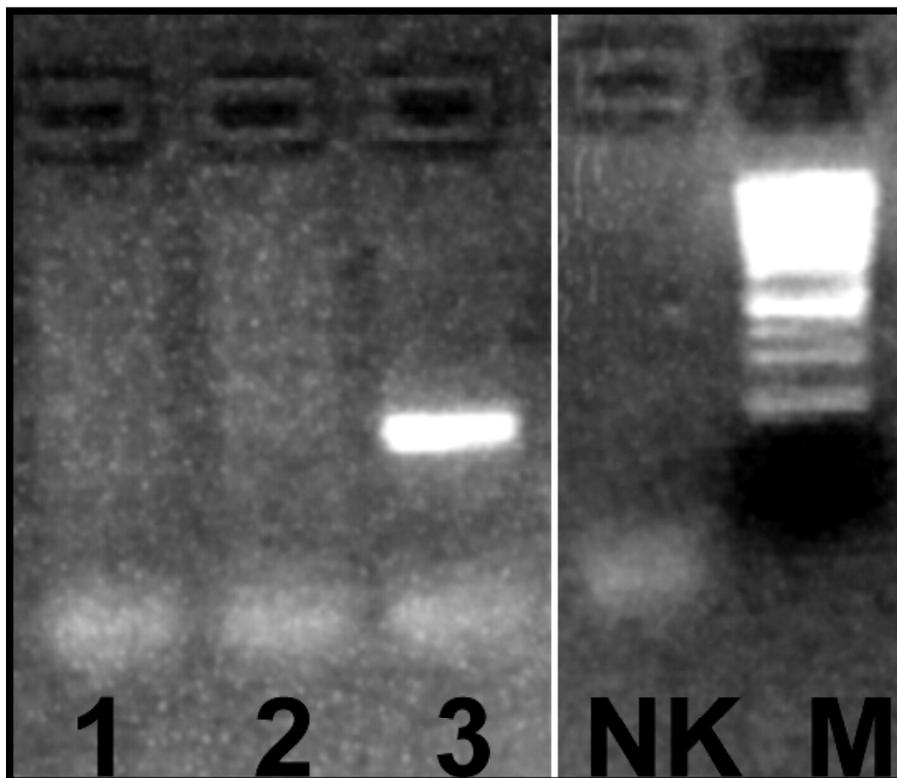
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der *in vitro* Versuche

##### 3.1.1 Verifizierung des Transfektionserfolges

###### 3.1.1.1 PCR

Der Nachweis der Expression von hTNF $\alpha$ -mRNS nach Transfektion mit dem hTNF $\alpha$  exprimierenden Vektor pWG29-del170hTNF $\alpha$  erfolgte durch RT-PCR. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung konnte bei den Zellen der Reihe F98-hTNF $\alpha$  eine deutliche Bande nachgewiesen werden, die sowohl bei den Zellen der Reihe F98-pWG sowie F98-WT fehlte (Abb. 2).



**Abb. 2:** Ergebnisse der RT-PCR Analyse für die Expression von hTNF $\alpha$ . Beachte, daß hTNF $\alpha$  nur in den mit dem TNF $\alpha$  exprimierenden Vektor pWG29-del170hTNF $\alpha$  transfizierten Zellen nachgewiesen wurde (Spur 3). 1 = F98-WT, 2 = F98-pWG, 3 = F98-hTNF $\alpha$ , NK = Negativkontrolle, M =100bp Marker

3.1.1.2 ELISA

Die Verifizierung bzw. Quantifizierung der Sekretion von hTNF $\alpha$  Protein in den Zellreihen F98-WT, F98-pWG und F98-hTNF $\alpha$  erfolgte durch einen TNF $\alpha$ -ELISA. Dabei zeigte sich im unverdünnten Zellkulturüberstand für die Zellen F98-hTNF $\alpha$  eine Konzentration von annähernd 2000 pg/ml, während in den Kontrollgruppen F98-WT und F98-pWg hTNF $\alpha$  nicht nachzuweisen war (Tab. 1 a/b).

**Tabelle 1a**

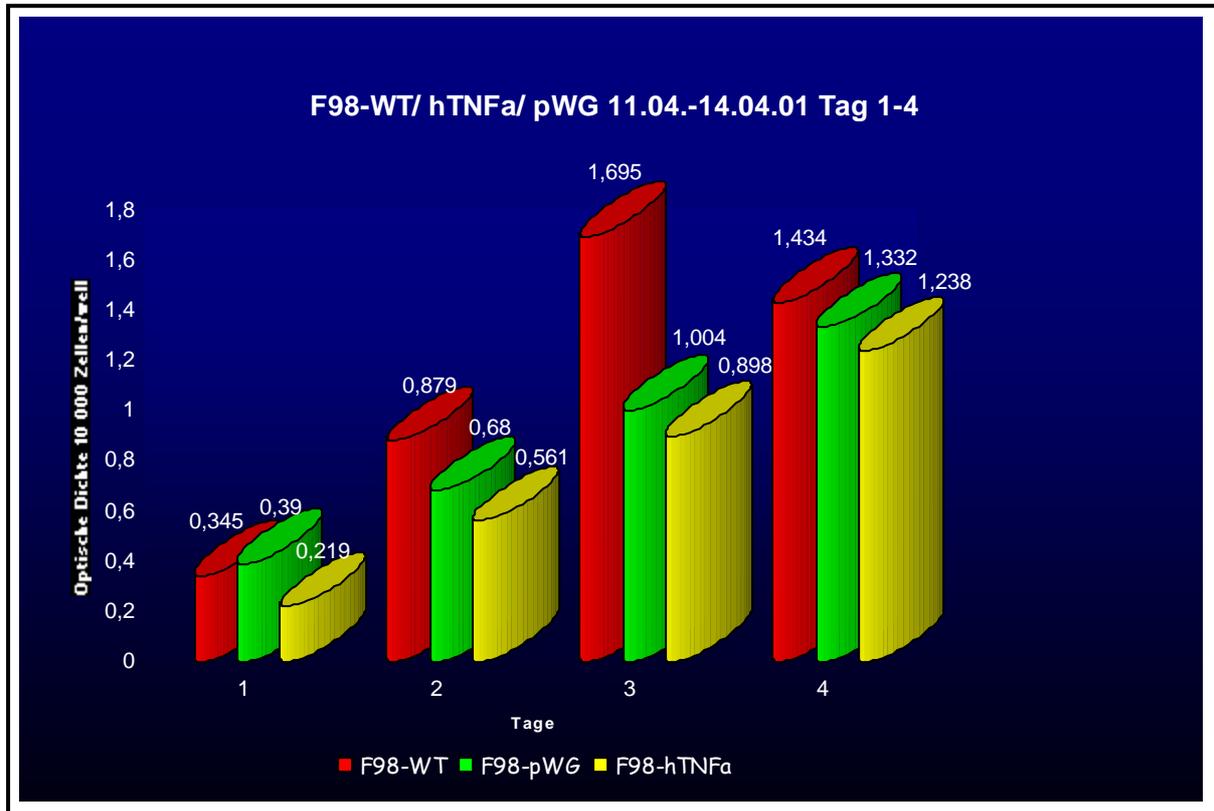
<i>TNF<math>\alpha</math>-Elisa Standard-Ansatz</i>										
hTNF $\alpha$ pg/ml	2000	1000	500	250	125	62,5	31	15,5	0	0
OD 540 nm	2.321	1.503	0.968	0.633	0.460	0.345	0.293	0.277	0.266	0.315
OD 540 nm	2.340	1.281	0.872	0.540	0.402	0.290	0.254	0.239	0.239	0.200
<i>TNF<math>\alpha</math>-Elisa F98-hTNF<math>\alpha</math></i>										
Verdünnung	Ø	1:2	1:10	1:50						
OD 540 nm	2.107	1.302	0.528	0.350						
OD 540 nm	2.279	1.324	0.340	0.340						

**Tabelle 1b**

<i>TNF<math>\alpha</math>-Elisa Standard-Ansatz</i>									
hTNF $\alpha$ pg/ml	1000	500	250	125	62,5	31	15,5	0	0
OD 450 nm	0,549	0,323	0,207	0,123	0,081	0,06	0,055	0,04	0,041
OD 450 nm	0,537	0,319	0,201	0,123	0,077	0,06	0,052	0,039	0,042
<i>TNF<math>\alpha</math>-Elisa F98-WT</i>									
Verdünnung	Ø	1:10							
OD 450 nm	0,044	0,041							
OD 450 nm	0,049	0,039							
<i>TNF<math>\alpha</math>-Elisa F98-LV</i>									
Verdünnung	Ø	1:10							
OD 450 nm	0,043	0,044							
OD 450 nm	0,039	0,039							

### 3.1.2 Zellproliferation-Test (MTT-Test)

Die mit dem MTT-Test ermittelten Wachstumskurven wiesen für beide transfizierten Zellreihen (F98-pWG, F98-hTNF $\alpha$ ) *in vitro* eine langsamere Wachstumsrate als die Zellen des Wildtyps auf (Abb. 3).



**Abb. 3:** Zellproliferation der Zellreihen F98-WT, F98-pWG, F98-hTNF $\alpha$  über vier Tage. Die Zellen wurden in Zwölffachwerten in 96-Lochplatten mit differenter Zellzahl/well ausgesät. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die OD des durch Zugabe von MTT-Salz entstandenen Farbkomplex bei 750 nm bestimmt. Die Abbildung stellt die aus den Zwölffachwerten errechneten Mittelwerte bei einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well exemplarisch dar.

### 3.1.3 TNF $\alpha$ -Bioassay

Die Testung der F98-Gliomzellen auf Sensibilität gegenüber hTNF $\alpha$  erfolgte durch einen TNF $\alpha$ -Bioassay. Hier zeigten sich die Zellen des F98-WT resistent gegenüber der direkten, zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$ . Bis zu einer Konzentration von 2000 pg/ml hTNF $\alpha$  konnte kein zytotoxischer Effekt auf diese Zellen beobachtet werden (Abb. 4a, Rohwerte Tab.

2a im Anhang). Auf die TNF $\alpha$  sensiblen Zellen L929 wirkte der verwendete hTNF $\alpha$ -Standard bereits bei einer Konzentration von 0,98 pg/ml zytotoxisch (Abb. 4b, Rohwerte Tab. 2b im Anhang).

Zur Beantwortung der Frage nach der biologischen Aktivität des sezernierten hTNF $\alpha$ -Protein testeten wir die Überstände des Tumorzellklons F98-hTNF $\alpha$  im TNF $\alpha$ -Bioassay. Dabei ergaben sich im 48h-Überstand TNF $\alpha$ -Aktivitäten um 40 pg/ml (Abb. 4c, Rohwerte Tab. 2c im Anhang)

Abb. 4a

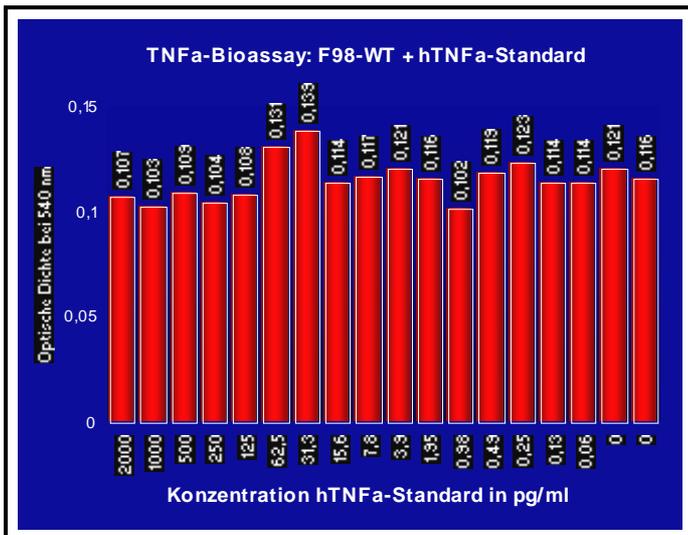


Abb. 4b

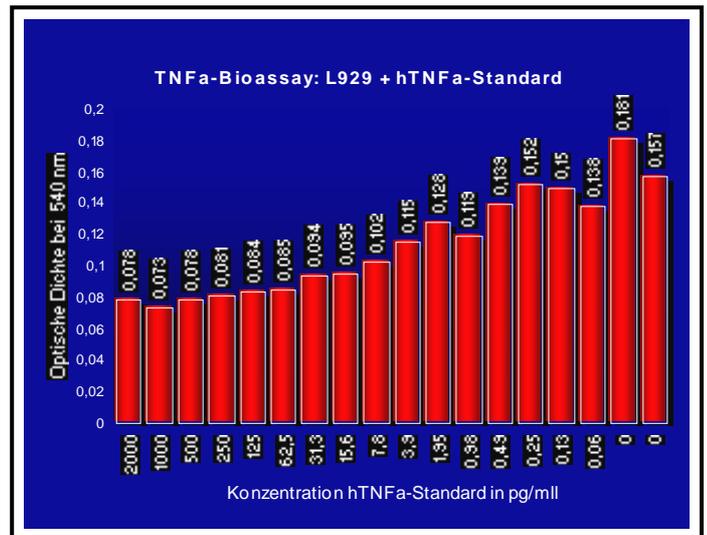
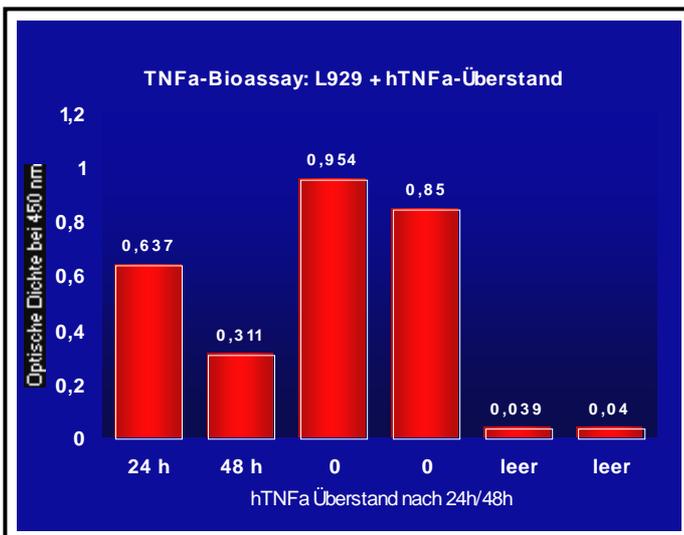


Abb. 4c



TNF $\alpha$ -Bioassay

Optische Dichte bei 540nm/450nm  
= Maß für die Zellvitalität (Werte gemittelt)

*Abb. 4a:* F98-WT + hTNF $\alpha$ -Standard  
*Abb. 4b:* L929 + hTNF $\alpha$ -Standard

*Abb. 4c:* L929 + hTNF $\alpha$ -Überstand  
Vitalitätsbestimmung nach 24h/48h

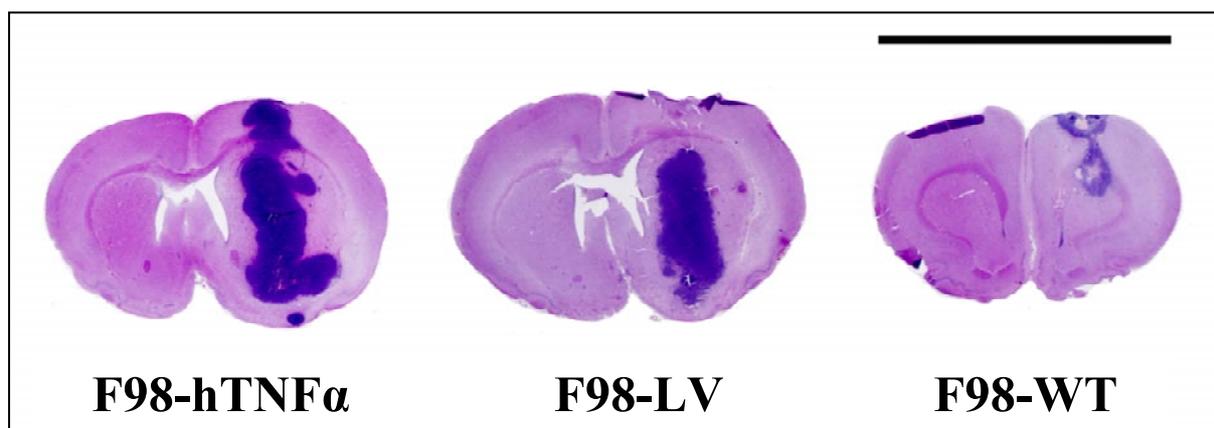
### 3.2 Ergebnisse der in vivo Versuche

#### 3.2.1 Tierversuche

Die Versuchsreihe wurde mit insgesamt 18 CD Fischer-Ratten durchgeführt, wobei 6 Tieren  $5 \times 10^5$  F98-hTNF $\alpha$  Gliomzellen implantiert wurden. Als Kontrollgruppe erhielten jeweils 6 weitere Tiere  $5 \times 10^5$  F98-pWG bzw.  $5 \times 10^5$  F98-WT Gliomzellen. 7 Tage nach Implantation zeigten alle 6 Tiere, die die transfizierten Gliomzellen F98-hTNF $\alpha$  erhalten hatten, eine massive neurologische Verschlechterung bis hin zu einem präfinalen Zustand (n=4) oder einer Hemiplegie (n=2). Alle Tiere der Kontrollgruppe, sowohl nach Implantation mit den transfizierten Gliomzellen F98-pWG als auch mit F98-WT, waren asymptotisch und neurologisch unauffällig. Alle Tiere wurden mit Auftreten der beschriebenen neurologischen Verschlechterung der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe elektiv getötet und die Gehirne entnommen. Ein Tier der F98-pWG Gruppe verstarb, bei unauffälligem neurologischem Befund, einen Tag vor dem letztendlichen Versuchsende (Tab. 3).

#### 3.2.2 Tumorgroße

Sämtliche entnommenen Gehirne wiesen einen rechtshemisphärischen Tumor im Bereich des Cortex oder der Stammganglien auf (Abb. 5). Die durchschnittliche Tumorfläche betrug 518 mm<sup>2</sup> für F98-hTNF $\alpha$ , 235 mm<sup>2</sup> für F98-pWG und 43 mm<sup>2</sup> für F98-WT (Rohwerte Tab. 4, grafische Darstellung Abb. 6). Die statistischen Analysen zeigten einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Flächeninhalten der verschiedenen Tumorgruppen (Tab. 5).



**Abb. 5:** repräsentative mikroskopische Fotografien der verschiedenen Tumorgruppen  
Skalierungsbalken entspricht 1 cm (F98-LV = F98-pWG)

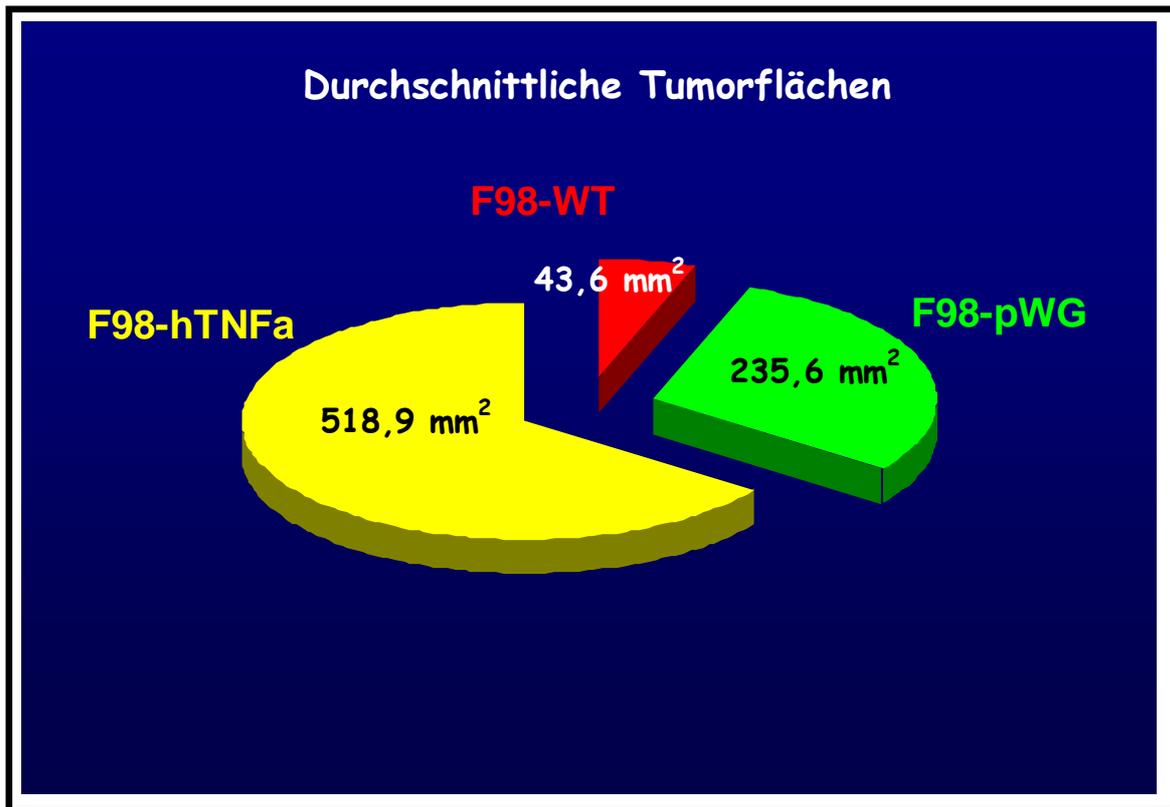


Abb. 6: Das Kuchendiagramm demonstriert die durchschnittlichen Flächeninhalte der verschiedenen Tumorgruppen F98-WT, F98-pWG und F98-hTNFα. Rohwerte sind der Tabelle 4 im Tabellenanhang zu entnehmen.

<i>Flächeninhalt Tumor</i> <i>1</i>	<i>Flächeninhalt Tumor</i> <i>2</i>	<i>P-value, Wilcoxon</i> <i>Test (Two-slided)</i>
F98-WT	F98-hTNFα	0.007937
F98-pWG	F98-hTNFα	0.007937
F98-WT	F98-pWG	0.015837

Tab. 5: Alle drei Tumorgruppen unterscheiden sich statistisch signifikant (Wilcoxon-Test exakt);  $P < 0.015837$

### 3.2.3 ELISA

Der quantitative Nachweis von hTNFα-Protein im implantierten Tumorgewebe der Zelllinien F98-WT, F98-pWG und F98-hTNFα erfolgte durch einen TNFα-ELISA (Biosource International Inc., Germany). Hier zeigte sich für die Gehirne der Tiere, die F98-hTNFα

Zellen enthielten, eine im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen annähernd 15-fach höhere Konzentration an hTNF $\alpha$ -Protein. (Tab. 6).

**Tabelle 6**

<i>Proben Nr.</i>	<i>Protein mg/ml</i>	<i>hTNF<math>\alpha</math> pg</i>	<i>hTNF<math>\alpha</math> pg/mg Protein</i>
<b>1. F98-WT</b>	0.059	11.99	210.35
<b>2. F98-pWG</b>	0.027	2.51	92.96
<b>3.</b>	0.07	9.97	142.43
<b>4.</b>	0.096	8.16	85
<b>5.</b>	0.075	7.83	104.4
<b>6.</b>	0.038	2.51	66.05
<b>7.</b>	0.097	8.38	86.39
<b>8. F98-hTNF<math>\alpha</math></b>	0.033	49.49	1499.7
<b>9.</b>	0.082	63.28	771.71
<b>10.</b>	0.103	300.69	2919.32
<b>11.</b>	0.103	90.43	877.96
<b>12.</b>	0.099	144.06	1455.15

#### 4 Diskussion

TNF $\alpha$  wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien bei der Therapie von malignen Tumoren verwendet. Die bei systemischer Gabe auftretenden schweren toxischen Nebenwirkungen stellen hierbei den limitierenden Faktor dar, zumal die maximal tolerierte Dosis von TNF $\alpha$  beim Menschen auf einer gewichtsbezogenen Basis im Vergleich zur Maus bzw. Ratte circa 40-fach geringer ist [91]. Das Auftreten bzw. der Grad der Ausprägung dieser unerwünschten Wirkungen korreliert dabei eng mit der verabreichten Dosis, unabhängig von der Applikationsart. So traten in einer klinischen Phase-I-Studie von 1989 dosisabhängige Nebenwirkungen wie Schüttelfrost, Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und Hypotension sowohl bei intravenöser, intramuskulärer als auch subkutaner Anwendung auf. Die maximal tolerablen Dosen für die intravenöse Anwendung wurden hier mit  $2 \times 200 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{Tag}$ , für die intramuskuläre Applikation mit  $150 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{Tag}$  und für die subkutane Injektion mit  $100 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{Tag}$  angegeben [92]. In einer anderen Phase-I-Studie, bei der den Patienten rekombinantes TNF $\alpha$  dreimal wöchentlich i.v. verabreicht wurde, wurden toxische Nebenwirkungen bereits bei TNF $\alpha$ -Konzentrationen von  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht beobachtet [93]. Durch eine lokoregionale Applikation, das heißt eine intratumorale Injektion relativ hoher Dosen, schien sich zwar eine höhere Effektivität bei der Tumorregression erzielen zu lassen, die toxischen Nebenwirkungen ließen sich hierdurch jedoch nicht entscheidend verringern [94]. Aufgrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse konzentrierten sich die weiteren Bemühungen auf die Entwicklung von gentherapeutischen Verfahren mit der Möglichkeit der genetischen Modifizierung von Tumorzellen. Durch vektoralen Transfer des Gens für TNF $\alpha$ , aber auch für das eines jeden anderen Zytokins, wird die Zielzelle in die Lage versetzt, das entsprechende Zytokin selbst zu produzieren. Es zeigte sich in zahlreichen Untersuchungen am Tiermodell, daß sich durch diese Transfektion einer definierten Population von Zellen sehr hohe lokale TNF $\alpha$  Level erzielen lassen, ohne das Auftreten wesentlicher Nebenwirkungen zu provozieren. Darüber hinaus waren hierbei im Vergleich zur systemischen oder intratumoralen Applikation nur extrem niedrige Dosen von intrazellulär produziertem TNF $\alpha$  notwendig, um eine suffiziente Hemmung des Tumorwachstums zu erreichen [40, 64, 95, 96]. Eine weitere Reduzierung unerwünschter Begleiteffekte im Tiermodell zeigte sich bei der Verwendung von hTNF $\alpha$ , entsprechend der möglichen Anwendung von p55-spezifischen Agonisten bei der Anwendung im Menschen [70, 71].

Exemplarisch für diesen gedanklichen Ansatz verwendeten wir ein Vektorsystem, bei dem die für hTNF $\alpha$  kodierende Sequenz unter die transkriptionelle Kontrolle des über ein

Glukokortikoid regulierbaren LTR des *Murinen Mamma Tumor Virus* gestellt wurde. Durch systemische Gabe von Dexamethason ließe sich so auch bei unzureichender Basissekretion der transfizierten Zellen die Sekretion von hTNF $\alpha$  stimulieren, um ausreichend hohe lokale Zytokin-Level zu erreichen. Dies scheint vor allem deswegen interessant, da es trotz identischen Vorgehens bei der Transfektion immer wieder zu stark variierenden Expressions-Leveln unterschiedlicher Klone kommt [40, 64]. Das Prinzip dieser mittels eines Glukokortikoids induzierbaren Expression eines bestimmten Gens fand bereits in zahlreichen Untersuchungen Anwendung [40, 97-99]. In der vorliegenden Arbeit evaluierten wir dieses Modell *in vitro* und *in vivo*.

Der Beweis des Transfektionserfolges wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene geführt. Der Nachweis der Expression von hTNF $\alpha$ -mRNA nach Transfektion mit dem TNF $\alpha$  exprimierenden Vektor pWG29-del170hTNF $\alpha$  erfolgte durch RT-PCR (Abb. 2), der Nachweis der Sekretion von hTNF $\alpha$  durch die transfizierte Zelllinie F98-hTNF $\alpha$  durch einen TNF-ELISA. Im Zellkulturüberstand der beiden Kontrollgruppen F98-WT und F98-pWG konnte hTNF $\alpha$  nicht nachgewiesen werden (Tab. 1 a/b). Die Expression des hTNF $\alpha$  in der Gruppe der transfizierten Zelllinie F98-hTNF $\alpha$  wurde von Walther et al. (MDC-Berlin) für  $1 \times 10^6$  Zellen in 24 Stunden abhängig vom Klon mit 2,3 ng bis  $> 10$  ng angegeben. Unsere Messungen im ELISA ergaben für  $5 \times 10^5$  Zellen in 24 Stunden ohne Stimulation durch Dexamethason einen Wert von annähernd 2 ng/ml. Die Bestimmung der biologischen Aktivität des sezernierten TNF $\alpha$  im 48h-Überstand des Tumorzellklons F98-hTNF $\alpha$  ergab einen Wert von annähernd 40 pg/ml. Arbeiten anderer Gruppen zeigten biologische TNF $\alpha$ -Aktivitäten von 5-40 pg/ml [100] bzw. 14-40 pg/ml [95]. Die ebenfalls im ELISA ermittelten *in vitro* Sekretionswerte lagen in den unterschiedlichen Untersuchungen bei 0,05 ng/ml – 0,8 ng/ml für  $1 \times 10^4$  Zellen in 18 Stunden [40], 4 -25 ng/ml für  $1 \times 10^6$  Zellen in 20 Stunden [64], 36 ng/ml für  $1 \times 10^6$  Zellen in 24 Stunden [96] bzw. 45 ng/ml für  $1 \times 10^6$  Zellen in 48 Stunden [101]. Somit sind die von uns gemessenen Werte mit den Transfektionsergebnissen anderer Gruppen vergleichbar und lassen, mit Blick auf die aktuelle Literatur, eine wachstumshemmende Wirkung erwarten. Obwohl die zytotoxische Wirkung von TNF $\alpha$  grundsätzlich mit der der sezernierten Proteinmenge korreliert, scheint es eine absolute Korrelation nicht zu geben [40]. So hat sich gezeigt, daß sich trotz unterschiedlicher Proteinkonzentrationen in einem weiten Bereich dieselbe wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erreichen läßt [100].

In dem von uns durchgeführten *Zellproliferations-Test* (MTT-Test) beobachteten wir für beide transfizierten Zellreihen (F98-pWG, F98-hTNF $\alpha$ ) *in vitro* eine langsamere

Wachstumsrate als für die Zellen des Wildtyps (Abb. 3). Bezüglich der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe entspräche dieses Ergebnis der Beobachtung zahlreicher anderer Arbeitsgruppen, die sowohl durch intrazelluläre Synthese wie auch durch gezielte Zugabe von hTNF $\alpha$  einen zytotoxischen bzw. zytostatischen Effekt auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* zeigen konnten [40, 47, 96, 100-104]. Wie wir jedoch im TNF $\alpha$ -Bioassay nachwiesen, sind die von uns verwendeten F98-Gliomzellen resistent gegenüber TNF $\alpha$ . Hinzu kommt unsere Beobachtung, daß auch die Zellen der F98-pWG Gruppe (Leervektor) ein gegenüber dem Wildtyp deutlich vermindertes Wachstum aufwiesen. Da die Rezeptor vermittelte, direkte zytotoxische Aktivität von TNF $\alpha$  folglich zur Erklärung der verminderten Wachstumsrate der beiden manipulierten Zellreihen nicht herangezogen werden kann, muß an dieser Stelle sicherlich auch ein Einfluß auf das Wachstumsverhalten durch die genetische Manipulation diskutiert werden. Die Beobachtung, daß gentechnisch manipulierte Zellen *in vitro* ein verlangsamtes Wachstum zeigen, ist ein häufig gesehenes Phänomen (persönliche Mitteilung PD Dr. med. Christof Kramm, Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und würde sich grundsätzlich mit den Ergebnissen von Goldbrunner et al. decken, die den Einfluß eines retroviralen Gentransfers in die Ratten-Gliomzelllinie C6 auf das Migrationsverhalten dieser Zelllinie untersuchten. Im Ergebnis zeigte sich hier für die infizierten Zellen, verglichen mit den nicht manipulierten, eine signifikant langsamere Migrationsrate *in vitro* [79]. Da es sich auch bei unserer Beobachtung um die Ergebnisse einer *in vitro* Untersuchung handelt, scheiden immunologische oder inflammatorische Effekte ebenfalls aus.

Bezüglich der *in vivo* Wirkung von TNF $\alpha$  hat es in den vergangenen Jahren, gerade im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung beim Menschen, zahlreiche Untersuchungen gegeben. Die Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick zum Teil sehr unterschiedlich, weisen aber bei genauerer Durchsicht doch gewisse Gemeinsamkeiten auf. Immer wieder wurden bei *in vivo* Experimenten gegenüber *in vitro* Untersuchungen differierende Effekte auf Tumorzellen beobachtet. So erwies sich eine große Anzahl verschiedener Zellen, insbesondere auch maligner Zellen, resistent gegenüber der direkten, Rezeptor vermittelten zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$  *in vitro*. *In Vivo* zeigte sich hingegen immer wieder, daß sich die Aktivität gegen Tumoren nicht nur auf TNF $\alpha$  sensitive Zellen beschränkt. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß es sich bei diesen durch TNF $\alpha$  vermittelten Effekten gegen Tumorzellen um indirekte, nicht Rezeptor vermittelte Wirkungen handelt. So induziert TNF $\alpha$  eine Immunreaktion, die über eine chemotaktische Rekrutierung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen wie Neutrophilen, Makrophagen oder Natürlichen Killerzellen funktioniert. Dies zeigte sich in einer Arbeit von Blankenstein et al. von 1991.

Diese Arbeitsgruppe transferierte mit Hilfe eines retroviralen Vektors das Gen für TNF $\alpha$  in die TNF $\alpha$  resistente Myelom-Zelllinie J558L. *In vitro* zeigte sich hier auch bei sehr hohen TNF $\alpha$  Konzentrationen keine Beeinflussung der Wachstumsrate. *In vivo* hingegen, nach subkutaner Implantation der transfizierten und nicht transfizierten Zellen in BALB/c Mäuse, konnte bei all den Tieren, die die transfizierten Zellen implantiert bekommen hatten, kein oder zumindest ein nur sehr verlangsamtes Wachstum beobachtet werden. Die Tiere, die die mit dem Leervektor transfizierten Zellen bzw. den "Wildtyp" erhalten hatten, zeigten ein unauffälliges Tumorwachstum [95]. Die Hemmung des Tumorwachstums in der Reihe der TNF $\alpha$  sezernierenden Zellen konnte eindeutig auf die Wirkung von TNF $\alpha$  zurückgeführt werden, da dieser Effekt durch das Blocken von TNF $\alpha$  mittels eines monoklonalen Antikörpers aufgehoben werden konnte.

Die Arbeitsgruppe Wakabayashi et al. untersuchte die Wirkung von rekombinantem humanen TNF $\alpha$  auf verschiedene humane Gliomzelllinien sowie die Ratten-Gliosarkomzelllinie T9 mit ähnlichen Ergebnissen. Hierbei zeigte sich ebenfalls *in vitro* und *in vivo* ein unterschiedlicher Effekt von TNF $\alpha$ . Während bei T9 Zellen *in vitro* keine signifikante Reduktion des Zellwachstums erzielt werden konnte, induzierte freies TNF $\alpha$  *in vivo* Nekrosenbildung und eine Tumorregression. Zusammenfassend wurden auch hier indirekte Effekte des TNF $\alpha$  wie das Auslösen einer Immunantwort oder die Zerstörung von tumoreigenen Gefäßen verantwortlich gemacht [47].

In einer anderen Untersuchung von Wright et al. mit der murinen Myelom-Zelllinie  $V_kC_k$  führte die intratumorale Injektion eines TNF $\alpha$  exprimierenden adenoviralen Vektors zu einer deutlichen Tumorregression. Diese Tumorregression konnte allerdings nur in immunkompetenten Mäusen, nicht jedoch im athymischen Nackt-Maus-Model erreicht werden. Durch Injektion des Leervektors konnte ebenfalls keine Beeinflussung des Tumorwachstums beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich bei erneuter Implantation von Zellen der Elterngeneration eine durch CD $^{8+}$  T-Zellen vermittelte protektive Immunität, was ein Tumorwachstum weitgehend verhinderte. So konnte auch hier die immunmodulatorische Wirkung von TNF $\alpha$  belegt werden [96].

Aber nicht nur TNF $\alpha$  fungiert im Rahmen des Transfers von Fremdgenen als Immunmodulator. So beobachteten Tapscott et al., daß bereits der Transfer von Selektionmarkern wie *tk*, *neo* oder *hph* das Wachstumsverhalten von 9L Glioblastomzellen *in vivo* im Sinne eines verminderten Tumorwachstums beeinflussen kann. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei subkutaner als auch bei intrazerebraler Implantation der Tumorzellen. Die Inhibition des Tumorwachstums war in diesem Fall nachweisbar nicht abhängig von

möglichen Artefakten des retroviralen Gentransfers, sondern kam am ehesten infolge einer Immunreaktion wahrscheinlich gegen das sehr immunogene *Neo*-Resistenzgen zustande, da der gleiche Effekt sich auch im Rahmen des Gentransfers mittels Calcium Phosphat/DNS Koprezipitation einstellte [105].

Darüber hinaus scheinen bei der TNF $\alpha$  vermittelten Tumorregression neben immunologisch bedingten Ursachen noch zahlreiche andere Effekte eine Rolle zu spielen. Walther et al. untersuchten den Einfluß eines retroviral vermittelten Gentransfers von TNF $\alpha$  auf das Wachstumsverhalten von Kolonkarzinomzellen. Sie zeigten in einem *in vivo* Experiment unter Verwendung des Nackt-Maus-Modells ein deutlich vermindertes Tumorwachstum bei den Tieren, die die TNF $\alpha$  exprimierende Zellen erhalten hatten, im Vergleich zu denen, denen die unbehandelten Kontrollzellen implantiert worden waren. Ein weiterer interessanter Befund ergab, daß sowohl die TNF $\alpha$  sensiblen Zellen *LoVo*, überraschenderweise aber auch die Kolonkarzinomzellen *LS174T*, die sich gegenüber der externen Zugabe von TNF $\alpha$  als resistent erwiesen hatten, durch die endogene Expression des Zytokins *in vitro* in 60-80% eine Hemmung der Zellproliferation erkennen ließen [100]. Im Vergleich zur externen Zugabe von TNF $\alpha$  zeigte sich, daß zum Erzielen einer vergleichbaren Reduktion der Zellproliferation nur ungefähr 1000-fach niedrigere Konzentrationen nötig sind. Die Tatsache, daß auch die ursprünglich resistenten Zellen in diesem Versuch ein deutlich vermindertes Zellwachstum zeigten, erlaubt wiederum die Schlußfolgerung, daß intrazellulär synthetisiertes TNF $\alpha$  eine effizientere biologische Aktivität entfaltet als extern zugeführtes. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Harada et al., die Untersuchungen an der humanen Gliomzelllinie *U251-MG* durchführten. Als Vektorsystem wurden hier Liposomen verwendet, die mit einem Antikörper gekoppelt waren, der spezifisch mit einem Oberflächenantigen der Gliomzellen reagierte. Hier war ebenfalls der wachstumshemmende Effekt des durch die Transfektion induzierten TNF $\alpha$  *in vivo* größer als der durch extern zugeführte Zytokin [104].

Aus dem Gesagten ergab sich auch für die Evaluierung unseres Systems *in vivo* die berechtigte Annahme, in der F98-hTNF $\alpha$ -Gruppe, trotz der erwiesenen Resistenz der F98-Zellen *in vitro*, eine Tumor Regression, mündend in einer Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen F98-pWG und F98-WT erzielen zu können. Wir führten eine Versuchsreihe mit insgesamt 18 CD Fisher-Ratten durch. Jeweils 6 Tieren wurden  $5 \times 10^5$  F98-hTNF $\alpha$ ,  $5 \times 10^5$  F98-pWG bzw.  $5 \times 10^5$  F98-WT Tumorzellen in das Marklager des rechten Frontalhirns appliziert. Wir wichen bei der implantierten Zellzahl bewußt von der üblicherweise verwendeten Zahl von  $4 \times 10^4$  Zellen [106, 107] ab, da wir bei vorangegangenen Untersuchungen hiermit besonders in der F98-WT Gruppe kein zufrieden

stellendes Tumorwachstum erzielen konnten. Überraschenderweise zeigte sich entgegen unseren Erwartungen bezüglich der Überlebenszeit in der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe der genau gegenteilige Effekt. Alle 6 Tiere, die die hTNF $\alpha$  sezernierenden F98-Gliomzellen erhalten hatten, zeigten 7 Tage nach Implantation eine massive neurologische Verschlechterung bis hin zu einem präfinalen Zustand oder einer Hemiplegie, während die Tiere der beiden Kontrollgruppen asymptomatisch und neurologisch unauffällig waren. Mit Auftreten der neurologischen Verschlechterung der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe wurden alle Tiere getötet und die Gehirne entnommen.

Die histologische Aufarbeitung der entnommenen Gehirne zeigte bei allen Tieren einen rechtshemisphärischen Tumor im Bereich des Cortex und/oder der Stammganglien (Abb. 5), wobei sich die Tumoren aller drei Gruppen signifikant in ihrer Größe unterschieden (Tab. 5 Ergebnisteil, Tab. 4 im Anhang). So betrug die durchschnittliche Tumorfläche 518 mm<sup>2</sup> für die F98-hTNF $\alpha$ , 235 mm<sup>2</sup> für F98-pWG und 43 mm<sup>2</sup> für F98-WT Gruppe (Abb. 6). Die gewonnenen Daten zeigen einen durchaus als dramatisch einzustufenden Unterschied in der Größenentwicklung der Tumoren der beiden genmanipulierten Zellreihen F98-hTNF $\alpha$  und F98-pWG im Vergleich zum „Wildtyp“. Wir gehen davon aus, daß die drastische neurologische Verschlechterung der Tiere der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe weniger auf Nebenwirkungen des hTNF $\alpha$ , als vielmehr auf die rasante Größenzunahme der implantierten Tumoren zurückzuführen ist. Die beobachteten neurologischen Symptome entsprachen dem typisch klinischen Bild bei ausgeprägtem Hirndruck mit Einklemmung des Hirnstamms. Aufgrund der bereits ausgeprägten Größe der Tumoren der F98-pWG Gruppe vermuten wir, daß auch die Tiere dieser Gruppe bei Fortsetzung des Versuches innerhalb kurzer Zeit neurologisch auffällig geworden wären. Die Größenentwicklung der Tumore in der F98-WT Gruppe entspricht, unter Berücksichtigung der implantierten Zellzahl, den Daten anderer Gruppen [107].

Da wir den Nachweis der tatsächlichen Sekretion von hTNF $\alpha$ -Protein im implantierten Tumorgewebe der Ziellinien F98-hTNF $\alpha$  durch einen TNF $\alpha$ -ELISA erbrachten (Tab. 6 Ergebnisteil), scheidet eine mangelnde hTNF $\alpha$  Sekretion *in vivo* zur Erklärung der beschriebenen Ergebnisse aus, zumal auch die Tiere der F98-pWG Gruppe gegenüber dem „Wildtyp“ signifikant größere Tumore aufwiesen. Die Beobachtung, daß die Implantation der hTNF $\alpha$  produzierenden Zellen im Durchschnitt auch die Entstehung signifikant größerer Tumore als in der Gruppe des Leervektors zur Folge hatte, ist ebenfalls durch die in der gängigen Literatur beschriebenen Effekte des TNF $\alpha$  nicht erklärbar. Allenfalls zu diskutieren wäre die durch TNF $\alpha$  induzierte Hochregulierung von VEGF (Vascular Endothelial Growth

Factor) [108], was zu einer vermehrten Neubildung von tumoreigenen Gefäßen in der TNF $\alpha$  Gruppe geführt haben könnte. Da die Gefäßneubildung anerkanntermaßen einen der entscheidenden Faktoren bei der Tumorentwicklung darstellt [109-112], könnte es auf diesem Weg zu einer Tumorprogression gekommen sein. Allerdings konnten wir zumindest bei der histologischen Beurteilung der Tumore der TNF $\alpha$  Gruppe im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen F98-pWG und F98-WT keine vermehrte Gefäßproliferation nachweisen. Darüber hinaus kommt VEGF auch als Immunmodulator in Frage. Über die durch VEGF vermittelte Öffnung der Blut-Hirn-Schranke kommt es zu einem vermehrten Kontakt von ZNS- bzw. Tumorantigenen mit Immunmediatoren des Blutes [113]. Die Folge ist eine verstärkte Immunantwort.

Ein weiterer Aspekt bei der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse ist die Tatsache, daß Tumore Oberflächenmoleküle wie den Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC) Klasse I verlieren können, was allgemein als einer der Hauptmechanismen angesehen wird, wie Tumorzellen der T-Zell vermittelten Immunantwort entkommen können [114]. Die durch TNF $\alpha$  vermittelte Verstärkung der Expression von intra- und extrazellulären Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 [115], MHC I und MHC II ließe daher ebenfalls eine verstärkte Immunantwort und damit eine Tumorregression insbesondere bei den hTNF $\alpha$  sezernierenden Tumoren erwarten [116, 117].

Wright et al. kamen bei einer im Vergleich mit der von uns durchgeführten Untersuchung im Ansatz sehr ähnlichen Arbeit zu grundlegend anderen Ergebnissen, die sich allerdings mit der gängigen Literatur decken. Sie transferierten das TNF $\alpha$ -Gen mit Hilfe eines adenoviralen Vektors in MCA-26 Zellen (Kolonkarzinomzelllinie der Maus). Die beobachtete *in vitro* Wachstumsrate unterschied sich nur unwesentlich von der der unmanipulierten Zellen. Über das *in vitro* Wachstumsverhalten der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurden keine Angaben gemacht. Diese *in vitro* Ergebnisse machen eine Resistenz gegenüber der direkten zytotoxischen Wirkung von TNF $\alpha$  wahrscheinlich. *In Vivo* hingegen beobachteten sie eine signifikante Reduzierung des Tumorwachstums, entsprechend unseren ursprünglichen Erwartungen in der vorliegenden Untersuchung. Nach Implantation von jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen der transfizierten Zellreihen (TNF $\alpha$  exprimierende Zellen sowie Leervektor) bzw. Zellen des „Wildtyps“ in BALB/c Mäuse zeigten die Tumore der TNF $\alpha$ -Gruppe gegenüber den beiden Kontrollgruppen (Leervektor bzw. „Wildtyp“) eine signifikant verringerte Tumorgrößenentwicklung. Derselbe Effekt zeigte sich nach vorangehender Implantation von nicht manipulierten MCA-26 Zellen und anschließender intratumoraler Injektion des adenoviralen Vektors in die vorbestehenden Tumoren eines fortgeschrittenen Stadiums.

Die TNF $\alpha$ -Gruppe unterschied sich auch in diesem Fall bezüglich der TumorgroÙe signifikant vom Leervektor [101]. Allerdings wurde bei dem beschriebenen Modell Fremd-DNA nicht durch eine retrovirale Infektion, sondern unter Verwendung eines adenoviralen Vektors in die entsprechenden Zellen transferiert. Dieser Vektortyp integriert nicht im Genom der Wirtszelle, sondern verbleibt in episomaler Lage. Das durch die Verwendung von retroviralen Vektoren bestehende Risiko der Veränderung von grundlegenden Zellcharakteristika durch unkontrollierte Integration im Genom der Wirtszelle wurde hierdurch vermieden.

DaÙ ein retroviraler Vektor an einer beliebigen, nicht vorhersehbaren Stelle innerhalb des Genoms der Wirtszelle integrieren kann, ist hinlänglich bekannt. Dies stellt daher nach wie vor eine große Unsicherheit bei der Verwendung retroviraler Vektoren dar. So kann solch ein Vektor z.B. in ein Tumor-Suppressor-Gen inserieren, was die Kanzerogenität der Zelle erhöhen würde [24]. Ebenso denkbar ist die Aktivierung eines Onkogens sowie die Entstehung zahlreicher anderer Mutationen [21, 22], z.B. innerhalb von Sequenzen, die für die Regulierung des Zellwachstums verantwortlich sind. Erst kürzlich beobachteten Zhixiong et al. die Induzierung leukämischer Blutbilder im Rahmen eines retroviralen Transfers des Markierungsgens *dLNGFR* im Tiermodell [80]. Verantwortlich für dieses unerwünschte Ergebnis war das Zusammenspiel einer Onkogen Aktivierung durch den retroviralen Vektor sowie eine durch das Transgen-Produkt verursachte Signal Interferenz. Das Risiko, durch Insertion eines Transgens mit Hilfe eines retroviralen Vektors Mutationen mit dem Ergebnis eines malignen Phänotyps auszulösen, liegt laut Literatur bei ungefähr  $10^{-7}$  pro Insertion [118], so daÙ es sich hierbei insgesamt um ein recht seltenes Ereignis handeln soll. Ganz im Gegensatz zu dieser Häufigkeitsannahme stehen aktuelle Berichte über das Auftreten von mittlerweile drei Leukämiefällen nach retroviraler Infektion (Sept./Dez. 2002 und Jan. 2003) in einer klinischen Studie zur gentherapeutischen Behandlung von Kindern mit *X-linked-SCID* (severe combined immunodeficiency) im Necker-Hospital-for-Sick-Children in Paris [81-89]. Bei den unkontrolliert wachsenden Tumorzellklonen der drei an Leukämie erkrankten jungen Patienten war es zur Insertion des Vektors im *LMO2-Onkogen* auf Chromosom 11 gekommen, einem Gen, daÙ in Zusammenhang mit der Entwicklung von T-Zell-Leukämien steht [82, 88, 89]. Dies führte ganz offensichtlich, in einem Fall bei zusätzlich bestehender Translokation eines Teils des Chromosom 6 auf Chromosom 13 [89], zum unkontrollierten Wachstum der entsprechenden Zellpopulation, was weiterhin die Annahme bestätigt, daÙ zur Tumorentstehung ein Zusammenspiel mehrerer prädisponierender Faktoren Voraussetzung zu sein scheint.

Da die Herstellung der in unserer Arbeit verwendeten stabilen Zelllinien jedoch durch Transfektion und nicht durch retrovirale Infektion stattgefunden hat, kann das besondere onkogenetische Potential von Retroviren, wie in der erwähnten französischen Studie beobachtet, keine entscheidende Rolle bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse spielen. Die von uns verwendeten Plasmide enthalten zwar retrovirale Elemente, die hierdurch prinzipiell mögliche retrovirale Infektion wurde jedoch nicht zur Transduktion der Zellen verwendet. Der retrovirale „Charakter“ des Plasmids kommt also bei der genetischen Manipulation der F98-Gliomzellen nicht zum Tragen. Dennoch begründet das von uns beobachtete explosive Wachstum beider manipulierten Zellen *in vivo* (F98-hTNF $\alpha$  und „Leervektor“) den dringenden Verdacht, daß dies auf eine Veränderung grundlegender Zellcharakteristika wie z.B. der Migrations- oder Proliferationsfähigkeit bzw. der für die Regulation des Zellwachstums verantwortlichen DNA-Sequenzen insgesamt durch die genetische Manipulation zurückzuführen ist, zumal Ergebnisse, die eine durch TNF $\alpha$  induzierte Steigerung der Invasivität bzw. Metastasierungsfähigkeit zeigten, die Ausnahme bleiben [53]. Ob darüber hinaus auch in unserem Fall bisher nicht bekannte Effekte von TNF $\alpha$  für das ungewöhnliche Tumorwachstum mit verantwortlich gemacht werden können, bleibt fraglich, so daß eine abschließende Deutung der ungewöhnlichen Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig möglich ist. Klar ist jedoch, daß es auch in Zukunft gut durchdachter Tiermodelle bedarf, um das Risiko von unerwünschten Nebeneffekten, die auf die Insertion bzw. Expression von Transgenen zurückzuführen sind, realistisch einschätzen zu können. Die generelle Annahme, eine transfizierte Zelle habe die gleichen Eigenschaften wie die ursprüngliche, nicht manipulierte Zelle, scheint nicht gerechtfertigt.

**5 Literatur**

1. Salcman, M., *The morbidity and mortality of brain tumors. A perspective on recent advances in therapy.* Neurol Clin, 1985. **3**(2): p. 229-57.
2. Albert, F.K., et al., *Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis.* Neurosurgery, 1994. **34**(1): p. 45-60; discussion 60-1.
3. Kiwit, J.C., F.W. Floeth, and W.J. Bock, *Survival in malignant glioma: analysis of prognostic factors with special regard to cytoreductive surgery.* Zentralbl Neurochir, 1996. **57**(2): p. 76-88.
4. Burger, P.C., et al., *Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme.* J Neurosurg, 1988. **68**(5): p. 698-704.
5. Fransen, P. and N. de Tribolet, *Surgery of supratentorial tumors.* Curr Opin Oncol, 1993. **5**(3): p. 450-7.
6. Fadul, C., et al., *Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas.* Neurology, 1988. **38**(9): p. 1374-9.
7. Rampling, R., *Modern aspects of radiation therapy for glial tumours of the brain.* Forum (Genova), 1998. **8**(3): p. 289-301.
8. Leibel, S.A. and G.E. Sheline, *Radiation therapy for neoplasms of the brain.* J Neurosurg, 1987. **66**(1): p. 1-22.
9. Levin, V.A., et al., *Modified procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV 3) combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors.* Cancer Treat Rep, 1980. **64**(2-3): p. 237-44.
10. Levin, V.A., C.B. Wilson, and P.S. Vestnys, *Primary intracranial gliomas: clinical studies and treatment regimens of the Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, 1977-1979.* Cancer Treat Rep, 1981. **65 Suppl 2**: p. 83-8.
11. Walker, M.D., et al., *Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery.* N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1323-9.
12. Cairncross, J.G., *Aggressive oligodendroglioma: a chemosensitive tumor.* Recent Results Cancer Res, 1994. **135**: p. 127-33.
13. Peterson, K., et al., *Salvage chemotherapy for oligodendroglioma.* J Neurosurg, 1996. **85**(4): p. 597-601.
14. Cairncross, G., et al., *Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.* J Clin Oncol, 1994. **12**(10): p. 2013-21.
15. Bansal, K. and H.H. Engelhard, *Gene therapy for brain tumors.* Curr Oncol Rep, 2000. **2**(5): p. 463-72.
16. Parney, I.F., C. Hao, and K.C. Petruk, *Glioma immunology and immunotherapy.* Neurosurgery, 2000. **46**(4): p. 778-91; discussion 791-2.
17. Mineta, T., et al., *Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas.* Nat Med, 1995. **1**(9): p. 938-43.
18. Kramm, C.M., et al., *Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(17): p. 2057-68.
19. Lang, F.F., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human gliomas.* Neurosurgery, 1999. **45**(5): p. 1093-104.
20. Engelhard, H., et al., *Urokinase antisense oligodeoxynucleotides as a novel therapeutic agent for malignant glioma: in vitro and in vivo studies of uptake, effects and toxicity.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(2): p. 400-5.

21. Engelhard, H.H., *Gene therapy for brain tumors: the fundamentals*. Surg Neurol, 2000. **54**(1): p. 3-9.
22. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-42.
23. Walther, W. and U. Stein, *Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases*. Drugs, 2000. **60**(2): p. 249-71.
24. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Nature, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 25-30.
25. Ali, M., N.R. Lemoine, and C.J. Ring, *The use of DNA viruses as vectors for gene therapy*. Gene Ther, 1994. **1**(6): p. 367-84.
26. Weitzman, M.D., K.J. Fisher, and J.M. Wilson, *Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1845-54.
27. Fisher, K.J., et al., *Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 520-32.
28. Kotin, R.M., R.M. Linden, and K.I. Berns, *Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination*. Embo J, 1992. **11**(13): p. 5071-8.
29. Blacklow, N.R., M.D. Hoggan, and W.P. Rowe, *Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses*. J Natl Cancer Inst, 1968. **40**(2): p. 319-27.
30. Blacklow, N.R., et al., *Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population*. Am J Epidemiol, 1968. **88**(3): p. 368-78.
31. Dong, J.Y., P.D. Fan, and R.A. Frizzell, *Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(17): p. 2101-12.
32. Matsushita, T., et al., *Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus*. Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 938-45.
33. Inoue, N. and D.W. Russell, *Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7024-31.
34. Fink, D.J. and J.C. Glorioso, *Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 357-9.
35. Breakefield, X.O. and N.A. DeLuca, *Herpes simplex virus for gene delivery to neurons*. New Biol, 1991. **3**(3): p. 203-18.
36. Wu, N., et al., *Prolonged gene expression and cell survival after infection by a herpes simplex virus mutant defective in the immediate-early genes encoding ICP4, ICP27, and ICP22*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6358-69.
37. Chou, J., et al., *Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1262-6.
38. Martuza, R.L., et al., *Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant*. Science, 1991. **252**(5007): p. 854-6.
39. Probert, L. and K. Akassoglou, *Glial expression of tumor necrosis factor in transgenic animals: how do these models reflect the "normal situation"?* Glia, 2001. **36**(2): p. 212-9.
40. Sparmann, G., et al., *Conditional expression of human TNF-alpha: a system for inducible cytotoxicity*. Int J Cancer, 1994. **59**(1): p. 103-7.
41. Walther, W., U. Stein, and D. Pfeil, *Gene transfer of human TNF alpha into glioblastoma cells permits modulation of mdr1 expression and potentiation of chemosensitivity*. Int J Cancer, 1995. **61**(6): p. 832-9.
42. Gillio Tos, A., et al., *Retroviral vector-mediated transfer of the tumor necrosis factor alpha gene into human cancer cells restores an apoptotic cell death program and induces a bystander-killing effect*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2486-95.

43. Gridley, D.S., et al., *Combination of pGLI-TNF-alpha gene and radiation (proton and gamma-ray) therapy against brain tumor*. Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4195-203.
44. Harada, K., et al., [*Antitumor effect of intra-arterial tumor necrosis factor-alpha in rats with transplanted intracerebral glioma and its evaluation by MRI*]. No Shinkei Geka, 1995. **23**(12): p. 1069-74.
45. Li, J., et al., *Evaluation of pGLI-TNF-alpha therapy in combination with radiation*. Oncol Res, 1998. **10**(7): p. 379-87.
46. Sohmura, Y., et al., *Recombinant human tumor necrosis factor--II. Antitumor effect on murine and human tumors transplanted in mice*. Int J Immunopharmacol, 1986. **8**(3): p. 357-68.
47. Wakabayashi, T., et al., *Antitumor activity of recombinant human tumor necrosis factor-alpha (rH-TNF alpha) and liposome-entrapped rH-TNF alpha*. Neurol Med Chir (Tokyo), 1997. **37**(10): p. 739-45; discussion 745-6.
48. Fiers, W., *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level*. FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 199-212.
49. Mueller, H., *Tumor necrosis factor as an antineoplastic agent: pitfalls and promises*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(12): p. 1291-8.
50. Sasaki, Y., et al., *In vitro antitumor effect of recombinant human tumor necrotizing factor on cultured human cancer cell lines and freshly isolated lung cancer cells by the human tumor clonogenic assay*. Invest New Drugs, 1987. **5**(4): p. 353-9.
51. Sherwood, E.R., et al., *Therapeutic efficacy of recombinant tumor necrosis factor alpha in an experimental model of human prostatic carcinoma*. J Biol Response Mod, 1990. **9**(1): p. 44-52.
52. Rosenblum, M.G. and N.J. Donato, *Tumor necrosis factor alpha: a multifaceted peptide hormone*. Crit Rev Immunol, 1989. **9**(1): p. 21-44.
53. Malik, S.T., et al., *Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice*. Eur J Cancer, 1990. **26**(10): p. 1031-4.
54. Balkwill, F.R., *Tumour necrosis factor and cancer*. Prog Growth Factor Res, 1992. **4**(2): p. 121-37.
55. Holden, R.J., I.S. Pakula, and P.A. Mooney, *An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma*. Med Hypotheses, 1998. **51**(4): p. 309-14.
56. Montserrat, E., *Chronic lymphoproliferative disorders*. Curr Opin Oncol, 1997. **9**(1): p. 34-41.
57. Spriggs, D., et al., *Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(18): p. 6563-6.
58. Beutler, B.A., *The role of tumor necrosis factor in health and disease*. J Rheumatol, 1999. **26 Suppl 57**: p. 16-21.
59. Cohen, R.B. and K.A. Dittrich, *Anti-TNF therapy and malignancy - a critical review*. Can J Gastroenterol, 2001. **15**(6): p. 376-84.
60. Szatmary, Z., *Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview*. Neoplasma, 1999. **46**(5): p. 257-66.
61. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels*. Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **200**(2): p. 233-9.
62. Hieber, U. and M.E. Heim, *Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies*. Oncology, 1994. **51**(2): p. 142-53.
63. Creaven, P.J., et al., *Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor*. Cancer Chemother Pharmacol, 1987. **20**(2): p. 137-44.
64. Marr, R.A., et al., *Tumour therapy in mice using adenovirus vectors expressing human TNFa*. Int J Oncol, 1998. **12**(3): p. 509-15.

65. Soma, G. and D. Mizuno, *Exogenous and endogenous tumour necrosis factor therapy*. *Cancer Surv*, 1989. **8**(4): p. 837-52.
66. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. *Microsc Res Tech*, 2000. **50**(3): p. 184-95.
67. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(9): p. 372-7.
68. Leong, K.G. and A. Karsan, *Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha*. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(4): p. 1303-25.
69. Wallach, D., et al., *Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding*. *FEBS Lett*, 1997. **410**(1): p. 96-106.
70. Tartaglia, L.A., et al., *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(20): p. 9292-6.
71. Lewis, M., et al., *Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(7): p. 2830-4.
72. Kiwit, J.C., et al., *Effects of recombinant human tumor necrosis factor on rodent gliomas and normal brain*. *J Neurosurg*, 1991. **75**(4): p. 597-603.
73. Sasajima, T., et al., *Intracarotid recombinant human tumor necrosis factor-alpha reduces cerebral blood flow and methionine uptake in rat brain tumors*. *J Neurooncol*, 1997. **34**(2): p. 123-9.
74. Niida, H., et al., *Angiogenesis in microvascular endothelial cells induced by glioma cells and inhibited by tumor necrosis factor in vitro*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1995. **35**(4): p. 209-14.
75. Isaka, T., et al., *Morphological effects of tumor necrosis factor-alpha on the blood vessels in rat experimental brain tumors*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1996. **36**(7): p. 423-7.
76. Isaka, T., et al., *Ultrastructural changes of the vascular endothelium after intra-arterial administration of tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) in rat gliomas*. *J Neurooncol*, 2000. **46**(2): p. 145-50.
77. Pober, J.S., *Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells*. *Ciba Found Symp*, 1987. **131**: p. 170-84.
78. Barth, R.F., *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas*. *J Neurooncol*, 1998. **36**(1): p. 91-102.
79. Goldbrunner, R.H., et al., *Transfection and dye premarking of human and rat glioma cell lines affects adhesion, migration and proliferation*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(6D): p. 4467-71.
80. Li, Z., et al., *Murine leukemia induced by retroviral gene marking*. *Science*, 2002. **296**(5567): p. 497.
81. Marshall, E., *Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia*. *Science*, 2003. **299**(5605): p. 320.
82. Kaiser, J., *Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial*. *Science*, 2003. **299**(5606): p. 495.
83. Kaiser, J., *Gene therapy. RAC hears a plea for resuming trials, despite cancer risk*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 991.
84. Stolberg, S.G., *Trials are halted on gene therapy: child in experiment falls ill--new setback for research*. *NY Times (Print)*, 2002: p. A1, A25.
85. Stolberg, S.G., *Panel advises resuming genetic studies: U.S. agency halted trials after boy fell ill in French experiment*. *NY Times (Print)*, 2002: p. A30.
86. Hargreaves, S., *Rules on gene therapy are tightened after leukaemia alert*. *Bmj*, 2002. **325**(7368): p. 791.
87. Check, E., *A tragic setback*. *Nature*, 2002. **420**(6912): p. 116-8.

88. Bonetta, L., *Leukemia case triggers tighter gene-therapy controls*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1189.
89. Kaiser, J., *Gene therapy. RAC's advice: proceed with caution*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2113-5.
90. Strauss, B.E. and E. Costanzi-Strauss, *Efficient retrovirus-mediated transfer of cell-cycle control genes to transformed cells*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(7): p. 905-14.
91. Sherman, M.L., et al., *Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism*. J Clin Oncol, 1988. **6**(2): p. 344-50.
92. Bartsch, H.H., et al., *[Systemic versus local therapy with recombinant tumor necrosis factor-alpha (r-TNF-alpha) in patients with advanced tumors]*. Onkologie, 1989. **12**(3): p. 136-41.
93. Schiller, J.H., et al., *Biological and clinical effects of intravenous tumor necrosis factor-alpha administered three times weekly*. Cancer Res, 1991. **51**(6): p. 1651-8.
94. Bartsch, H.H., et al., *Intralesional application of recombinant human tumor necrosis factor alpha induces local tumor regression in patients with advanced malignancies*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. **25**(2): p. 287-91.
95. Blankenstein, T., et al., *Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1047-52.
96. Wright, P., et al., *Intratumoral vaccination of adenoviruses expressing fusion protein RM4/tumor necrosis factor (TNF)-alpha induces significant tumor regression*. Cancer Gene Ther, 1998. **5**(6): p. 371-9.
97. Gunzburg, W.H. and B. Salmons, *Factors controlling the expression of mouse mammary tumour virus*. Biochem J, 1992. **283** ( Pt 3): p. 625-32.
98. Salmons, B., et al., *The endogenous mouse mammary tumour virus locus Mtv-8 contains a defective envelope gene*. Virus Res, 1986. **4**(4): p. 377-89.
99. Jaggi, R., et al., *The v-mos and H-ras oncogene expression represses glucocorticoid hormone-dependent transcription from the mouse mammary tumor virus LTR*. Embo J, 1986. **5**(10): p. 2609-16.
100. Walther, W., I. Fichtner, and W. Uckert, *Retrovirus-mediated gene transfer of tumor necrosis factor alpha into colon carcinoma cells generates a growth inhibition*. Anticancer Res, 1993. **13**(5A): p. 1565-73.
101. Wright, P., et al., *Adenovirus-mediated TNF-alpha gene transfer induces significant tumor regression in mice*. Cancer Biother Radiopharm, 1999. **14**(1): p. 49-57.
102. Haranaka, K. and N. Satomi, *Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells in vitro*. Jpn J Exp Med, 1981. **51**(3): p. 191-4.
103. Sugarman, B.J., et al., *Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro*. Science, 1985. **230**(4728): p. 943-5.
104. Harada, K., et al., *Growth inhibition of subcutaneously transplanted human glioma by transfection-induced tumor necrosis factor-alpha and augmentation of the effect by gamma-interferon*. J Neurooncol, 1994. **22**(3): p. 221-5.
105. Tapscott, S.J., et al., *Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8185-9.
106. Ko, L., A. Koestner, and W. Wechsler, *Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones*. Acta Neuropathol (Berl), 1980. **51**(1): p. 23-31.
107. von Eckardstein, K.L., et al., *Short-term neuropathological aspects of in vivo suicide gene transfer to the F98 rat glioblastoma using liposomal and viral vectors*. Histol Histopathol, 2001. **16**(3): p. 735-44.

108. Ryuto, M., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1.* J Biol Chem, 1996. **271**(45): p. 28220-8.
109. Bian, X.W., et al., *Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas.* Anal Quant Cytol Histol, 2000. **22**(3): p. 267-74.
110. Bernsen, H.J., et al., *Delayed vascular changes after antiangiogenic therapy with antivascular endothelial growth factor antibodies in human glioma xenografts in nude mice.* Neurosurgery, 1998. **43**(3): p. 570-5; discussion 575-6.
111. Kirsch, M., et al., *Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo.* Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4654-9.
112. Jensen, R.L., *Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review.* Surg Neurol, 1998. **49**(2): p. 189-95; discussion 196.
113. Proescholdt, M.A., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain.* J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(6): p. 613-27.
114. Facchetti, A., E. Capelli, and R. Nano, *HLA class I molecules expression: evaluation of different immunocytochemical methods in malignant lesions.* Anticancer Res, 2001. **21**(4A): p. 2435-40.
115. Kuppner, M.C., et al., *Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on human glioblastoma cells.* Clin Exp Immunol, 1990. **81**(1): p. 142-8.
116. Kondo, S., et al., *Tumour necrosis factor-alpha induces an increase in susceptibility of human glioblastoma U87-MG cells to natural killer cell-mediated lysis.* Br J Cancer, 1994. **69**(4): p. 627-32.
117. Ito, A., et al., *Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia.* Cancer Immunol Immunother, 2001. **50**(10): p. 515-22.
118. Stocking, C., et al., *Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line.* Growth Factors, 1993. **8**(3): p. 197-209.

6 Tabellenanhang

Tabelle 2a

<i>TNF<math>\alpha</math>-Bioassay: F98-WT + hTNF<math>\alpha</math>-Standard</i>												
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>2000</i>			<i>1000</i>			<i>500</i>			<i>250</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,108	0,108	0,107	0,1	0,107	0,103	0,112	0,101	0,114	0,11	0,092	0,111
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>125</i>			<i>62,5</i>			<i>31,25</i>			<i>15,6</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,098	0,104	0,121	0,122	0,122	0,149	0,121	0,129	0,166	0,116	0,107	0,118
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>7,8</i>			<i>3,9</i>			<i>1,95</i>			<i>0,98</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,098	0,103	0,151	0,119	0,111	0,132	0,121	0,111	0,117	0,116	0,093	0,097
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>0,49</i>			<i>0,25</i>			<i>0,125</i>			<i>0,063</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,112	0,112	0,132	0,122	0,115	0,133	0,114	0,121	0,108	0,125	0,114	0,103
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>0 (Kontrolle)</i>			<i>0 (Kontrolle)</i>								
<b>OD 540 nm</b>	0,114	0,118	0,132	0,116	0,121	0,11						

Tabelle 2b

<i>TNF<math>\alpha</math>-Bioassay: L929 + hTNF<math>\alpha</math>-Standard</i>												
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>2000</i>			<i>1000</i>			<i>500</i>			<i>250</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,084	0,074	0,075	0,076	0,069	0,073	0,08	0,08	0,074	0,079	0,082	0,081
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>125</i>			<i>62,5</i>			<i>31,25</i>			<i>15,6</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,096	0,072	0,085	0,087	0,083	0,086	0,094	0,096	0,091	0,092	0,098	0,095
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>7,8</i>			<i>3,9</i>			<i>1,95</i>			<i>0,98</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,098	0,107	0,102	0,113	0,114	0,118	0,13	0,123	0,131	0,121	0,115	0,122
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>0,49</i>			<i>0,25</i>			<i>0,125</i>			<i>0,063</i>		
<b>OD 540 nm</b>	0,134	0,145	0,138	0,165	0,143	0,149	0,149	0,159	0,143	0,13	0,141	0,142
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>0 (Kontrolle)</i>			<i>0 (Kontrolle)</i>								
<b>OD 540 nm</b>	0,18	0,184	0,179	0,157	0,164	0,151						

Tabelle 2c

<i>TNF<math>\alpha</math>-Bioassay: L929 + hTNF<math>\alpha</math>-Standard bzw. Überstand F98-hTNF<math>\alpha</math></i>												
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>500 (Standard)</i>			<i>250 (Standard)</i>			<i>125 (Standard)</i>			<i>62,5 (Standard)</i>		
<b>OD 450 nm</b>	0,061	0,059	0,059	0,056	0,059	0,057	0,06	0,062	0,058	0,195	0,137	0,157
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>31,25 (Standard)</i>			<i>15,6 (Standard)</i>			<i>7,8 (Standard)</i>			<i>3,9 (Standard)</i>		
<b>OD 450 nm</b>	0,509	0,506	0,496	0,614	0,6	0,567	0,701	0,603	0,699	0,706	0,651	0,617
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>1,95 (Standard)</i>			<i>0,98 (Standard)</i>								
<b>OD 450 nm</b>	0,676	0,658	0,616	0,675	0,698	0,779						

<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>Überstand F98-hTNF<math>\alpha</math> 24 h</i>			<i>Überstand F98-hTNF<math>\alpha</math> 48 h</i>								
<b>OD 450 nm</b>	0,607	0,635	0,669	0,305	0,306	0,321						
<i>TNF<math>\alpha</math> pg/ml</i>	<i>0 (Kontrolle)</i>			<i>0 (Kontrolle)</i>			<i>Leerwert</i>			<i>Leerwert</i>		
<b>OD 450 nm</b>	0,966	1,005	0,89	0,82	0,875	0,856	0,042	0,038	0,038	0,043	0,038	0,039

**Tabelle 3**

<i>Tier</i>	<i>F98-Linie</i>	<i>Tod</i>	<i>Klinik</i>
Tier 1	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 2	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 3	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 4	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 5	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 6	<b>F98-WT</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 1	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier hemiplegisch
Tier 2	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier hemiplegisch
Tier 3	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier präfinal
Tier 4	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier präfinal
Tier 5	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier präfinal
Tier 6	<b>F98-hTNFa</b>	elektiv am 20.07.2000	Tier präfinal
Tier 1	<b>F98-pWG</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 2	<b>F98-pWG</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 3	<b>F98-pWG</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 4	<b>F98-pWG</b>	tot aufgefunden am 19.07.2000	bis 19.07.00 kein neurologisches Defizit
Tier 5	<b>F98-pWG</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit
Tier 6	<b>F98-pWG</b>	elektiv am 20.07.2000	kein neurologisches Defizit

**Tab. 3: Am 13.07.2000 bekamen alle Tiere 10 µl 5x 10<sup>6</sup> Tumorzellen der entsprechenden Zellreihe in das Marklager des rechten Frontalhirns appliziert. Mit Eintritt der neurologischen Symptomatik in der F98-hTNFa Gruppe wurden alle Tiere am 20.07.2000 elektiv aus dem Versuch genommen.**

**Tabelle 4**

<i>Tier-Nr.</i>	<i>F98-WT</i>	<i>F98-LV</i>	<i>F98-hTNFa</i>
<i>1</i>	32,1 mm <sup>2</sup>	198,1 mm <sup>2</sup>	537,1 mm <sup>2</sup>
<i>2</i>	17,1 mm <sup>2</sup>	176,9 mm <sup>2</sup>	497,9 mm <sup>2</sup>
<i>3</i>	37,1 mm <sup>2</sup>	79,8 mm <sup>2</sup>	518,8 mm <sup>2</sup>
<i>4</i>	28,2 mm <sup>2</sup>	356,8 mm <sup>2</sup>	532,6 mm <sup>2</sup>
<i>5</i>	103,6 mm <sup>2</sup>	366,6 mm <sup>2</sup>	508,1 mm <sup>2</sup>
<i>Mittelwert</i>	<b>43,6 mm<sup>2</sup></b>	<b>235,6 mm<sup>2</sup></b>	<b>518,9 mm<sup>2</sup></b>

**Die Tabelle zeigt die Rohwerte sowie die daraus errechneten Mittelwerte der Flächeninhalte der verschiedenen Tumorgruppen F98-WT, F98-pWG und F98-hTNFa.**

### **Danksagung**

Zuerst und in besonderem Maße möchte ich mich bei Frau Samira Seghrouchni bedanken, die mir in den vergangenen vier Jahren jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne sie wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr großes Engagement werde ich ihr nicht vergessen.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Michael Sabel, der die Betreuung meiner Arbeit zu einem kritischen Zeitpunkt übernommen und mit mir zu einem erfolgreichen Abschluß geführt hat.

Bei Herrn Dr. W. Walther und seinen Mitarbeitern des Max-Delbrück-Zentrum in Berlin bedanke ich mich sehr für die ausgesprochen unkomplizierte Zusammenarbeit und die jederzeit freundliche Unterstützung.

Bei Herrn PD Dr. med. Christof Kramm bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferates sowie seine stets fundierte Kritik.

Herrn Dr. Reinhart Willers möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Analyse einen herzlichen Dank sagen.

Frau Susanne Beyer gebührt ebenfalls besonderer Dank für Ihre bedingungslose Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. T. Bilzer danke ich sehr für seinen fachlichen Rat.

## Lebenslauf

---

### Lebenslauf

**Name:** Frank-Tim Uhden

**Geburtsdatum:** 27.09.1972

**Geburtsort:** Kassel

**Eltern:** Michael Uhden  
Christiane Uhden, geb. Kalbfuß

**Familienstand:** ledig

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulbildung:** 1979-1983  
Friedrich-von-Bodelschwing Grundschule in  
Düsseldorf-Oberkassel

1983-1992  
Cecilien-Gymnasium in Düsseldorf-Oberkassel

**Schulabschluss:** Abitur (Juni 1992)

**Zivildienst:** 1992-1994  
Zivildienst in der Evangelischen Kirchengemeinde in  
Düsseldorf-Oberkassel

**Studium:**

1994 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Herbst 1996 Ärztliche Vorprüfung

Herbst 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1998 Beginn der Promotionsarbeit an der Neurochirurgischen Klinik der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Herbst 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000 – 2001 Praktisches Jahr am Lukaskrankenhaus in Neuss

November 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Neuss

seit August 2002 Arzt im Praktikum Medizinische Klinik I/II des Kreiskrankenhauses  
St. Elisabeth in Grevenbroich

***Famulaturen:***

- 02/97                    Chirurgische-Praxis Dr. Klaus Thiele, Wolfenbüttel
- 02/98                    Neurochirurgische Klinik  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, CA Prof. Dr. W. Bock
- 07/98                    Chirurgische Ambulanz, Florence Nightingale Krankenhaus  
Kaiserswerth, CA Prof. Dr. Schultheis
- 08/98                    Abteilung für Allgemein- und Thoraxchirurgie  
Florence Nightingale Krankenhaus Kaiserswerth, CA Prof. Dr.  
Schultheis

***Praktisches Jahr am Lukaskrankenhaus in Neuss:***

- Erstes Tertial*            Abteilung für Allgemein- und Thoraxchirurgie, CA Prof. Dr. Coburg
- Zweites Tertial*            Klinik für Kinder und Jugendliche, CA Prof. Dr. Kühl
- Drittes Tertial*            Medizinische Klinik II (Schwerpunkt Gastroenterologie und  
Pulmologie), CA Prof. Dr. Czygan

***Praktika:***

- Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe  
St. Martinus Krankenhaus Langenfeld, CA Dr. Hördemann
- Praxis für Allgemeinmedizin Dres. Jörgenshaus/ Sohn, Schwalmtal  
(Niederrhein)

***Fortbildungen:***

- Sonographie-Kurs, Institut für Diagnostische Radiologie der Heinrich-  
Heine-Universität Düsseldorf

## Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von F98 Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* nach stabiler Transduktion mit cDNA für humanen Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF $\alpha$ )

*Einleitung:* Der häufigste und gleichzeitig bösartigste hirneigene Tumor ist das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV). Mit einer mittleren Überlebenszeit von ungefähr 11 Monaten trotz maximaler Therapie gehört dieser Tumor zu den bösartigsten Tumoren des Menschen überhaupt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der retroviralen Transfektion von F-98 Gliomzellen mit humanem Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF $\alpha$ ) auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen *in vitro* und *in vivo* bzw. mit der Frage, ob genetische Manipulationen am Genom einer Zelle mit Hilfe von retroviralen Vektoren grundlegende Zellcharakteristika verändern kann. Bei TNF $\alpha$  handelt sich um ein multipotentes, proinflammatorisches Zytokin mit einer ganzen Reihe physiologischer Effekte einschließlich zytotoxischer Effekte gegen viele maligne Zellen *in vitro* und *in vivo*.

*Methoden:* Der pWG29-del170hTNF $\alpha$  (F98-hTNF $\alpha$ ) bzw. pWG29-del170 (Leervektor/ F98-pWG) Vektor wurde mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Prezipitation Methode in die F98-Gliomzellen eingeführt. Neomycin resistente Zellen wurden in G418 enthaltendem Medium selektioniert. Die Verifizierung des Transfektionserfolges erfolgte durch RT-PCR. Die hTNF $\alpha$ -Expression wurde durch einen *in vitro* TNF-Elisa gesichert, die *in vitro* Zellproliferationsrate mit Hilfe des MTT-Test bestimmt. Die Testung der F98-Gliomzellen auf Sensibilität gegenüber hTNF $\alpha$  erfolgte durch einen TNF $\alpha$ -Bioassay. Für die *in vivo* Versuche erfolgte bei 6 Tieren eine Implantation von  $5 \times 10^5$  F98-hTNF $\alpha$  Gliomzellen in das Marklager des rechten Frontalhirns. Als Kontrollgruppe erhielten jeweils 6 Tiere  $5 \times 10^5$  F98-pWG bzw.  $5 \times 10^5$  F98-„Wildtyp“ (F98-WT) Gliomzellen.

*Ergebnisse:* Beide transfizierten Zellreihen (F98-pWG, F98-hTNF $\alpha$ ) wiesen *in vitro* eine langsamere Wachstumsrate im Vergleich zu den Zellen des Wildtyps auf. Alle 6 Tiere, die die transfizierten Gliomzellen F98-hTNF $\alpha$  erhalten hatten, zeigten 7 Tage nach Implantation eine massive neurologische Verschlechterung. Alle Tiere der Kontrollgruppe waren asymptotisch und neurologisch unauffällig. Sämtliche entnommenen Gehirne wiesen einen soliden rechtshemisphärischen Tumor im Bereich des Cortex oder der Stammganglien auf. Die durchschnittliche Tumorfläche betrug  $518 \text{ mm}^2$  für F98-hTNF $\alpha$ ,  $235 \text{ mm}^2$  für F98-pWG und  $43 \text{ mm}^2$  für F98-WT. Der quantitative Nachweis von hTNF $\alpha$ -Protein im implantierten Tumorgewebe durch einen TNF $\alpha$ -Elisa zeigte für die Gehirne der F98-hTNF $\alpha$  Gruppe eine im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen annähernd 15-fach höhere Konzentration an hTNF $\alpha$ -Protein.

*Diskussion:* Im Gegensatz zur langsameren Wachstumsrate der beiden transfizierten Zellreihen *in vitro*, zeigten beide genmanipulierten Zellreihen F98-hTNF $\alpha$  und F98-pWG *in vivo* einen im Vergleich zum „Wildtyp“ durchaus als dramatisch einzustufenden Unterschied in der Größenentwicklung der Tumore. Zur Erklärung dieses Phänomens kann der Prozeß der reinen Transfektion herangezogen werden. Daß ein retroviraler Vektor an einer beliebigen, nicht vorhersehbaren Stelle innerhalb des Genoms der Wirtszelle integrieren kann, ist bekannt. Das Risiko durch Insertion eines Transgens einen malignen Phänotyp auszulösen, liegt laut Literatur bei ungefähr  $10^{-7}$  pro Insertion. Ganz im Gegensatz zu dieser Häufigkeitsannahme stehen aktuelle Berichte über das Auftreten von mittlerweile drei Leukämiefällen nach retroviraler Infektion in einer klinischen Studie zur gentherapeutischen Behandlung von Kindern mit *X-linked-SCID* im Necker-Hospital-for-Sick-Children in Paris. Da die Herstellung der in unserer Arbeit verwendeten stabilen Zelllinien jedoch durch Transfektion und nicht durch retrovirale Infektion stattgefunden hat, kann das besondere onkogenetische Potential von Retroviren keine entscheidende Rolle bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse spielen. Dennoch begründet das von uns beobachtete explosive Wachstum beider manipulierter Zellreihen *in vivo* den dringenden Verdacht, daß dies auf eine Veränderung grundlegender Zellcharakteristika wie z.B. der Migrations- oder Proliferationsfähigkeit bzw. der für die Regulation des Zellwachstums verantwortlichen DNA-Sequenzen insgesamt durch die genetische Manipulation zurückzuführen ist.