

2 Einleitung

2.1 Hintergrund: Karzinogenese

Normalerweise sind die Zellen eines intakten multizellulären Organismus auf Zusammenarbeit und Kooperation programmiert. Neoplastisch transformierte Zellen geben nicht nur ihre spezialisierte Funktion und ihre Funktion im Gewebe ihrer Herkunft auf, sondern sie konkurrieren darüber hinaus auch mit den gesunden Zellen. Durch eine initiale genetische Veränderung, vererbt oder erworben, und durch Akkumulation von weiteren genetischen Veränderungen und ihrer nachfolgenden Selektion, erwerben Krebszellen einen Überlebens- und Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen, der durch invasives und destruktives Wachstum sowie Metastasierung gekennzeichnet ist.

Nach der in Grundzügen schon 1976 aufgestellten und bis heute gültigen Mehrschritthypothese zur malignen Transformation von Zellen bei der Karzinogenese (Abbildung 2-1 und Referenzen 1, 2) erfolgt die maligne Transformation über mehrere Transformationsstufen bis zum Vorliegen eines neoplastischen Klon, der alle Kriterien einer malignen Neoplasie wie invasives und destruktives Wachstum und metastatisches Potential erfüllt (3).

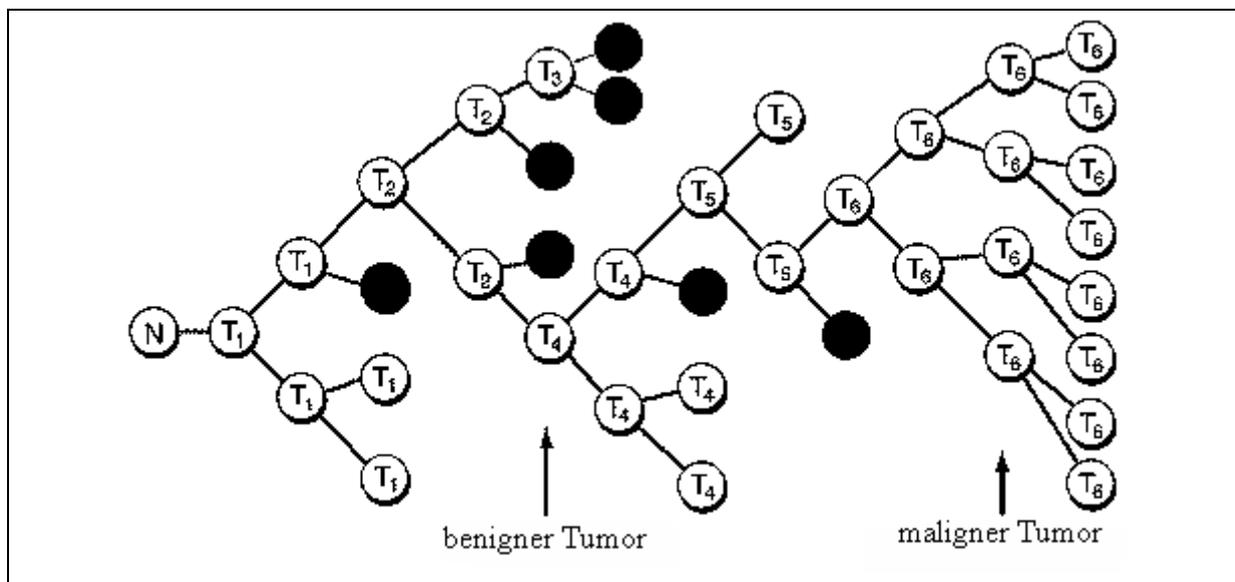


Abbildung 2-1: Entwicklung einer normalen Zelle zu einem malignen Zellklon. Mit jeder der fünf kumulierenden Mutationen (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆), erwirbt eine Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen. Nicht alle Mutationen resultieren jedoch in einem solchen Vorteil. So endet die Entwicklung von Klon

T3 in einer Sackgasse. (Modifiziert nach „The clonal evolution of tumor cell populations“, P.Nowell 1976, Science (3),. „The multistep nature of cancer“, Vogelstein 1993, Trends Genetics. (4)) und “Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma”, Arends 2000, J Pathol (2).

Die Karzinogenese ist also kein singuläres Ereignis, sondern eine Serie somatischer Mutationen in unterschiedlichen Genen, die über mehrere Jahre hinweg kumulieren (3, 4). Durch jede dieser diskreten zellulären Veränderungen kann eine Zelle weitere Wachstumsvorteile gegenüber ihren Nachbarn erlangen. Im transformierten Gewebe findet eine Art Mikroevolution statt, bei der sich die Zellen mit dem größten Wachstumsvorteil durchsetzen. Fortschreitende Veränderungen wie Punktmutationen, chromosomale Translokation und Amplifikation von Genabschnitten können zur Inaktivierung und Suppression von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung und Überexpression von Onkogenen führen. Folge davon sind eine autonome Zellregulation und klonales neoplastisches Wachstum. Zellfunktionen und -teilung erfolgen losgelöst von einer übergeordneten Regulation und sind nicht mehr durch externe Signale beeinflussbar.

Das darauf folgende unregulierte Zellwachstum verursacht neoplastisches Wachstum. Der entscheidende Wendepunkt in der Entstehung von Krebs (und damit auch für den Patienten) ist aber die Initiation von lokaler Invasion und tumorinduzierter Neovaskularisation als Grundlage der Dissemination von Tumorzellen. Jedoch haben weniger als 0,05 Prozent der zirkulierenden Tumorzellen das Potential zu metastasieren. Invasion, die durch die drei Vorgänge der lokalen Proteolyse, der zellulären Adhäsion und sowie der Migration gekennzeichnet ist, ist die aktive Bewegung von neoplastischen Zellen über Gewebearrieren und extrazelluläre Matrix. Eine erfolgreiche Metastasierung erfordert darüber hinaus, daß die Zellen an einem zweiten Ort erfolgreich Kolonien bilden können und sie dort die lokalen und systemischen Abwehrmechanismen überwinden.

Die geschilderte Abfolge von Tumorinitiation, Invasion und Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von biochemischen und genetischen Ereignissen und deren Auswirkungen auf unterschiedliche Signaltransduktionswege. Meist sind hierbei zunächst diejenigen Signalwege betroffen, über die eine Apoptose ausgelöst werden kann und über die sich der geschilderte Überlebensvorteil für die Zellen ergibt, so

daß sich weitere Mutationen in diesem vor Zelltod geschützten Zellklon ereignen können.

Neben der Einengung des Tumorzellpools durch die Selektion schnellwachsender adhärenter Zellklone bei der Kultivierung, tritt eine weitere Einengung des Pools schon bei Dissoziation des Tumorgewebes in eine Einzelzellsuspension auf, einem wichtigen Arbeitsschritt bei der Herstellung der Vakzine (Abbildung 2-2 zur Abfolge der Arbeitsschritte bei der Herstellung der Vakzine). Dabei wird bei einem Teil der Tumorzellen Apoptose durch Unterbrechung der Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen ausgelöst. So kann gezeigt werden, daß Epithelzellen, wenn man sie der Möglichkeit beraubt an einen Träger oder eine Matrix anzuhafte, innerhalb von 12-24 Stunden in Apoptose übergehen (4). Diese spezielle Form der Apoptose wird Anoikis (altgriechisch für Heimatlosigkeit) genannt. Bei den meisten nicht transformierten Zelltypen, vielleicht abgesehen von Fibroblasten, die deshalb häufig in Gentherapiestudien verwendet werden, schlagen Versuche, sie zu kultivieren auch dann häufig fehl, wenn sie mit optimierten Zellkulturmedien angezüchtet werden sollen. Viele Zelltypen sind also auf ständig auf sie einwirkende Überlebenssignale angewiesen. Erhalten sie diese Signale nicht, erfolgt der individuelle oder zelltypspezifische Zelltod durch Apoptose (Tod durch Vernachlässigung, death by neglect) (5). Dieses Prinzip trägt im intakten Organismus zur Gewebeintegrität und der übergeordneten Regulation der Größe von Zellpopulationen durch lösliche Mediatoren bei und verhindert z.B. nach einer Traumatisierung bei metastatischer Verschleppung von normalem gesunden Gewebe dessen Wiederanwachsen an falscher Stelle im Sinne einer autologen Heterotransplantation. Umgekehrt wäre eine Störung dieser Funktion eine notwendige Voraussetzung für die Metastasierung. Andere Überlebenssignale kommen aus der unmittelbaren Umgebung. Zellen, die unmittelbar auf der Basalmembran aufsitzen, wie z.B. Drüsenepithelien und Endothelien, erhalten unter anderem über den direkten Zell-Matrix-Kontakt ihr Überlebenssignal. Maligne transformierte Zellen werden resistenter gegen diese Art der Apoptose. So konnten Frisch et al. (4) zeigen, daß Epithelien nach Transformation mit Onkogenen, wie v-Ha-ras oder v-src, matrixunabhängig wuchsen, jedoch nach reverser Transformation wieder apoptosesensitiv wurden. Selbst maligne Zellen können also nur dann lymphogen oder hämatogen metastasieren, wenn sie in der Lage sind in Suspension zu überleben.

2.2 Einführung zum Thema Gentherapie

2.2.1 Definition der Gentherapie

Gentherapie kann als Transfer neuen genetischen Materials in die Zellen eines Individuums, gefolgt von einem therapeutischen Effekt auf dieses Individuum definiert werden (6). Als Vektoren werden gentechnisch modifizierte Viren (z.B. Retroviren, Adenoviren oder Herpes-simplex-Viren Typ1), oder auf Plasmid-DNA basierende Expressionssysteme eingesetzt, die durch chemische oder physikalische Methoden in eine Zelle transferiert werden.

Methodische Probleme der Gentherapie sind die bislang geringe Transfektionseffizienz (max. 10% der Zielzellen bei retroviralen Vektoren) und die unbefriedigende Zellspezifität der Therapie. Weitere Probleme sind die begrenzte in vivo Lebensdauer transfizierter Zellen und die damit nur temporäre Expression der therapeutischen Gene. Hinzu kommen Probleme durch Immunreaktionen. Eine solche Immunreaktion kann sich gegen die Vektoren, bestimmte DNA-Sequenzen oder Vektorbestandteile wie die Virushülle oder andere Virusbestandteile, die an den transfizierten Zellen haften oder von ihnen gebildet werden, richten. Ein weiteres Ziel des Immunsystems kann das Genprodukt selbst sein. Dies wäre bei der Krebstherapie, durch Immunreaktion gegen die Tumorzellen, um diese zu vernichten, erwünscht. Ist jedoch die Korrektur einer fehlerhaften Funktion Ziel der Genübertragung, so ist jede Reaktion des Immunsystems, die zur Verminderung der Transfektionsrate, zur Elimination transfizierter Zellen oder zur Neutralisierung des Impfstoffs durch Immunisierung gegen den Vektor selbst führt, unerwünscht. Ein Beispiel für einen solchen Therapieansatz ist die Übertragung des Gens für den CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), einem durch Phosphorylierung regulierten Chlorid-Ionenkanal der apicalen Membran von Epithelzellen, der bei der Zystischen Fibrose mutiert ist und dessen fehlerhafte Funktion zu den schweren Symptomen der Erkrankung führt.

Die Gentherapie ist deshalb zur Zeit noch eine experimentelle Therapieform. Eine Zielsetzung ist die Ausschaltung oder Modifikation von genbedingten Fehlfunktionen bzw. die Wiederherstellung einer normalen Genfunktion bei Erkrankungen, die durch Elimination oder Bereitstellung eines oder mehrerer Genprodukte zu beeinflussen sind und für die keine ausreichend effektive andere Behandlungsmethode besteht.

Unter genetisch (mit-)bedingten Krankheiten versteht man monogene Erbkrankheiten, polygene oder komplexe Erkrankungen, chromosomale Anomalien und die durch somatische Mutationen verursachten sogenannten sporadischen Krebserkrankungen, die 95% der Krebserkrankungen verursachen.

Etwa 6000 Krankheiten werden nach heutiger Schätzung durch einen Schaden in nur einem einzigen Gen verursacht (7). Diese monogen vererbten Krankheiten sind jedoch bezüglich der Patientenzahlen der kleinere Teil der genetisch verursachten Krankheiten. Manche von ihnen lassen sich bereits konventionell behandeln, z. B. durch phenylalanin-arme Diät bei der Phenylketonurie oder Substitution von Faktor VIII bei der Hämophilie A. Die häufigste autosomal rezessiv vererbte Krankheit ist die Zystische Fibrose mit einer Häufigkeit von ca. 1/2500 Geburten. Insgesamt sind monogen vererbte Krankheiten sehr selten.

Die Überwiegende Zahl von Erkrankungen wird durch Mutationen in einer größeren Anzahl von Genloci sowie durch weitere exogene und endogene Faktoren verursacht. Hierzu gehören Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie Arteriosklerose, Herzinfarkt, Hypertonie und Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und Fettsucht, sowie neurodegenerative Erkrankungen, Asthma und Krebs. Diesen multifaktoriell ausgelösten Erkrankungen liegen neben genetischen auch nicht genetische Ursachen zugrunde. Das zum Ausbruch führende komplexe Verhältnis von genetischen Faktoren zu Umweltfaktoren, wie Schadstoffen oder einseitiger Ernährung, ist nicht genau geklärt (8).

2.3 Übersicht über Gentherapiestrategien und Beispiele für Kandidatengene

2.3.1 Substitutionstherapie

Bei einer monogenetischen Erkrankung wird das defekte Gen durch Transfer eines gesunden Gens substituiert. Hierdurch sollen zelluläre und funktionelle Defekte ausgeglichen werden. Einige Beispiele, bei denen durch Transfer eines Gens in hämatopoetische Stammzellen ein Defekt ausgeglichen werden könnte werden in der Tabelle 2-1 dargestellt.

Erkrankung	Defektes Gen
Schwere kombinierte Immundefizienz	Adenosindesaminase
Morbus Gaucher	Glykozerebrosidase

Chronisch granulomatöse Erkrankung	Glykoprotein 91 phox
Leukozytenadhäsionsdefizienz	CD18
Thalassämie	β -Globin
Sichelzellanämie	β -Globin
Fanconie-Anämie	FAC
Hämophilie A und B	Faktor VIII und IX

Tabelle 2-1: Einige Beispiele für monogenetische Erkrankungen.

2.3.2 Vermittlung einer zusätzlichen Funktion

Bösartige Tumore: Transfer von Genen, die für Zytokine, Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) oder kostimulatorische Moleküle kodieren. Die Suche nach einer möglichst effizienten und spezifisch auf die Tumorzelle ausgerichteten Therapie, die das konventionelle Tumorthherapie-Design bestimmt, ist auch die Grundlage für gentherapeutische Ansätze. Die Gentherapie erlaubt im Vergleich mit einer Chemotherapie ein höheres Maß an Regulierbarkeit und damit an Spezifität. Zugleich ist die Gentherapie störanfälliger und benötigt eine gute Feinabstimmung der Komponenten, um die gewünschte Wirkung zu erzielen. Man kann Gentherapiestrategien im engeren Sinne, die auf eine möglichst vollständige Ausmerzungen der Tumorzellen zielen, von supportiven Maßnahmen zum Schutz des normalen Körpergewebes vor den Effekten der konventionellen Therapie, wie z.B. der Chemotherapie, unterscheiden. Bei diesem Therapieansatz sollen die Tumorzellen empfindlicher gegenüber den Chemotherapeutika werden, damit die Dosis bei gleichem Effekt vermindert werden kann.

Herzkreislauferkrankungen: Förderung der Angiogenese und Revaskularisation bei Arteriosklerose und Herzinfarkt

Infektionserkrankungen: Retrovirale Erkrankungen (z.B. AIDS): Bildung antiviraler Enzyme.

2.4 Suizidgentherapie

Bei dieser In-Vivo-Strategie überträgt man ein Chemosensibilität vermittelndes Gen auf die Tumorzellen, die dann durch Gabe eines nur in den Tumorzellen wirksamen und dadurch nebenwirkungsarmen Medikaments abgetötet werden. Im Fall des zur Zeit am häufigsten eingesetzten Transgenes, dem Gen kodierend für die Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-tk), phosphoryliert das in den Tumorzellen gebildete Enzym zusammen mit zelleigenen Enzymen extern appliziertes

Gancyclovir zum toxischen Gancyclovir-Triphosphat, welches im wesentlichen durch Hemmung der DNA-Polymerase zum Zelltod führt. Aufgrund eines in seinem Mechanismus noch nicht ganz geklärten sog. Bystander-Effekts werden auch nicht transfizierte Zellen in Nachbarschaft genetisch modifizierter Zellen getötet. Dies relativiert geringfügig die sonst kaum erreichbare Bedingung für diesen Therapieansatz: eine in vivo Transfektionseffizienz von 100%. Ferner erfordert diese Methode eine hohe Spezifität des Transfersystems für Tumorzellen, um nicht auch auf gesunde Zellen die Chemosensibilität zu übertragen.

2.5 Tumorsuppressor- und Anti-Onkogenentherapie

Dieser Therapieansatz zielt auf eine Substitution verlorengegangener Suppressorgene oder die Ausschaltung einer Onkogenexpression. Unter Berücksichtigung der Theorie der Mehrschrittkanzerogenese geht man nicht davon aus, die Krebszelle wieder durch Übertragung eines Gens zurück zu ihrer normalen Funktion zu führen, sondern man sieht die Therapie als zytotoxisch an. Durch eine Korrektur eines Einzelschrittes in der Kanzerogenese soll die Zellproliferation gestört werden bzw. die soll Zelle ihre Fehlregulierung „erkennen“ und mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose, darauf reagieren. Auch dieser Therapieansatz stellt hohe Anforderungen an die Gentransfermethode. Auch hier müsste ohne den erwähnten Bystander-Effekt eine 100% Gentransferrate erzielt werden.

2.6 Supportive Getherapiemaßnahmen

Eine z.B. auf hämatopoetische Stammzellen abzielende Maßnahme wäre die Einschleusung eines sog. „Multidrug-Resistance-Gens“ welches nach der Re-Transplantation in den Patienten die deletären Auswirkungen einer Hochdosis-Chemotherapie auf das Knochenmark lindern würde. Neben Anforderungen an die Effizienz des Gentransfers müssen auch besonders hohe Ansprüche an die Sicherheit der Konstrukte gestellt werden, da bei einem Sekundärtumor des hämatopoetischen Systems die „Multidrug-Resistance“ fatale Auswirkungen hätte. Einen Ausweg hierfür scheinen genetische Schalter zu bieten, mit denen die „Multidrug-Resistance“ durch eine harmlose Substanz ein- und aus geschaltet werden kann. (9)

2.7 Aktive Krebs-Immungentherapie

Unter aktiver Krebs-Immungentherapie versteht man eine Therapie, die primär über die Mediatoren des natürlichen Abwehrsystems wirkt.

Die gezielte Aktivierung des Immunsystems zu einer effizienten Antitumorantwort überträgt die schwierigste Aufgabe der Krebstherapie, die Spezifität und Effizienz, den immunologischen Effektoren. Im zellulären System sind dies Antigen-Präsentierende-Zellen (APC), zytotoxische T-Zellen (ZTL) und Natürliche Killerzellen (NK) und im humoralen Arm des Immunsystems die durch B-Lymphozyten gebildeten Antikörper.

Die Anforderungen an den Vektor werden dadurch herabgesetzt. Die benötigte Transfektionsrate darf niedriger sein als bei den bisher geschilderten Ansätzen, eine transiente Transfektion ist hier möglich. Der Vorteil der Immungentherapie gegenüber der nicht genetisch vermittelten Immuntherapie, bei der das Immuntherapeutikum systemisch appliziert wird, besteht in der Verringerung der Nebenwirkungen, die bei manchen Immuntherapien erheblich ist (10, 11, 12). Das am weitesten verbreitete Verfahren ist die Tumorzellvaksinierung mit autologen oder allogenen bestrahlten Tumorzellen, die ex vivo oder auch in vivo mit Zytokin-, MHC- oder kostimulatorischen Genen transfiziert werden, um so eine systemische Immunantwort zu stimulieren. Ein anderer Ansatz versucht durch Gentransfer in vitro expandierte tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), deren Tumor-erkennende und -zerstörende Wirkung zu erhöhen. Im folgenden wird der Ansatz der Immungentherapie näher beschrieben.

2.7.1 Tumorzellvakzine

2.7.1.1 Immunologische Grundlagen und Hintergründe

Die Entwicklung und erfolgreiche Anwendung von Tumorzellvakzinen bei der Krebsbehandlung basiert auf mehreren Annahmen:

1. Existenz von qualitativen oder quantitativen Unterschieden zwischen Tumorzellen und normalen Zellen,
2. Prinzipielle Fähigkeit der Erkennung solcher Unterschiede durch das Immunsystem,

3. Lernfähigkeit und Stimulierbarkeit des Immunsystems, z.B. durch aktive Immunisierung mit Vakzinen, um solche Unterschiede besser zu erkennen und effektive Tumorabstoßungsreaktionen zu bewerkstelligen (13).

Die klinische „Beobachtung“ von spontaner Tumorregression oder einer verlängerten Latenzperiode zwischen der chirurgischen Entfernung eines Primärtumors und dem Auftreten von Metastasen bzw. Rezidiven in manchen Patienten unterstützten diese Annahmen und implizieren einen zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus. Unglücklicherweise schützen diese Mechanismen den Patienten nur unvollständig (14).

Nach der immunologischen Überwachung von „fremd“ und „eigen“ und der Infektionsabwehr ist die Erkennung und Elimination neoplastischer Zellen eine primäre Funktion des Immunsystems. Man geht davon aus, daß sich Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden und das Immunsystem in der Lage ist, neoplastische Zellen zu töten, ähnlich wie fremde Zellen abgestoßen oder virusinfizierte Zellen eliminiert werden. Selbst die Ausbreitung von Tumorzellen wäre demnach auf ein Versagen der Immunüberwachung zurückzuführen. Ein intaktes Immunsystem wäre für die Bekämpfung von Tumoren von größter Bedeutung.

Seit über drei Jahrzehnten versuchen Forschergruppen herauszufinden, wie T-Lymphozyten, die Vermittler der zellulären Immunantwort, Krebszellen von normalen gesunden körpereigenen Zellen unterscheiden, um die Krebszellen zu eliminieren. In den letzten zwei Jahrzehnten konnten durch molekularbiologische Methoden die Strukturelemente und die Erkennungsspezifitäten von T-Lymphozyten, die als zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) auch Tumorzellen abtöten können, herausgearbeitet werden. Dazu gehören der T-Zell-Rezeptor, tumorassoziierte Antigene und die MHC-Moleküle als wichtige körpereigene Erkennungsmarker (13, 14, 16).

2.7.1.2 Tumor Antigene

Tumorassoziierte Antigene werden von T-Zellen auf ähnliche Weise erkannt wie virusassoziierte Antigene (17, 18). Als Abbauprodukte von Eiweißmolekülen des Zellinneren werden sie in Form von Peptiden mit Hilfe von MHC-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und dort dem Immunsystem präsentiert. In den letzten Jahren wurden mehrere dieser Moleküle kloniert und charakterisiert. (Melanom assoziiertes Antigen-1 (MAGE-1 Antigen), MAGE-2, MAGE-3, Melan-A / MART-1

etc. Eine wichtige wissenschaftliche Fragestellung, die sich hieraus ergibt ist, warum eine Tumorzelle, wenn sie tumorassoziierte Antigene trägt, in einem Krebspatienten nicht abgestoßen wird. Tumorzellen werden also im Gegensatz zu Bakterien, Viren oder virusinfizierten Zellen nicht immer als „Gefahr“ wahrgenommen (19, 20), oder wenn sie wahrgenommen werden, auch nicht immer eliminiert.

Erst kürzlich gewonnene Erkenntnisse bieten eine Erklärung hierfür. Es wurde bekannt, daß die Erkennung eines Antigens durch T-Zellen allein nicht ausreicht, um diese zu aktivieren, und daß hierzu sogenannte kostimulatorische Moleküle erforderlich sind. Derartige Moleküle finden sich zur Antigen-Präsentation auf besonders spezialisierten Zellen des Immunsystems wie z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen. Neben kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die derartige Zellen zusätzlich zum Antigen (Peptid-MHC-Komplex) an der Oberfläche präsentieren, schütten die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) auch lösliche Faktoren, sog. Zytokine, aus. Diese tragen ebenfalls dazu bei, daß T-Zellen im Rahmen einer spezifischen Immunantwort aktiviert werden.

Die beim Menschen am häufigsten vorkommenden malignen Erkrankungen sind Karzinome. Diese leiten sich von Epithelzellen ab, also Zellen, die in der Regel keine kostimulatorischen Moleküle tragen und daher auch nicht T-Zellen direkt aktivieren, selbst wenn sie erkennbare Antigene tragen (13).

Gentherapeutische Strategien haben daher zum Ziel, derartige menschliche Karzinome durch Transfer bestimmter Gene so zu verändern, daß sie wie professionelle APC kostimulierende Antigene an der Oberfläche präsentieren und möglichst auch Zytokine freisetzen. Derartige Ansätze haben das gemeinsame Ziel, entsprechende Impfstoffe zu generieren, sog. Tumorstoffe, mit denen Krebspatienten nach der Operation des Primärtumors oder einer Metastase nachbehandelt werden können. So soll im Rahmen einer aktiv-spezifischen Immuntherapie versucht werden, das Immunsystem gegen noch verbliebene Tumorzellen im Organismus zu aktivieren und damit das rezidivfreie Intervall zu verlängern.

2.7.2 Zytokin-Gentherapie von Krebs

Die Fortschritte in der Tumor-Immunologie der letzten Jahre haben zu einem besseren Verständnis der molekularen Basis der Prozessierung von

Tumorantigenen, ihrer Präsentation und Erkennung sowie der regulierenden Rolle von Zytokinen bei der Antitumorimmunantwort geführt.

Zytokine regulieren die Immunantwort durch Förderung oder Hemmung der Aktivierung, Reifung und Migration von Immunzellen. Ihre systemische Anwendung wird jedoch von drastischen Nebenwirkungen begleitet (11, 21), und die Wirkung wird schnell durch metabolischen Abbau und Elimination vermindert.

Diese Beobachtungen führten zu der Entwicklung einer alternativen Methode der Zytokin-Applikation: Zytokinproduktion durch transfizierte Tumorzellen oder durch sog. Carrierzellen (meist autologe Fibroblasten), die für eine lokale Produktion des bzw. der Zytokine an gewünschter Stelle sorgen (22). Die Sekretion der Zytokine durch die Tumorzellen wird in vivo nachgeahmt und fördert auf diese Weise die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort, ohne gleichzeitig vergleichbar starke toxische systemische Nebeneffekte hervorzurufen (23).

2.7.2.1 Prinzipien zytokininduzierter Tumormunität

Die Zytokin-Gentherapie kann darauf abzielen, daß zelluläre Immunmechanismen effektiver im Hinblick auf Tumorzellerkennung arbeiten. T-Zellen, die durch Tumorzellen stimuliert wurden, sezernieren häufig nicht die für die Differenzierung und Proliferation der Effektor-T-Zellen nötigen Zytokine. Eine starke Expression der benötigten Zytokine durch genmodifizierte Zellen könnte Abhilfe schaffen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über Effektorzellen, die nach Induktion mit Zytokinen einen Antitumoreffekt gezeigt haben.

Zytokin	Hauptsächliche Effektorzelle	Andere mögliche Effektorzellen
G-CSF	Neutrophile	Makrophagen, Eosinophile, CD8+ T-Zellen
GM-CSF	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen	
IFN- γ	CD8+ -T-Zellen	NK-Zellen
IFN- α	CD8+ -T-Zellen, NK-Zellen	
TNF- α	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen	Makrophagen
IL-1	Nicht beschrieben	Nicht beschrieben
IL-2	CD8+ -T-Zellen	NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile,
IL-4	Eosinophile	Makrophagen, CD8+ T-Zellen
IL-6	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen	NK-Zellen, Makrophagen
IL-7	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen, Makrophagen	-
IL-12	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen,	-

IL-18	NK-Zellen NK-Zellen	CD4+ -T-Zellen, CD8+ -T-Zellen
-------	------------------------	--------------------------------

Tabelle 2-2: Modifiziert übernommen aus „Cytokine Gene Therapy of Cancer“, Peron J.M. et al 1999 (16).

2.7.2.2 Schlußfolgerungen

Die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem Immunsystem sind sehr komplex. Zytokine, die entweder von den Tumorzellen selbst oder von den sie umgebenden Zellen ausgeschüttet werden, bestimmen die Art und Weise, in der das Immunsystem reagiert. Die bisher beschriebenen Vorstellungen, wie das Immunsystem mit Hilfe von Zytokinen manipuliert werden kann, sind noch sehr unvollständig und in den Anfängen. Systematische Grundlagenforschung sollte zu einem fundamentaleren Verständnis der Funktionsweise des Immunsystems und von Antitumorimmunität führen. Zur Zeit werden primär aus ethischen Gründen die meisten klinischen Studien mit solchen Patienten durchgeführt, die ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium erreicht haben. Patienten mit minimaler Tumormasse, jedoch mit hohem Risiko eines Rezidivs sind die Gruppe, bei der der beschriebene Therapieansatz am vielversprechendsten zu sein scheint (16).

2.7.2.3 Klinische Studien mit IL-7 und GM-CSF exprimierenden autologen Tumorzellen zur Gentherapie metastasierender Karzinome

1995 wurde eine klinische Phase I-Studie des Universitätsklinikum Rudolf Virchow Berlin, Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/ Onkologie von Prof. Dr. Dieter Huhn und Dr. Ingo Schmidt-Wolf in Zusammenarbeit mit dem Centrum Somatische Gentherapie in der Abteilung für Molekularbiologie und Bioinformatik der FU-Berlin, unter Leitung von Prof. Dr. Burghardt Wittig, begonnen. Ein detailliertes Protokoll der Studie wurde 1994 publiziert (87).

Als Teil dieser Studie war geplant, autologe Tumorzellen des metastasierten Melanoms (Stadium IV) und des Nierenzellkarzinoms mit einer Kombination von

Expressionskonstrukten für IL-7, GM-CSF und IL-12 mit Hilfe des modifizierten ballistomagnetischen Gentransfersystems zu transfizieren.

Autologe Tumorzellen wurden durch chirurgische Exzision des Primärtumors oder einer Metastase gewonnen, als Einzelzellsuspension ex vivo transfiziert und dem Patienten wieder subkutan injiziert. Um genügend Zellen für die Herstellung des Impfstoffs zu erhalten, mußte der Tumor bzw. die Metastase einen Durchmesser von 3 bis 5 cm haben. Da die Tumorzellen für kurze Zeit in Kultur genommen und ggf. im Labor vermehrt werden, ist die Vitalität des Ausgangsmaterials von großer Bedeutung. Häufig erscheinen die Primärtumoren/ Metastasen in der bildgebenden Diagnostik zunächst als solide Raumforderungen. Bei der Aufarbeitung des Tumors zu einer Einzelzellsuspension findet man jedoch des öfteren nur einen schmalen Saum von vitalen Tumorzellen, während der größere innere Teil überwiegend Zellen geringer Vitalität enthält und z.T. nekrotisch ist. War die Zahl vitaler Zellen nach der Dissoziation des Tumorgewebes in Einzelzellen nicht ausreichend, um eine Vakzine herzustellen, versuchte man die Zellzahl durch Kultivierung der Zellen auf das erforderliche Maß zu vergrößern. War eine ausreichende Zellzahl vorhanden, wurden die Zellen ballistomagnetisch mit IL-7- und GM-CSF-Expressionskonstrukten transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die fertige Vakzine portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Tag der Impfung wurde eine Portion aufgetaut, in steriler Pufferlösung gewaschen und einer Gamma-Strahlen-Dosis von 105 Gray ausgesetzt. Die Strahlendosis war so gewählt, daß die Fähigkeit der Zellen zur Teilung vollständig blockiert, die Fähigkeit zur Genexpression jedoch nicht eingeschränkt wird. Die Zellen wurden dann in einem Volumen von 1 ml subkutan in die proximalen Extremitäten injiziert. Der Arbeitsablauf ist in der Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.

In der 2., 3., und 6. Woche wurde die Impfung jeweils wiederholt. Pro Impfung sollen 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen verwendet werden. Am Centrum Somatische Gentherapie wurden die Zellen gentechnisch modifiziert, während die Patientenbehandlung im jeweiligen Klinikum durchgeführt wurde. Mit der klinischen Phase I-Studie sollten die Durchführbarkeit des Verfahrens unter klinischen Bedingungen, die Verträglichkeit der Impfdosis sowie auftretende Nebenwirkungen, insbesondere im Hinblick auf den ballistomagnetischen Gentransfer als ex vivo Gentransfermethode geprüft werden. Daneben waren das Tumorwachstum beim Patienten und die Untersuchung

immunologischer Parameter von besonderem Interesse. Hierzu wurde einige Tage nach der Operation beim Patienten mit Hilfe bildgebender Diagnostik verbliebenes Tumorgewebe vermessen. Ein bis zwei Wochen nach der 4. Injektion wurden die Untersuchungen wiederholt und die Progredienz der Erkrankung eingeschätzt. Ein Restaging des Patienten erfolgte in dreimonatigen Intervallen.

Mit Hilfe des Multitest Merieux, einem immunologischen Hauttest, wurde die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems der Patienten eingeschätzt. Patienten, die in dem Test keine Reaktion gegen eines der Antigene zeigten, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Vor Beginn der Gentherapie wurden den Patienten bestrahlte Tumorzellen subkutan injiziert um festzustellen, ob eine erwünschte Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorzellen vorliegt. Die Tumorzellen wurden unter den gleichen Bedingungen aufbereitet wie die für die Vakzin-Herstellung benutzten Zellen mit dem Unterschied, daß sie nicht genetisch modifiziert wurden. Der Test gegen nicht-modifizierte Zellen wurde jeweils am Tag vor der 3. und 4. Impfung wiederholt, um zu überprüfen, ob eine Reaktion des Immunsystems des Patienten gegen die Tumorzellen erfolgt. Vor jeder Impfung wurde außerdem ein Differentialblutbild erstellt, um die Lymphozytenzusammensetzung des Patienten zu bestimmen (25). Die Ergebnisse der Studie sind in „Human Gene Therapy“ publiziert (24).

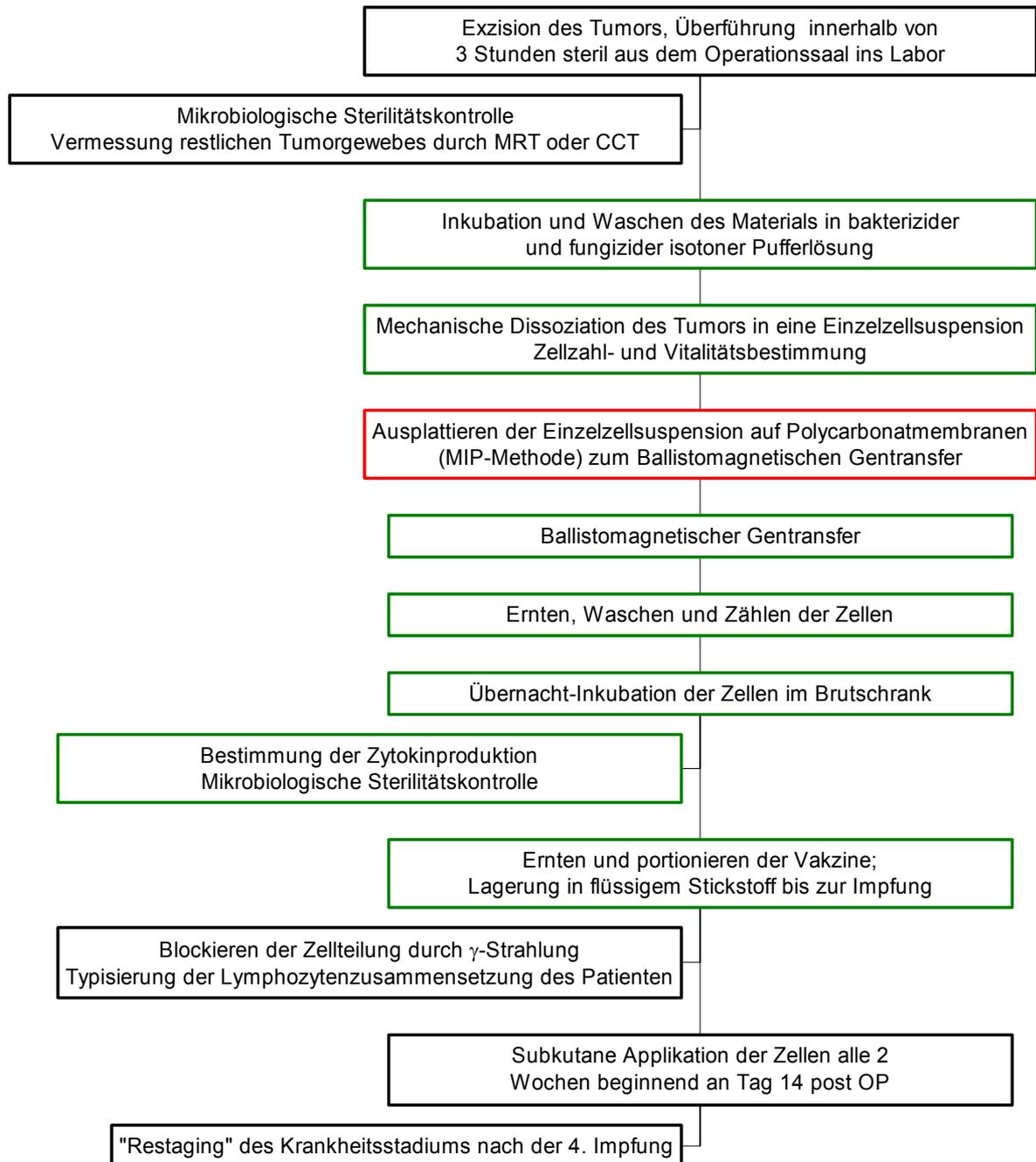


Abbildung 2-2: Übersicht zum Ablauf der Arbeitsschritte zur Herstellung der Vakzine. In der Abfolge der Arbeitsschritte ist die MIP-Methode rot eingerahmt zu erkennen. Die im Centrum Somatische Genterapie durchgeführten Arbeitsschritte sind grün, die in den Kliniken erfolgten Arbeitsschritte sind schwarz eingerahmt.

2.7.2.4 GM-CSF

GM-CSF ist ein pleiotropes Zytokin, das Proliferation, Reifung und Funktion von hämatopoetischen Zellen stimuliert. Es wird von einer Reihe von Zelltypen, einschließlich T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, endothelialen Zellen und Fibroblasten als Reaktion auf einen immunologischen oder entzündlichen Stimulus produziert. In den 15 Jahren seit ihrer Entdeckung wurden die Gene, die für GM-CSF kodieren, kloniert und die exprimierten Proteine untersucht. Die grundlegende Biologie und die klinischen Anwendungen sind Gegenstand vieler Untersuchungen und zusammenfassend in den Referenzen 26-31 dargestellt. Die wichtigsten Funktionen und Anwendungen werden im folgenden noch einmal zusammengefasst.

Die Gene für das humane GM-CSF und für das Maus GM-CSF konnten Chromosom 5 Chromosom bzw. 11 zugeordnet werden. Sie stehen in enger Verbindung zu den Genen für IL-3, IL-4, IL-5, M-CSF, und c-fms. Die cDNA für murines- und humanes GM-CSF kodieren für Vorläuferproteine mit 124 beziehungsweise 127 Aminosäuren, die multiple Glykosylierungsstellen und zwei intramolekulare Disulfidbindungen aufweisen, welche essentiell für die biologische Wirkung sind. Die Aminosäuresequenz des humanen GM-CSF stimmt zu 54% mit dem murinen Gegenstück überein. Beide Proteine sind in ihrer Wirkung speziesspezifisch. Trotz der Anwesenheit multipler Glykosylierungen scheint etwa die Hälfte davon nicht wichtig für die bisher in vitro oder in vivo getesteten Funktionen zu sein (26, 27).

GM-CSF entfaltet seine Wirkung durch Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Es wurden hochaffine und niedrigaffine Bindungsstellen auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zelltypen entdeckt. Anteile der hochaffinen Rezeptoren für GM-CSF konnten mittlerweile in Maus und Mensch charakterisiert werden (32,33). Ähnlich dem hochaffinen Rezeptorkomplex für IL-3 und IL-5 ist auch der für GM-CSF aus mindestens zwei Komponenten aufgebaut: Einer α -Untereinheit, die zunächst eine niedrig affine Bindung mit GM-CSF eingeht und die β -Untereinheit, die zwar nicht eine direkte Bindung eingeht, aber dann die Umwandlung in eine hochaffine Bindung an die α -Untereinheit bewirkt.

Die cDNA für die menschliche und die murine α -Untereinheit wurden durch Expressionsklonierung gewonnen (34,35). Die Ähnlichkeit zwischen den humanen und Maus GM-CSF-Rezeptor- α -Untereinheiten ist niedrig, aber beide Polypeptide enthalten die konservierten Merkmale der hämatopoetischen Rezeptor-Superfamilie.

Die β -Untereinheiten für den GM-CSF-Rezeptor von Maus und Mensch wurden ebenso kloniert und charakterisiert. Im Menschen dient die β -Untereinheit (KH97) des GM-CSF Rezeptors auch als Konverterprotein für die Umwandlung in hochaffine Bindungen für die niedrigaffinen Bindungsstellen des IL-3- und des IL-5-Rezeptors (32).

Biologische Wirkung: Ursprünglich wurde GM-CSF durch seine Fähigkeit charakterisiert Neutrophile, Monozyten/Makrophagen und Eosinophile zur Koloniebildung zu stimulieren. Seitdem konnten jedoch zusätzliche Wirkungen auf hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen gezeigt werden (26-32). In vitro schließt die proliferative Wirkung von GM-CSF Vorläufer von granulozytären Zellen und Makrophagen, Erythrozyten und Megakaryozyten ein. GM-CSF wird auch für das Wachstum und die Differenzierung von dendritischen Zellen aus ihren Vorläuferzellen aus dem Knochenmark benötigt (38, 39). Bei reifen hämatopoetischen Zellen verbessert GM-CSF die Funktion der differenzierten Zellen und wirkt als überlebensverlängernder Faktor.

Spezifische Wirkungen auf verschiedene Zelltypen: GM-CSF verlängert die Lebensspanne von Neutrophilen und Eosinophilen. Es verbessert die Fähigkeit von Neutrophilen und Eosinophilen auf sekundäre Stimuli mit einer gesteigerten Produktion von Superoxid, Arachidonsäure und Leukotrienen zu reagieren. Es fördert die phagozytotische Aktivität von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen, erhöht die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen gegenüber Tumorzellen und verstärkt die Histaminausschüttung von Basophilen (40). GM-CSF induziert die Synthese und Ausschüttung von IL-1 und TNF- α aus Monozyten.

GM-CSF regt die Proliferation und Migrationsfähigkeit von endothelialen Zellen an (41). Zusätzlich wurde die in vitro Eigenschaft von GM-CSF beobachtet, einige Krebszelllinien zur Proliferation anzuregen. Hierzu gehören eine Zelllinie abstammend von einem Osteosarkom, sowie diverse Karzinoma- und Adenokarzinoma-Zelllinien. Erhöhte GM-CSF-Spiegel wurden im Serum von manchen Patienten mit Lungenkrebs (42), akuter myeloischer Leukämie (43) und Asthma-Patienten festgestellt (44).

Klinische Studien mit GM-CSF: Eine Reihe von Arbeitsgruppen untersuchten das Potential von GM-CSF als Immunadjuvanz. Es bestand die Vorstellung, seine positive Wirkung auf die Funktion antigenpräsentierender Zellen auszunutzen. In einer Studie wurden murine Melanomzellen, die mit Hilfe eines Retroviralen Vektors mit einem Expressionskonstrukt für GM-CSF transfiziert wurden, als „Tumor-Vakzine“ eingesetzt. Die Injektion dieser gentechnisch veränderten Zellen in Mäuse mit existierender „Wild Typ“-Tumorlast führte zu Tumoreradikation und persistierender Immunität gegenüber wiederholten Versuchen, den Mäusen erneut den „Wild Typ“-Tumor zu implantieren. Diese Anwendung wurde nun auch in einer klinischen Phase I Studie im Menschen getestet. Die Stellen, an denen die Immunisierung stattfand, waren dicht mit T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und Eosinophilen bei allen 21 vakzinierten Patienten infiltriert. Metastatische Läsionen, reseziert nach der Impfung, zeigten eine dichte Infiltration mit T-Lymphozyten und Plasmazellen sowie exzessive Tumorzerstörung (mindestens 80%), Fibrose und Ödeme. Spezifische Antimelanom-T-Lymphozyten waren mit der Tumorzerstörung assoziiert. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die potente immunmodulatorische Wirkung von GM-CSF in Patienten mit metastasiertem malignem Melanom (45, 46, 47).

2.7.2.5 Interleukin-7 (IL-7)

Interleukine sind autokrin oder parakrin wirksame Gewebeshormone niedrigen Molekulargewichts und kurzer Halbwertszeit. Sie wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung numeriert. Der Name „Interleukin“ beschreibt ihre primär entdeckte Funktion als Kommunikationsproteine zwischen Leukozyten. Sie werden jedoch nicht ausschließlich von Zellen des Immunsystems produziert. Eine Vielzahl von anderen Körperzellen und auch etliche Tumorzellen sind ebenfalls in der Lage Interleukine zu produzieren. Über an der Zellmembran sitzende Rezeptoren entfalten die Interleukine ihre bisher nur teilweise erforschten und zum Teil sehr komplexen Wirkungen und Wechselwirkungen.

Nachdem es gelungen war, aus Stromazellen einer Mausknorpelmarkkultur die cDNA für IL-7 zu klonieren (48), konnte aus menschlichen Hepatomzellen die entsprechende Sequenz amplifiziert werden (49, 50). Diese enthält eine kodierende Region von 534 Basenpaaren, die 5'-Region besteht nochmals aus 384, die 3'-

Region aus 658 nicht translatierten Basenpaaren. Das nur in einer Kopie vorkommende Gen für IL-7 besteht aus 6 Exons und 5 Introns, die über eine Länge von 33 kbp verteilt sind (51). Ein TATA-Box Sequenzmotif ist nicht vorhanden, dafür aber andere potentielle Bindungsstellen für Regulationsproteine der Genexpression. Der genaue Regulationsmechanismus der Transkription ist noch ungeklärt. Durch alternatives Spleißen der mRNA können vermutlich Proteine unterschiedlicher Aktivität hergestellt werden (48, 49).

Das menschliche IL-7 besteht aus 177 Aminosäuren, von denen 25 eine Signalsequenz bilden. Es enthält 6 Cysteine, die für die biologische Aktivität notwendig sind. Das nichtglykosylierte Protein hat ein Molekulargewicht von 17,4 kD, die Proteinsequenz enthält 3 potentielle Glykosylierungsstellen (49); glykosyliert beträgt das Molekulargewicht 25 kD (52). Die mRNA für IL-7 konnte beim Menschen vor allem in der Milz, der Niere, der fetalen Leber und im Thymus nachgewiesen werden (48, 49, 53). Es wird auch eine endogene Produktion von IL-7 in mit Antigen stimulierten CD8⁺-Lymphozyten vermutet (54).

Rezeptoren für IL-7 kommen auf Zellen lymphatischer und myeloischer Herkunft vor (55). Auf T-Lymphozyten wurden zwei von unterschiedlichen Genen kodierte IL-7 Rezeptoren gefunden: Auf nicht aktivierten Zellen gibt es ein 90 kD schweres Protein, über welches nach der Bindung von IL-7 die Expression von CD25 und andere Aktivierungsmechanismen, nicht jedoch die proliferative Vermehrung der Zellen ausgelöst werden. Dieser Rezeptor ist vermutlich ein aus 439 Aminosäuren zusammengesetztes Heterodimer mit 6 extra- und 4 intrazellulär liegenden Cysteinresten (56). Er wird zur Hämatoopoetin-Rezeptor-Familie gezählt, die zur Signaltransduktion weitere Moleküle benötigen, da den Rezeptoren eine intrinsische Proteinkinaseaktivität fehlt. Die gamma-Untereinheit des IL-2-Rezeptors scheint diese Funktion für den IL-7-Rezeptor, wie auch für den IL-4-Rezeptor, zu übernehmen (57). Durch alternatives Spleißen entsteht auch eine mRNA, die für einen Rezeptor mit verkürzter intrazellulärer Kette kodiert, sowie eine für einen löslichen Rezeptor kodierende mRNA (56). Lösliche Rezeptoren wurden auch schon für andere Interleukine, darunter IL-2, beschrieben. Sie dienen vermutlich dem Abbau zirkulierender Moleküle (58). Mit einem Mitogen aktivierte T-Zellen und unstimulierte Thymozyten exprimieren zudem einen strukturell veränderten IL-7 Rezeptor, der ein Gewicht von 76 kD hat und für die durch IL-7 vermittelte Proliferation notwendig ist (59). Die Signaltransduktion nach Rezeptorbindung ist noch unklar und scheint für

die unterschiedlichen Zelltypen nicht einheitlich zu sein (53). Bei einigen Zellarten spielt die Tyrosinphosphorylierung eine Rolle, bei anderen eine Hydrolyse des Phosphatidylinositols (58, 60). Möglicherweise sind aber auch die Proteinkinase C und eine Erhöhung des c-AMP beteiligt (61).

Biologische Wirkung: IL-7 wurde zuerst als Produkt von Stromazellen im Überstand einer Mauseknochenmarkkultur identifiziert und Lymphopoetin-1 genannt (62). Dort regt es als Kofaktor im Wechselspiel mit den Stromazellen pro-B- und prä-B-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung in IgM⁺-B-Zellen an (63, 64). Reife B-Zellen zeigen hingegen keine Reaktion auf dieses Protein (52).

Durch IL-7 kann, insbesondere die Proliferation unreifer Thymozyten (T-Vorläuferzellen) stimuliert werden. Hierbei reguliert das IL-7 auch die Zelldifferenzierung (52, 60) und ist essentieller Kofaktor im V(D)J Rearrangement des Gens für den T-Zell-Rezeptor-Beta (65). Die Vorläuferzellen entwickeln sich bevorzugt zu CD4⁺-T-Lymphozyten (60), aber nach entsprechender Antigenstimulation können auch CD8⁺-T-Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität entstehen (66).

Die Ansichten über die Wirkung von IL-7 auf reife T-Zellen gehen auseinander. Während die einen davon ausgehen, diese Zellen könnten durch IL-7 nur indirekt über eine Induktion der Produktion von IL-2 und IL-2-Rezeptoren, zusammen mit einem zweiten Signal, zum Wachstum angeregt werden, wobei auch eine endogene Produktion von IL-6 eine Rolle spielen soll (52, 63), haben andere auch eine direkte Wirkung des IL-7 mit oder ohne Mitogen auf reife T-Zellen beobachtet (68, 69, 70). Interessanterweise gelang mit IL-7 auch eine Aktivierung der T-Zellen mit physiologischen Stimuli, jedoch nur in vivo, nicht in vitro (69). Ohne einen Kostimulus kann IL-7 allein allerdings auf gereinigte T-Lymphozyten keine Wirkung ausüben (71), was durch die verschiedenen Rezeptortypen erklärt werden kann.

Ähnlich dem IL-2 können auch mit IL-7 bestimmte Untergruppen der T-Zellen erhalten werden:

1. In Kultur mit Antigen entstehen spezifische ZTL, deren maximale zytolytische Aktivität zeitlich verzögert auftritt (72, 73, 74). Dabei kann ein deutliches Überwiegen der CD8+-Zellen in der Effektor-Fraktion nachgewiesen werden (73, 55). Ein Teil der Zytotoxizität kommt über die Produktion von Interferon-Gamma zustande (75, 76, 77). Die kombinierte Gabe von IL-2 und IL-7 ergibt einen überadditiven zytotoxischen Effekt der ZTL im Vergleich zur isolierten Gabe der Zytokine (66, 74).
2. IL-7 kann unabhängig von IL-2, zur Bildung von LAK-Zellen aus Lymphozyten des peripheren Blutkreislaufes führen. Diese gehen überwiegend aus CD8+-T-Lymphozyten und NK-Zellen hervor (78, 79, 74). Allerdings konnten Lynch und Miller in einer Versuchsreihe mit Milzzellen der Maus keine NK-Zellen in der LAK-Population nachweisen (80).
3. Die von IL-7 induzierte Proliferation von TIL ist z.T. abhängig von IL-2 (81, 82, 76).
4. Nach der Gabe von IL-7 sezernieren Monozyten IL-1 und IL-6 und Tumornekrosefaktor-Alpha und zeigen gegenüber Tumorzelllinien eine zytotoxische Aktivität (78). Auch Makrophagen können durch IL-7 aktiviert werden (58). In Studien mit IL-7 und tumortragenden Mäusen wurden zudem eosinophile Zellen als Effektorzellen gefunden. (83, 84).

Als weiterer interessanter Aspekt des IL-7 ist zu erwähnen, daß es von Keratinozyten produziert wird und als sogenannter Homing-Faktor Aufenthalt und Wachstum der T-Lymphozyten zu beeinflussen scheint (53). Toxizitätsstudien in Mäusen ergaben im Vergleich zu anderen Zytokinen wie z.B. IL-2 oder Interferonen nur wenige und harmlose Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust und Aktivitätseinbuße (85, 55).

Tierversuche mit IL-7: Da auch IL-7 offenbar die Immunantwort stimulieren kann, folgten seiner Entdeckung auch an Mäusen durchgeführte Studien, von denen einige in Tabelle 2-3 kurz vorgestellt sind:

Autoren	Studie	Ergebnis
Appasamy, P. et al.(58)	Intraperitoneale Injektion von IL-7 in Mäuse mit 3 Tagen vorher applizierten Melanomzellen	Deutliche Reduktion der Lungenmetastasen
Komschlies, K. L. et al (55)	Intraperitoneale Injektion von humanem IL-7 in Mäuse mit Lungenmetastasen eines Mausnierenzellkarzinoms	Dosisabhängige Metastasenreduktion bis zu 75%
Lynch, D. H. et al. (80)	In Kultur gehaltene, mit mIL-7 und mit UV-Strahlen bzw. chemisch induzierten Mausfibrosarkomzellen stimulierte ZTL wurden in Mäuse injiziert, die gleichzeitig oder 4 Tage vorher die gleichen Tumorzellen erhielten	Kein Anwachsen der gleichzeitig injizierten Tumoren und vollständige Abstoßung der etablierten Tumoren in 75% der Fälle, ZTL-Antwort tumorspezifisch
Mc Bride, W. H. et al (84)	Injektion chemisch induzierter, mIL-7 produzierender Fibrosarkomzellen in normale und T-Zell defiziente Tiere	Nur in normalen Mäusen Tumorabstoßung oder zumindest Wachstumsverlangsamung
Hock, H. et al (83)	mIL-7 produzierende Maustumorzellen (Plasmozytom- oder Mammakarzinomzellen) wurden in Mäuse injiziert	Kein Wachstum bzw. Abstoßung langsam wachsender Tumoren; durch Antikörper gegen IL-7 komplette Blockade der Immunabwehr
Aoki, T. et al (86)	Ein chemisch induziertes, IL-7 überexprimierendes malignes Mausgliom wurde in Mäuse appliziert, danach mit Antikörpern gegen IL-7 titriert	In Abhängigkeit von Zellzahl und Produktion von IL-7 verlangsamtes Wachstum o. Abstoßung des Tumors; Aufhebung des Effektes durch die Antikörper; Entwicklung von spezifischer Immunität gegenüber unbehandelten Zellen

Tabelle 2-3

Klinische Studien mit IL-7: Mit IL-7 wurden ebenfalls klinische Phase I-Studien begonnen, deren Auswertung z.T. noch aussteht. So gibt es einen Ansatz, bei dem vom Patienten aus subkutanen Metastasen gewonnene Melanomzellen mit einer IL-7 produzierenden Melanomzelllinie vermischt, bestrahlt und reinjiziert werden (85). Eine andere Studie untersucht die Wirkung von IL-7 produzierenden, bestrahlten autologen Tumorzellen (Melanom, Nierenzellkarzinom, Kolonkarzinom oder malignem Lymphom) und/oder die Gabe von Effektor-T-Lymphozyten (87). Diese Studie ist inzwischen grundlegend modifiziert worden. Erste Ergebnisse sind inzwischen publiziert (25, 88, 89).

2.8 Gentransfer in der Gentherapie

Die Effizienz aller bisher bekannten Transfektionsverfahren, d.h. der Anteil an Zellen, die nach der Transfektion tatsächlich expressionsfähige DNA-Konstrukte im Zellkern tragen, ist sehr gering. Dies gilt sowohl für die weit verbreiteten viralen Transfektionssysteme, als auch für das Einbringen von Plasmiden durch chemische, physikalische und rezeptorvermittelte Transfektion. Es scheint relativ einfach zu sein, große Mengen an DNA in das Zytoplasma von Zellen zu transferieren. Dort befindet sich die DNA dann zum überwiegenden Teil in Endosomen, aus denen sie entweder erst zufällig, bei Sättigung des endosomalen „pathway“, oder gezielt durch die Wirkung von Endosomen aufbrechenden Proteinen befreit werden muß. Diese Endosomen aufbrechenden Substanzen können vor der Transfektion dem Zellkulturmedium zugegeben oder direkt an die DNA-Konstrukte gebunden werden. Besitzt diese DNA aber die Größe expressionsfähiger Gene, so stellt die Kernmembran die nächste normalerweise nicht überwindbare Barriere dar. Nur wenn Zellen sich teilen und dabei ihre Kernmembran auflösen, kommt es vor, daß eines oder wenige Vektormoleküle vom Zytoplasma in den Zellkern gelangen, in dem sie von der neu gebildeten Kernmembran eingeschlossen werden. Nur im Zellkern kann es zur Transkription und Prozessierung expressionsfähiger mRNA anhand der Informationen auf den DNA-Konstrukten kommen. So wird verständlich, daß die Aufnahme von DNA in das Zytoplasma, oder die dortige Freisetzung aus Endosomen nicht die limitierenden Schritte sind. Zellpopulationen, die sich in bezug auf ihren Zellzyklus in einer Ruhephase befinden, oder in Abhängigkeit von ihrem Spezialisierungsgrad ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben, sind nur mit sehr geringer Effizienz durch Verfahren zu transfizieren, die über die Aufnahme von DNA ins Zytoplasma funktionieren.

Es gibt zwei etablierte Verfahren, die DNA direkt in den Zellkern einbringen. Eines dieser Verfahren ist die Mikroinjektion, mit dem sich ein 100%iger Transfer der DNA in den Zellkern erreichen läßt. Außerdem ist die Zahl der injizierten Moleküle direkt kontrollierbar. Trotz ihrer theoretischen Vorteile für viele Laborexperimente und gentherapeutische Studien disqualifizieren zwei Nachteile diese Methode. Selbst mit Computerunterstützung können von einem guten Experimentator nur bis zu 1000 Zellen pro Stunde injiziert werden. Die für die aktiv spezifische Gentherapie notwendigen Zellzahlen einer Impfdosis bewegen sich zwischen 10^6 und 10^8 Zellen.

Es ist zur Zeit technisch nicht möglich, nichtadhärente Zellen mit Hilfe der Mikroinjektion zu transfizieren.

Das andere erst kürzlich entwickelte Verfahren des ballistomagnetischen Gentransfers von Vektoren, transferiert ebenfalls die DNA direkt in den Zellkern. Mit dieser Technik können jedoch mehr als 10^7 Zellen gleichzeitig transfiziert werden. Das Verfahren beruht auf der Weiterentwicklung und Kombination von zwei etablierten biotechnologischen Verfahren, dem ballistischen Transfer von Biomolekülen direkt in den Zellkern einerseits und der magnetischen Isolierung erfolgreich transfizierter Zellen andererseits. Mit diesem Verfahren gelingt es, Oligonukleotide oder Expressionsvektoren effizient in die Zellkerne einzubringen.

Wünschenswert wäre es zukünftig auch, daß neben der Art des transferierten Genkonstruktes, welches die Expressionsstärke und -dauer reguliert, auch der Ort der Expression bestimmt werden kann. Dies wäre auch insbesondere bei kotransfizierten Konstrukten interessant, da hierdurch eine Feinregulation der Expressionsstärke und der Verhältnisse der exprimierten Gene erzielt werden könnte. Erste Schritte sind neben der Entwicklung von Transfektionsverfahren die Konstruktion gewebespezifischer, regulierbarer Expressionsvektoren(9).

2.8.1 Sicherheitsaspekte beim Gentransfer

Nachdem von schwersten Nebenwirkungen und Todesfällen im Zusammenhang mit viralen Gentransfermethoden berichtet wurde (siehe Kap. 2.8.3.2 Viraler Gentransfer) ist die Sicherheit der zur Zeit verwendeten Genkonstrukte und Gentransfermethoden bei der Gentherapie zu einem aktuellen Diskussionsthema geworden. Kürzlich entwickelte minimalistische Expressionskonstrukte, die ohne das bisher für Expressionskonstrukte verwendete bakterielle Plasmidrückgrat und ohne Gene für Antibiotika- und Chemoresistenz auskommen, erhöhen die Sicherheit.

Eine Verminderung der Integrationswahrscheinlichkeit des transferierten Konstruktes in das Wirtsgenom würde die Sicherheit weiter erhöhen. Als risikoreich werden vor allem die zur Zeit noch verwendeten starken viralen Promotoren betrachtet. Die Integration eines solchen Promotors vor einem Onkogen könnte zu dessen Aktivierung führen und eine maligne Transformation dieser Zellen einleiten. Eine Alternative könnten regulierbare und gewebespezifische Promotoren sein. Hierdurch würde auch das immer bestehende Risiko einer unerwünschten Transfektion von

Zellen der Keimbahn vermindert. Das Problem der Gewebespezifität kann, bis derartige Promotoren etabliert sind, durch ex vivo Gentransfermethoden umgangen werden.

Ein möglichst umfassendes Verständnis der Grundlagen der Gentransfermethoden ist zur Durchführung einer sinnvollen Gentherapie unerlässlich. Es werden deshalb im folgenden die gebräuchlichsten Verfahren vorgestellt und im Hinblick auf ihre Eignung für den Einsatz bei einer Gentherapie diskutiert.

2.8.2 Chemische Gentransfersysteme

2.8.2.1 Liposomaler Gentransfer

Nomenklatur: Die Technologie von kationischen Liposomen und auf Polymeren basierenden Gentransfersystemen ist den letzten Jahren sehr rasch fortgeschritten. Es wurden viele neue Begriffe mit häufig synonyme Bedeutung geprägt, so daß Felgner et al. 1997 (90) den Versuch unternommen haben, eine einheitliche Nomenklatur einzuführen. Lipoplex bezeichnet demnach jeden kationischen Lipid-Nukleinsäure-Komplex und Polyplex bezeichnet jeden kationischen Polymer-Nukleinsäure-Komplex. Lipofektion beschreibt den Nukleinsäuretransfer mit Hilfe von kationischen Lipiden, während Polyfektion den Transfer von Nukleinsäuren mit kationischen Polymeren bezeichnet. Die Nukleinsäuren können DNA, RNA oder Oligonukleotide sein.

Kationische Liposomen: Per definitionem tragen kationische Liposomen überall eine positive Ladung. Nukleinsäuren sind Träger einer negativen Ladung, die aus den Phosphorsäureresten ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates resultiert. Die positiv geladenen Liposomen komplexieren mit den negativ geladenen Nukleinsäuremolekülen. Kationische Liposomen können aus doppelkettigen Lipiden geformt werden, die spontan Liposomen bilden. Die meisten kationischen Liposomen, die zum Transfer von Nukleinsäuren hergestellt werden, enthalten ein Lipid, das keine Doppellagen bildet und ein weiteres, stabilisierendes neutrales Helferlipid, wie Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE).

Der Weg der DNA in den Zellkern: Lipoplexe interagieren mit der Zellmembran in einer Art und Weise, die letztlich den Transport der DNA in den Zellkern und die Expression des Transgens ermöglicht. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist noch

weitgehend unbekannt. Endozytose, Phagozytose, Pinozytose und direkte Fusion mit der Zellmembran können abhängig vom Zelltyp eine Rolle beim Eintritt des Lipoplexes in die Zelle spielen. Die initiale Interaktion des Lipoplexes mit der Zellmembran ist elektrostatischer Natur. Sie resultiert aus der überschüssigen positiven Ladung, assoziiert mit dem Lipoplex und der negativen Ladung, assoziiert mit der Zellmembran. Die *in vitro* Kontaktzeit zwischen Lipoplex und Zellmembran ist sowohl für die Toxizität als auch für die Transfektionsrate kritisch und beträgt gewöhnlich 4 bis 8 Stunden (93, 95). Unklar ist aber, ob diese Zeitdauer zum einen nötig ist, damit sich genügend Lipoplexe auf die Zellmembran setzen können und somit eine nennenswerte DNA-Aufnahme und in deren Folge die Genexpression stattfinden kann, oder ob sie zum anderen der aktiven Aufnahme der Lipoplexe dient. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass Lipoplexe direkt durch Fusion mit der Zellmembran ins Zellinnere gelangen (92, 104). Alternativ schlugen viele Arbeitsgruppen vor, dass die DNA über Pinozytose aufgenommen wird (93, 95, 105, 106). Caplen et al. gehen jedoch davon aus, dass dieser Weg nur für Lipoplexe gilt, die kleiner als 200 nm sind (96). Ein neuerer Bericht nennt Phagozytose als den hauptsächlichen Weg der Aufnahme (94). Es scheint so, als müsse die DNA vor dem Eintritt in den Zellkern den Lipoplex verlassen, da Mikroinjektion von Lipoplexen direkt in den Zellkern im Vergleich zu nackter DNA in geringer Expression des Gens resultierte (95). Es ist jedoch nochmals zu betonen, dass unterschiedliche kationische Lipide unterschiedliche Lipoplexe hervorrufen, die von Zellen unterschiedlich aufgenommen werden. Außerdem können sie in unterschiedlichen Zelltypen, ja sogar im gleichen Zelltyp, mit unterschiedlichem Differenzierungsstadium unterschiedliche Wege nehmen (96).

In vitro versus in vivo: Das größte Problem für die Anwendung von Lipoplexen in der Gentherapie war, dass die Lipidformulierungen, die die besten Ergebnisse *in vitro* ergaben, nicht auch die besten Ergebnisse *in vivo* erzielten. Dies ist dadurch weitgehend zu erklären, dass Zelllinien häufig atypische Genexpressions- und Differenzierungsmuster zeigen. Die physikalische Chemie der Zelle, wie Oberfläche, Ladung und Ladungsdichte können *in vivo* völlig anders sein als *in vitro*. Dazu kommt, dass die Verfügbarkeit von Oberflächenrezeptoren bei *in vitro* kultivierten Zelllinien unterschiedlich zu *in vivo* wachsenden Zellen sein kann. Die Kontaktzeit *in vivo* unterscheidet sich von der *in vitro*. Zusätzlich besitzen viele Oberflächen *in vivo*

Mechanismen zur Entfernung von Partikeln. Beispiele hierfür sind die Zilien des Respirations- sowie des Gastrointestinaltraktes.

Klinische Anwendung: Trotz der schwierigen Formulierung und Anwendung von kationischen Liposomen wurden Ende 1996 mehr als 20 Studien durchgeführt, um ihr Potential bei der Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen zu untersuchen (97). Die Studien zeigten keine gravierenden Sicherheitsprobleme, und in der Mehrzahl der Behandelten konnte ein Gentransfer nachgewiesen werden. In einzelnen Fällen ergab sich sogar ein therapeutischer Nutzen.

2.8.2.2 Calcium-Phosphat Transfektion

Eine der ersten Methoden zum Transfer von DNA in Zellen basierte auf der Präzipitation von DNA mit Calcium-Phosphat auf Zellen (98). Der Mechanismus dieser Transfektionsmethode ist die Bildung eines Calcium-DNA-Komplexes, der als Partikel auf die Oberfläche der Zelle präzipitiert und über Endozytose aufgenommen wird. Die gute Beschreibung der Methode in der Literatur liefert viele für etablierte Zelllinien optimierte Protokolle. In der Arbeit mit Primärkulturen lassen sich bisher jedoch trotz optimierter Protokolle nur sehr geringe Transfektionsraten erzielen. Außerdem können nur adhärente Zellen transfiziert werden.

2.8.2.3 DEAE-Dextran Technik

Eine Weitere Methode ist die DEAE-Dextran Technik, die einfach anwendbar ist und eine hohe DNA-Transferrate aufweist (99). Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist bis heute ungeklärt. Eine Verbesserung der Effizienz der Methode wird durch Zugabe von Chloroquin erreicht, welches die Degradation der DNA in den Lysosomen hemmt. In der Praxis zeigt sich, daß sich viele Primärkulturen mit dieser Methode nur mit geringer Effizienz und strikt an die Zelllinie angepaßtem Protokoll transfizieren lassen (100).

2.8.3 Biologische Gentransfersysteme

2.8.3.1 Rezeptorvermittelter Gentransfer

Der rezeptorvermittelte Gentransfer ist eine vielversprechende Methode, bei der die DNA beispielsweise an Mannose-Polylysin-Konjugaten komplexiert und von den Zellen über Mannose-Rezeptoren gebunden wird.

Bei einer anderen Variante des rezeptorvermittelten Gentransfers wurde die natürliche Bindungsdomäne des Diphtherie-Toxins durch eine tumorspezifische Bindungsdomäne ersetzt. Die zu transferierende DNA wird an eine DNA Bindungsdomäne gekoppelt, durch die die enzymatische Domäne des Proteins ersetzt wurde. Das resultierende chimäre Protein bindet spezifisch an bestimmte Zellen und wird internalisiert. Die toxinspezifische Translokationsdomäne erleichtert die endosomale Freisetzung des DNA-Protein-Komplexes (101). Die Aufnahme der rezeptorgebundenen DNA-Komplexe erfolgt durch Endozytose. Potentielle Stärken dieser Methode sind der in vivo und in vitro Gentransfer, bei dem aufgrund der Rezeptorspezifität nur bestimmte Zelltypen transfiziert werden. Schwächen der Methode liegen zur Zeit noch in der Effizienz und in dem noch nicht absehbaren zusätzlichen Risiko bei der Anwendung in klinischen Studien durch den Proteinanteil.

2.8.3.2 Viraler Gentransfer

Der virale Gentransfer wird heute aufgrund der relativ hohen Effektivität in den meisten amerikanischen und auch vielen europäischen Studien favorisiert (102). Diese Ansicht muß allerdings gründlich überdacht werden, da kürzlich schwerste Nebenwirkungen und Todesfälle im Zusammenhang mit viralem Gentransfer in Genterapiestudien aufgetreten sind. Zu den Nebenwirkungen gehörten schwere Veränderungen der Leberfunktion, des Differentialblutbildes, Nausea und Desorientiertheit der Patienten. Zur Zeit wird untersucht, inwieweit die den Patienten applizierten Viren für diese Nebenwirkungen verantwortlich sind. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die viralen Vektoren im Wirt nicht doch replizieren. Eine Integration ins Genom könnte zu einer malignen Transformation der Zellen führen, was besonders beim Einsatz der Retroviren zu befürchten ist. Die Infektion mit viralen Vektoren kann auch Immunreaktionen oder toxische Schäden an Zellen und Organen hervorrufen. Denkbar sind auch Langzeitfolgen, die heute noch nicht zu überblicken sind. Sollten die im Versuch benutzten Viruspartikel in vivo auf ein

anderes Virus treffen, könnten sie mit ihm rekombinieren und wieder infektiös und pathogen werden.

Insbesondere bei ruhenden und sich nicht mehr teilenden Zellen, wie Neuronen, sind die Infektionsraten gering. Viele Viren infizieren nicht spezifisch nur die von den Gentherapeuten anvisierten Zellen. Selbst Keimbahnzellen können infiziert werden. Die fremden Gene könnten so an die nächsten Generationen vererbt werden. Die therapeutischen Gene werden nicht dauerhaft exprimiert, weil entweder das Immunsystem die infizierten Zellen vernichtet oder die Zellen selbst die fremden Gene inaktivieren. Durch die Immunisierung gegen den viralen Vektor oder seine Bestandteile wären folgende Impfzyklen wenig effektiv, da die Vektoren sofort neutralisiert würden. Neuere Entwicklungen zielen deshalb darauf ab, die Immunogenität der verwendeten Viren zu vermindern. Dies ist zum Teil in der zweiten und dritten Generation von adenoviralen Vektoren gelungen. Bei diesen Vektoren konnte ein zweiter Schwachpunkt viraler Vektoren, die ursprünglich auf 7 kb begrenzte Transportkapazität auf 36 kb erhöht werden. Die Verminderung der Toxizität und Immunogenität ging aber zulasten der Effizienz.

Als wichtige Vertreter für virale Transfektionssysteme sollen im folgenden exemplarisch retrovirale und adenovirale Vektoren vorgestellt werden:

Retroviren: Retroviren können in speziellen Zelllinien, sogenannten „packaging cell lines“ in einer nicht mehr replizierenden Form hergestellt werden. Die infizierten eukaryoten Zellen integrieren während der Zellteilung die DNA in das Genom (103).

Vorteil dieser Methode ist die zum Teil gute Transfektionsrate und die Tatsache, daß Zellen stabil transfiziert werden. Nachteilig ist, daß in ihrem Zellzyklus ruhende Zellen nicht transfiziert werden, und daß als Voraussetzung für eine Transfektion ein Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden sein muß, an den das Virus binden kann.

Adenoviren: Die DNA von Adenoviren wird selten ins Genom der transfizierten Zellen integriert. Die Virusreplikation kann durch ein replikationsdefektes Virus umgangen werden. Mit Adenoviren können auch ruhende Zellen transfiziert werden. Unter optimalen Laborbedingungen und bei bestimmten Zelllinien wird eine Transfektionsrate von nahezu 100% erreicht. Es wurde jedoch beobachtet, daß, wenn solch hohe Transfektionsraten erreicht wurden, diese häufig mit einem hohen Zellverlust einhergingen. Im Gegensatz zur retroviralen Transfektion werden Zellen nur transient transfiziert. Die Produktion viruseigener Strukturproteine in der Wirtszelle wirft in der In-Vivo-Situation spezifische Probleme auf. So kann sich eine

Immunantwort gegen die Virusproteine richten. Transfizierte Zellen, die außer ihrem gewünschten Transgen auch diese Strukturproteine bilden, werden dann durch das Immunsystem eliminiert. Insbesondere bei wiederholter Applikation von transfizierten Zellen stellt dies eine erhebliche Einschränkung der Methode dar, da diese Zellen, bevor die gewünschte Wirkung eintritt, bereits wieder abgestoßen werden.

2.8.4 Physikalische Gentransfersysteme

2.8.4.1 Elektroporation

Die Elektroporation gehört zu den sogenannten physikalischen Gentransfermethoden. Durch einen elektrischen Puls definierter Länge und Stärke können Zellmembranen für Makromoleküle permeabilisiert werden. Die Methode basiert auf einer Beobachtung von Zimmermann aus dem Jahr 1973, daß elektrische Pulse mit kurzer Dauer und hoher Intensität zu vorübergehenden Veränderungen der Zellmembran mit Ausbildung von Mikroporen führen (107).

Diese Beobachtung wurde ausgenutzt, um Makromoleküle in Zellen diffundieren zu lassen. Die Elektroporenbildung der Membran zum Transfer von DNA in Säugerzellen wurde erstmals von Neumann und Mitarbeitern genutzt (108). Nach diesen ersten Experimenten erweiterte sich das Anwendungsspektrum auf andere eukaryontische Systeme, wie pflanzliche Zellen (109) und Mikroorganismen, insbesondere Hefen (110, 111). Auch Bakterien werden erfolgreich durch Elektroporation transformiert (112). Erste Ansätze für eine gentherapeutische Anwendung bei denen die Zellen ex vivo elektroporiert werden sind beschrieben (113).

Die Elektroporation ist eine experimentell einfach durchzuführende Methode. Sie wird sowohl für stabile als auch für transiente Transfektion benutzt. Die zu transfizierenden Zellen werden suspendiert und in eine Elektroporationskuvette pipettiert. Danach wird die DNA hinzugefügt und die Kuvette wird an das Gerät angeschlossen. Zur Transfektion werden die Zellen einem elektrischen Puls definierter Länge und Stärke ausgesetzt. Nach kurzer Regenerationszeit werden die Zellen in das entsprechende Wachstumsmedium transferiert. Trotz erfolgreicher Anwendung auf unterschiedliche Zelllinien gibt es auch Zelllinien, die sich nicht durch Elektroporation transfizieren lassen. Neben der einfachen Durchführung wird die DNA, im Gegensatz zur Calcium-Phosphat-Technik und der DEAE-Dextran-Technik,

direkt aufgenommen und nicht über phagozytotische Vesikel in die Zelle transportiert. Es können sowohl adhärenente als auch Suspensionszellen elektroporiert werden. Nachteilig ist, daß die optimalen Elektroporationsbedingungen von Zelllinie zu Zelllinie aufgrund unterschiedlicher Membraneigenschaften und unterschiedlicher Zellgrößen variieren. Die Elektroporationsbedingungen wie Spannung, Widerstand, Kapazität, Dauer und Anzahl der Pulse müssen daher für jede Zellart bestimmt werden, um einen guten Kompromiß zwischen hoher Transfektionseffizienz bei geringer Sterberate zu erreichen. Leider ist eine hohe Transfektionsrate auch häufig von einer entsprechend hohen Sterberate begleitet.

Eine Optimierung des Elektroporationsprotokolls ist für Zelllinien gut möglich. Problematisch wird es aber, wenn mit Primärzellen gearbeitet wird, die nur in geringer Anzahl zur Verfügung stehen und nicht vermehrt werden können. Eine Optimierung der Bedingungen ist hier nur bedingt möglich.

2.8.4.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ist eine Methode, mit der adhärenente Zellen gut transfiziert werden können (114). Die DNA Lösung wird bei dieser Methode mit Hilfe einer Mikropipette mit einem Außendurchmesser von 0,2 µm in die Zelle bzw. den Zellkern injiziert. Die Mikroinjektion findet ihre Anwendung bei der Herstellung von transgenen Tieren (115), sowie bei speziellen Anwendungen in der Grundlagenforschung (116, 117). Ein Vorteil der Methode liegt darin, daß die Menge der zu injizierenden DNA und das punktierte Zellkompartiment gewählt werden können.

Die Anwendung der Mikroinjektion für gentherapeutische Zwecke ist durch die geringe Zahl an Zellen, die pro Zeiteinheit transfiziert werden können, limitiert.

2.8.4.3 Ballistischer Gentransfer

In der Literatur wird er auch als „biolistic transfer“, „bioballistic transfer“, „particle bombardment“, „gene gun“ oder „microparticle injection“ bezeichnet. Gemeinsamkeit dieser Methoden ist, daß DNA-beschichtete Goldpartikel mit hoher Geschwindigkeit auf Zellen geschossen werden. Zelluläre Barrieren, wie Zell- und Kernmembran, werden mit Hilfe von biologisch inerten ballistischen Partikeln überwunden. Während die meisten Partikel die Zellen durchschlagen, wird die DNA in den Zellen durch die starke Reibung abgestreift und verbleibt dort. Trifft ein Goldpartikel direkt den

Zellkern, so gelangt die DNA direkt an ihren Bestimmungsort. Hierdurch entfällt der sonst notwendige Transport in den Zellkern mit seinen Risiken der DNA-Degradation. Die Methoden unterscheiden sich in der Art und Weise, wie die Mikropartikel mit der DNA beschichtet werden. Abhängig von der verwendeten Apparatur kann der ballistische Gentransfer in vivo oder ex vivo eingesetzt werden. Aufgrund des rein physikalischen Prinzips gelingt es Zellen, ballistisch zu transfizieren, die sich mit anderen Methoden nur schwer oder nicht transfizieren lassen (118). Es können nun auch neuronale Zellen transfiziert werden, die bisher nur mit viralen Vektoren transfiziert werden konnten (119, 120). Es wurden auch Protokolle für primäre humane Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen von mir in Kollaboration mit Dr. Thomas Tüting von der Dermatologischen Klinik der Universität Mainz entwickelt (121).

Der ballistische Gentransfer wird neuerdings neben seiner Verwendung in der medizinischen Grundlagenforschung vermehrt in der Gentherapie eingesetzt. (122, 123). Neben der einfachen Durchführung und der guten Reproduzierbarkeit, die diese Methode auszeichnen, liegt ein weiterer Vorteil in der frühzeitigen und starken Expression des Transgens, da der zeitraubende ineffektive intrazelluläre Transport entfällt.

Der erfolgreiche Einsatz des ballistischen Gentransfers hängt von physikalischen Variablen wie Masse und Geschwindigkeit der Goldpartikel und von biologischen Variablen wie dem Zellaufbau ab. Einige dieser biologischen Variablen sind Membranaufbau, Adhärenz und Organisation des Zytoskeletts, sowie die Größe der Zelle und des Kerns und ihrem Größenverhältnis zueinander. Natürlich spielen auch die Menge der zu transferierenden DNA und die Methode, mit der sie auf das Gold geladen wird eine Rolle (124). Zur Optimierung gilt es also nur wenige Parameter zu überblicken. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung von chemisch inerten Goldpartikeln als Transfermedium, die von der Food and Drug Administration (FDA), der amerikanischen Zulassungsbehörde für Nahrungsmittel und pharmazeutische Produkte, als human therapeutisches Mittel zugelassen sind.

Die genannten Vorteile ermutigten zur Weiterentwicklung der Methode zum Ballistomagnetischen Vektor System, welches zusammen mit der von mir eingeführten MIP-Methode in Studien zur genetischen Vakzinierung zunehmend an Bedeutung gewinnt (118, 121, 122, 123).

2.8.4.4 Ballistomagnetischer Gentransfer

Beim ballistomagnetischen Gentransfer werden zusätzlich zur DNA superparamagnetische Beads in die Zelle transferiert.

Die mit der DNA eingebrachten superparamagnetischen Beads erlauben eine Anreicherung der transfizierten Zellen durch Magnetisierung der sich in den Zellen befindenden superparamagnetischen Beads in einem Magnetfeld. Die Anreicherung erfolgt durch magnetische Separation von getroffenen und nichtgetroffenen Zellen in einem „Hochgradienten Magnetfeld“.

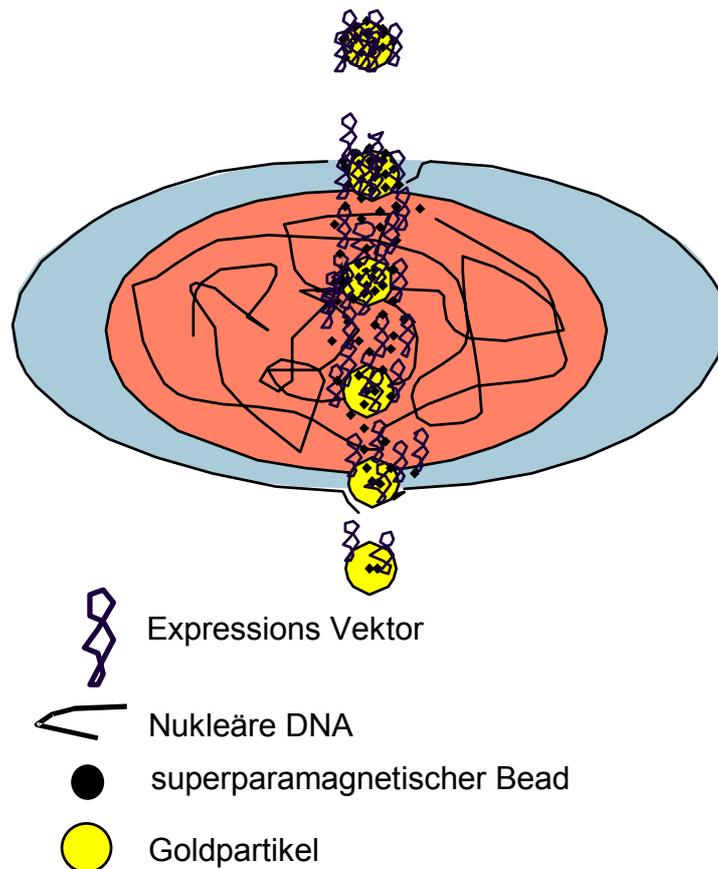


Abbildung 2-3: Die ballistischen Partikel treffen auf die Zellen in der Petrischale, durchschlagen die Zellmembran, das Zytoplasma, die Kernmembran und den Zellkern. Zum Teil treten sie wieder aus den Zellen aus. Dabei werden insbesondere im Zellkern mit seiner hohen Viskosität viele Magnetpartikel vom Gold abgestreift.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines klinisch einsetzbaren Gentransfersystems für die somatische Gentherapie. Als Grundlage dafür diente der ballistomagnetische Gentransfer von adhärenenten Zellen (134). Dieser sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Anwendung in klinischen Gentherapiestudien modifiziert und in seinem Arbeitsablauf optimiert werden. Zuerst sollte eine Methode zur Kultivierung von Zellen entwickelt werden, die ballistomagnetischen Gentransfer unabhängig von zelleigener Adhärenz oder adhäsionsfördernden Substanzen erlaubt, d.h. die Methode sollte für adhärierende und nicht adhärierende Zellen gleich gut geeignet sein. Dadurch sollte verhindert werden, daß bei der Kultivierung Subpopulationen von Tumorzellen mit bestimmten Eigenschaften selektiert werden. Vielmehr sollte ein Verfahren gefunden werden, durch das alle nach der Tumordissoziation vorhandenen Qualitäten von Zellen zur Transfektion zur Verfügung stehen.

Um die Vitalität der Zellen zu erhalten, sollte die Herstellung der Vakzine, d.h. angefangen von der Resektion des Tumorgewebes, über die Inkubation der Zellen im Brutschrank nach ihrer gentechnischen Veränderung und dem abschließenden Einfrieren der Vakzine, nicht mehr als 12h dauern.

Um eine hohe Transfektionsrate zu erzielen, sollten die Zellen so ausgesät werden, daß das Verhältnis der Oberfläche der Zellkerne zur Gesamtoberfläche der Zellen möglichst groß ist. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß die Zellkerne beim Gentransfer direkt getroffen werden.

Die Eigenschaften der Methode sollten anhand einer Auswahl von Zelllinien demonstriert und mit dem von Burkholder et al. (128) beschriebenen Verfahren verglichen werden.

Das Potential der neuen Methode sollte anhand unterschiedlicher Primärkulturen des malignen Melanoms und des Nierenzellkarzinoms, die im Rahmen einer klinischen Studie mit Expressionskonstrukten für Interleukin-7 und GM-CSF transfiziert wurden, untersucht werden.