

Aus dem Experimental and Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Intratumorale Verteilung, systemische Biodistribution und
Clearance eines TNF α exprimierenden MIDGE Vektors nach
nicht-viraler in vivo Jet-Injektion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nele Ruth Galling

aus Braunschweig

Datum der Promotion: 04. September 2015

Gewidmet Karola und Gottfried Galling.

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Krebs | 9 |
| 1.1.1 Das maligne Melanom | 11 |
| 1.2 Therapiestrategien von Krebserkrankungen | 15 |
| 1.2.1 Therapie des malignen Melanoms | 17 |
| 1.2.2 Gentherapie und Tumorgentherapie | 19 |
| 1.2.2.1 Vektoren in der Gentherapie | 21 |
| 1.2.2.1.1 Virale Vektoren | 21 |
| 1.2.2.1.2 Nicht-virale Vektoren | 22 |
| 1.2.2.1.3 MIDGE Vektor | 22 |
| 1.2.2.2 Technologien für den Gentransfer | 23 |
| 1.2.2.3 Bioverteilung von Vektoren nach Gentransfer | 24 |
| 2. ZIELSTELLUNG | 26 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 3.1 Materialien | 27 |
| 3.1.1 Chemikalien und Puffer | 27 |
| 3.1.2 Materialien für die Zellkultur | 28 |
| 3.1.3 Tiermodell | 28 |
| 3.1.4 Materialien für Restriktionsverdau, PCR und RT-PCR | 28 |
| 3.1.5 Antikörper | 29 |
| 3.1.6 Kits | 29 |
| 3.1.7 Geräte | 29 |
| 3.2 Methoden | 30 |
| 3.2.1 Zellkultivierung | 30 |
| 3.2.2 Tiermodell mit Etablierung der Xenotransplantat Tumoren | 31 |
| 3.2.3 In Vivo Jet-Injektion | 31 |
| 3.2.4 DNA Isolierung aus Tumor- und Organgeweben und Vollblut | 33 |
| 3.2.5 RNA Isolierung aus Tumor- und Organgeweben | 35 |
| 3.2.6 DNA Restriktionsverdau | 35 |
| 3.2.7 Real-time qPCR zur Vektor Quantifizierung | 36 |
| 3.2.7.1 Real-time PCR Ansatz | 37 |
| 3.2.7.2 PCR Programm | 38 |
| 3.2.7.3 Primer und Sonden für MIDGE-CMVhTNF | 38 |
| 3.2.8 Quantitative real-time RT-PCR Analyse der TNFα Expression | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.9 <i>ELISA zur Detektion von TNFα Protein im Tumorgewebe</i> | 39 |
| 3.2.10 <i>Immunhistochemischer Nachweis von TNFα in Tumorschnitten</i> | 41 |
| 3.2.11 <i>Statistische Verfahren</i> | 42 |
| 4. ERGEBNISSE | 43 |
| 4.1 <i>Vergleichende Analyse zur Optimierung der Vektor Recovery</i> | 43 |
| 4.2 <i>Analyse der <i>in vivo</i> MIDGE Vektorverteilung Jet-injizierter MIDGE DNA</i> | 44 |
| 4.2.1 <i>Quantitativer Nachweis von MIDGE Vektor-DNA im Tumorgewebe</i> | 44 |
| 4.2.2 <i>Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma</i> | 48 |
| 4.2.3 <i>Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA in Organen</i> | 50 |
| 4.3 <i>Analyse der TNFα Expression</i> | 55 |
| 4.3.1 <i>Quantitative Analyse der TNFα mRNA Expression im Tumor</i> | 56 |
| 4.3.2 <i>Quantitative Analyse der TNFα Proteinexpression im Tumor mittels ELISA</i> | 57 |
| 4.3.3 <i>Evaluation der TNFα Expression im Tumor mittels Immunhistochemie</i> | 58 |
| 5. DISKUSSION | 60 |
| 5.1 <i>Analyse der <i>in vivo</i> Vektorverteilung Jet-injizierter MIDGE Vektor-DNA</i> | 60 |
| 5.2 <i>Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma</i> | 62 |
| 5.3 <i>Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA in Organen</i> | 63 |
| 5.4 <i>Analyse der TNFα Expression</i> | 66 |
| 5.5 <i>Evaluation der TNFα Expression im Tumor mittels Immunhistochemie</i> | 68 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 70 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 72 |
| 8. LEBENSLAUF | 84 |
| 9. WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT | 84 |
| 10. ERKLÄRUNG | 86 |
| 11. DANKSAGUNG | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| AAV | Adeno Associated Vector |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| ALM | Akrolentiginöses Melanom |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| c-Src | Cellular Sarcoma (Tyrosinkinase Src) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CT | Computertomographie |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| etc. | Et cetera |
| fg | Femtogramm |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| G6PDH | Glucose-6-Phosphatdehydrogenase |
| h | hour |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HER2/neu | Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| HSV-Tk | Herpes Simplex Thymidine Kinase |
| ILP | Isolated Limb Perfusion |

| | |
|-------------------|---|
| LMM | Lentigo-maligna-Melanom |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MIDGE | Minimalistische Immunologisch Definierte Genexpression |
| min | Minute(n) |
| mm | Millimeter |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| ng | Nanogramm |
| NM | Noduläres Melanom |
| nm | Nanometer |
| NMRI nu/nu | Naval Medical Research Institute; Thymusaplastische Mäuse |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PDGFR | Platelet Derived Growth Factor Receptor |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| pg | Pikogramm |
| qPCR | Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction |
| ras | rat sarcoma (GTP-bindendes Protein) |
| RIPA | Radioimmunoprecipitation Assay Buffer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium) |
| RT | Reverse Transkriptase |
| s | Sekunden |
| s.c. | subkutan |

| | |
|--------------|---|
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| SLNB | Sentinel Lymph Node Biopsy |
| SSM | Superfiziell spreitendes Melanom |
| TAV | Tumor Associated Vasculature |
| TBST | Tris-Buffered Saline Tween-20 |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TNM | TNM staging system (tumor, nodes, metastases) |
| VEGFR | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ m | Mikrometer |

1. EINLEITUNG

1.1 Krebs

Krebs ist eine Erkrankung, die in Deutschland die zweithäufigste krankheitsbedingte Todesursache nach Herz- und Kreislauferkrankungen darstellt (siehe Abb. 1). Es zeigt sich hierbei eine Inzidenz von 350/100.000 bei Frauen und 450/100.000 bei Männern mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von durchschnittlich etwa 60% [1] .

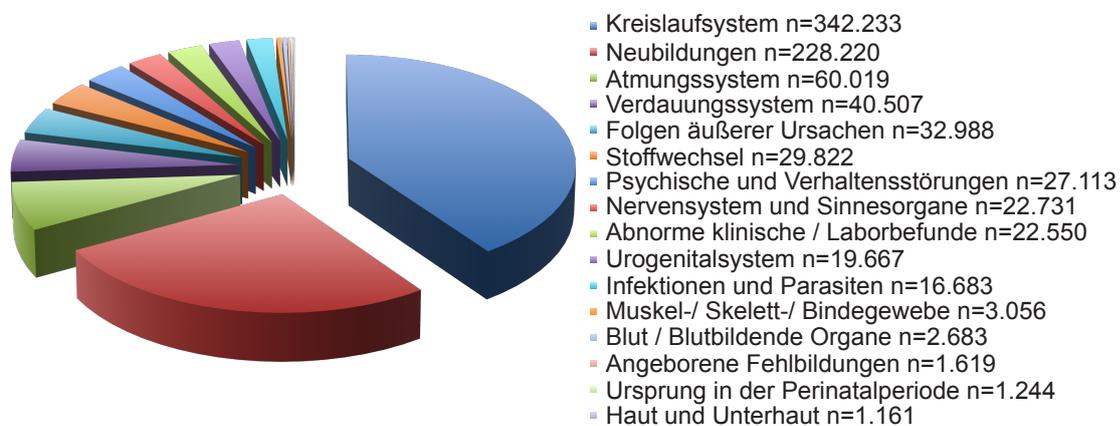


Abb. 1: Anteile der Todesursachen im Jahr 2011 in der Bundesrepublik Deutschland, modifiziert nach [2] .

Der Entstehung von Krebserkrankungen liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde, wobei ein mehrstufiger Prozess auf zellulärer Ebene für das Tumorwachstum verantwortlich ist. Es fließen genetische und umweltbedingte Faktoren ein, die auf unterschiedliche Weise in den natürlichen Zellzyklus, das Migrationsverhalten, die Apoptose etc. eingreifen.

Hierbei verursachen zunächst natürliche, chemische, virale und strahlenassoziierte Karzinogene Mutationen auf DNA-Ebene. In der gesunden Zelle resultiert aus einer solchen Mutation die DNA-Reparatur, ein Mitose-Arrest und somit Verhinderung der weiteren Zellteilung oder der direkte programmierte Zelltod, die Apoptose [3] .

Betrifft die Mutation jedoch direkt ein Tumorsuppressorgen oder ein zelluläres Proto-Onkogen, ergeben sich Konsequenzen, die das Tumorwachstum triggern können.

Durch die mutationsbedingte Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen können diese ihre Funktion nicht mehr ausüben. Es kommt trotz geschädigter DNA nicht zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose [4] . Die entartete Zelle kann ungebremst proliferieren.

Ist ein Proto-Onkogen von einer Mutation betroffen, so werden Proteine, die z.B. in den Zellzyklus eingreifen und ihn kontrollieren, ungebremst translatiert oder sind konstitutiv aktiv. Hierzu gehören Wachstumsfaktoren (z.B. TGF, PDGF), Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGFR, PDGFR, VEGFR, HER2/neu), zytoplasmatische Tyrosinkinasen (z.B. c-Src) und GTP-bindende Proteine (z.B. ras) [5] . Die von der Mutation betroffene Zelle erhält so dauerhaft das Signal zu proliferieren. Diese proliferierenden Zellen können nun als sogenanntes *carcinoma in situ* verbleiben: Hierbei findet kein Durchbruch der tumoreigenen Basallamina statt, es kommt nicht bzw. zunächst nicht zur Invasion.

Invasive Tumoren hingegen zeichnen sich dadurch aus, dass das Wachstum der Tumorzellen angrenzende Strukturen überschreitet [6] . Es kann ferner zum Ablösen einzelner Zellen vom soliden Tumor und deren Migration in Lymph- oder Blutgefäße kommen. Oft bleibt diese lokale Mikroinvasion ohne weitere Folgen. Können die Zellen jedoch im Gefäß dem körpereigenen Immunsystem entgehen und gelingt ihnen anschließend die Adhäsion an Endothelzellen mit Extravasation aus den Gefäßen, können an distanten Stellen im Körper die Tumorzellen erneut proliferieren und Angiogenese triggern: Eine Fernmetastase entsteht [7] .

Das Potenzial zur Metastasierung eines Tumors hängt von verschiedenen Faktoren ab. Das lokale Umfeld, die Fähigkeit zur Angiogenese, Stroma-Tumor-Interaktionen, die Freisetzung von Zytokinen im lokalen Gewebe und besonders der molekulare Phänotyp des Tumors sind dafür entscheidend, ob Invasion und Migration der Zellen erfolgreich sein können [8, 9] .

Mit der Metastasierung der Tumorzellen ändert sich die Prognose der Krebserkrankung und ihrer Therapiemöglichkeiten. Alleinige lokale Therapie (siehe Kap. 1.2) kann nun keinen kurativen Heilungsansatz mehr bieten.

Das wachsende Verständnis der molekularen Prozesse, denen die Tumorproliferation, -invasion und -migration unterliegen, führt zu immer differenzierteren Angriffsmöglichkeiten und somit erfolgversprechenden neuen Entwicklungen in der Tumorthherapie. Hierdurch können mögliche therapeutische

Targets besser definiert werden, die z.B. auch Angriffsmöglichkeiten für eine Gentherapie eröffnen.

1.1.1 *Das maligne Melanom*

Das maligne Melanom ist der häufigste maligne Hauttumor mit einem Lebenszeitrisiko von etwa 1:75. Die Manifestation dieser Krebsart hat sich seit den 1980er Jahren in Deutschland verdreifacht [10]. Besonders hohe Inzidenzen des kutanen Melanoms finden sich in Australien, Neuseeland, Südafrika, Europa und den USA (siehe Abb. 2).

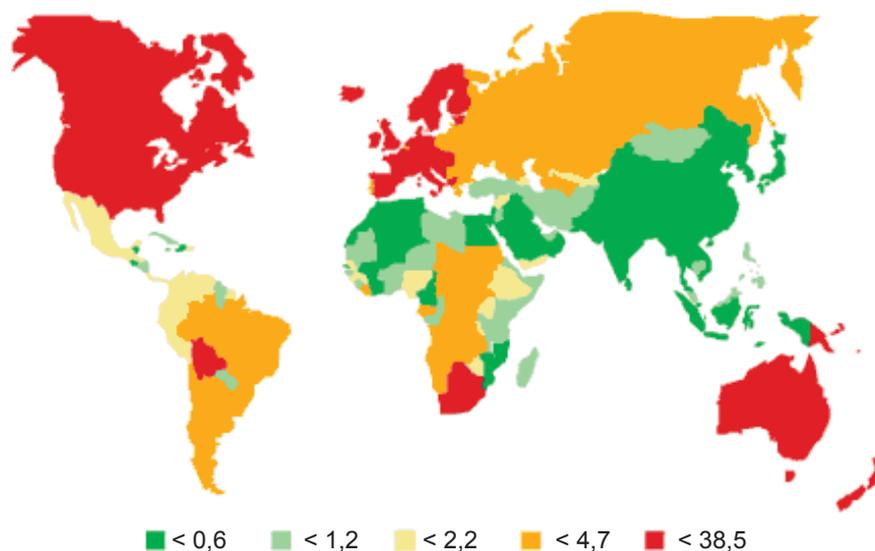


Abb. 2: Weltweite Inzidenzraten kutaner Melanome im geographischen Überblick. Rot gekennzeichnete Länder weisen höchste, grün gekennzeichnete Länder niedrigste Inzidenzen auf. Nach Globocan Datenbank 2002.

Man unterscheidet beim malignen Melanom vier klinisch-histologische Subtypen: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das Noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM) und das Akral-lentiginöse Melanom (ALM), die sich neben den unterschiedlichen histopathologischen Befunden auch in Häufigkeit,

Altersgipfel, Lokalisation und Prognose unterscheiden (siehe Tab. 1). Auf Sonderformen des Melanoms soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Tab. 1: Klinisch-histologische Subtypen des malignen Melanoms. Modifiziert nach der Deutschen Leitlinie: Malignes Melanom (2005).

| Subtyp | Häufigkeit | Medianes Erkrankungs- alter | Lokalisation | Prognose |
|---|-------------------|--|---------------------------------|-----------------|
| Superfiziell spreitendes Melanom | 57.4 % | 51 Jahre | Rumpf, Unterschenkel | Eher günstig |
| Noduläres Melanom | 21.4 % | 56 Jahre | Rücken, Brust, Extremitäten | Schlecht |
| Lentigo-maligna-Melanom | 8.8 % | 68 Jahre | Gesicht | Eher günstig |
| Akral-lentiginöses Melanom | 4 % | 63 Jahre | Hautareale ohne Haarfollikel | Ungünstig |

Das maligne Melanom geht vom melanozytären Zellsystem aus und manifestiert sich fast ausschließlich in der Haut. Sehr selten kann es auch an Auge, Schleimhaut und Hirnhaut vorkommen [11]. Sein Wachstum zeigt eine Verlaufsform in zwei Phasen. So proliferieren die Melanozyten, die Kern- und Zelltypen aufweisen, zunächst horizontal in der Basalschicht der Epidermis. Die oberen Schichten der Epidermis können nach und nach ebenfalls von atypischen Melanozyten infiltriert werden – dennoch beschränkt sich das horizontale Wachstum auf die intraepidermale Region der Cutis (Level I nach Clark, siehe Tab. 2 und Abb. 3).

Tab. 2: Eindringtiefe des malignen Melanoms (Clark Level).

| Level | Definition |
|-------|--|
| I | Intraepidermal |
| II | Einbruch in das Stratum papillare |
| III | Stratum papillare vollständig ausfüllend |
| IV | Invasion in das Stratum reticulare |
| V | Invasion in die Subkutis |

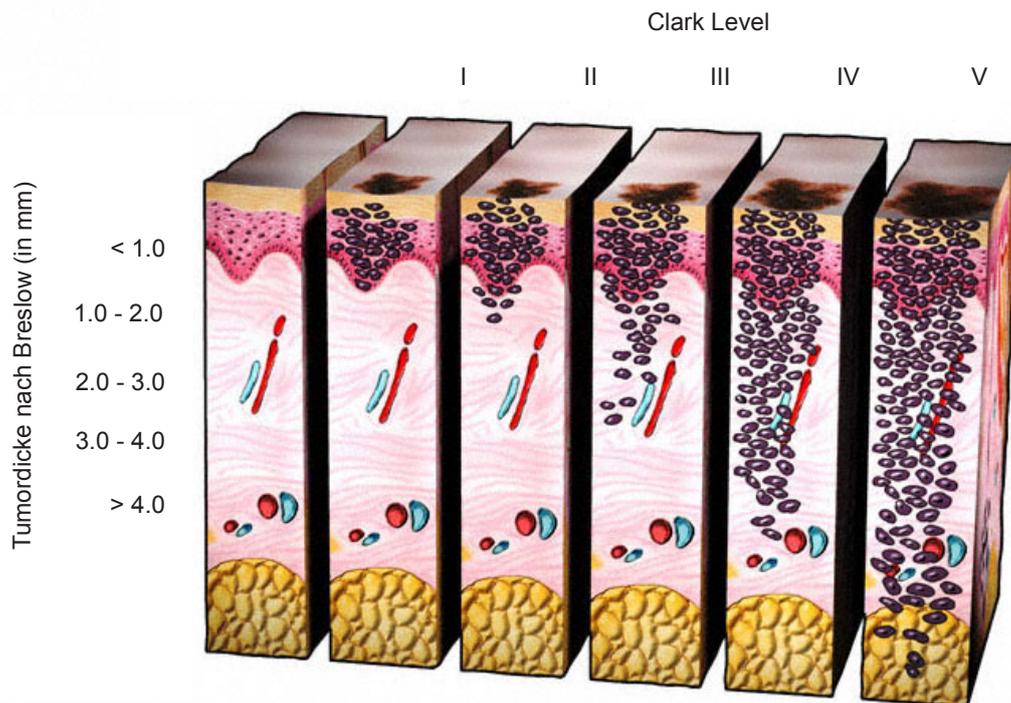


Abb. 3: Schematische Darstellung von Clark Level und Tumordicke nach Breslow. Definition Clark Level siehe Tab. 2. Die maximale Tumordicke nach Breslow wird im operativ entfernten Primärtumor unabhängig von der Invasion verschiedener Hautschichten von Tumoroberfläche bis zur tiefsten Tumorzelle gemessen (modifiziert nach www.med-ars.it).

Die vertikale Wachstumsphase beginnt, sobald die Melanozyten die Basalmembran der Epidermis durchbrechen und somit Anschluss an das Lymph- und Blutgefäßsystem erlangen (Clark Level V, siehe Tab. 2 und Abb. 3). Hierbei spielt die maximale Tumordicke (Breslow-Level, siehe Abb. 3) als histologische Klassifikation eine entscheidende Rolle zur Beurteilung der Prognose. So beträgt bei einer Tumordicke von unter 1,0 mm die 10-Jahresüberlebensrate über 90%, bei einer Dicke von mehr als 4,0 mm nur knapp 50% [12].

Als entscheidender Prognosefaktor hat sich beim malignen Melanom die Kombination aus Tumordicke nach Breslow, Invasionslevel nach Clark und das Ausmaß der Ulzeration des Primärtumors durchgesetzt [13].

Die Metastasierung des malignen Melanoms wird in verschiedene Stadien eingeteilt. Sie erstrecken sich von Satellitenmetastasen (etwa 2 cm um den Primärtumor) über in-transit Metastasen (bis zur ersten Lymphknotenstation) und regionäre Lymphknotenmetastasen bis hin zu Fernmetastasen mit Organbefall. Eine primär lymphogene Metastasierung ist hierbei häufiger zu beobachten als die primär hämatogene.

Die Diagnostik des malignen Melanoms erfolgt zunächst über die dermatoskopische Inspektion des betroffenen Hautareals. Entsprechend der ABCDE-Regel (asymmetry, border, colour, diameter, evolution) kann der Verdacht auf ein malignes Geschehen erhärtet werden. Asymmetrie, unregelmäßige Begrenzung, inhomogene Farbe, ein Durchmesser >6 mm und die Elevation über das Hautniveau sprechen für Malignität des Tumors [14]. Wird ein solcher Befund erhoben, so ergibt sich die Notwendigkeit einer Ausbreitungsdiagnostik. Diese besteht standardmäßig aus Lymphknotenultraschall bzw. Sentinel Lymphknoten Biopsie (SLNB), Röntgen Thorax und Abdomensonographie einschließlich Becken und Retroperitoneum. Im Einzelfall können CT, PET und MRT-Untersuchung als Alternative oder Ergänzung hinzugezogen werden. Dennoch bleibt das wichtigste diagnostische Kriterium zum Staging des malignen Melanoms der histopathologische Befund des Primärtumors (s.o.) [15].

Die Therapie des malignen Melanoms reicht von der chirurgischen Sanierung des Primärherdes bis hin zu neuesten erfolgversprechenden gentechnologischen Therapiestrategien (siehe Kap. 1.2) [16, 17].

1.2 Therapiestrategien von Krebserkrankungen

Als Therapieoptionen der Wahl haben sich für Krebserkrankungen die onkologische Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie etabliert [18] . Des weiteren gelten die Antihormontherapie und die so genannte Krebsimmuntherapie als neuere Therapiestrategien der Wahl bei verschiedenen Tumorarten [19, 20] .

Die jeweilige Therapiestrategie richtet sich nach dem Typing (Art), Grading (Malignitätsgrad) und Staging (Ausbreitung) des Tumors.

In der onkologischen Chirurgie wird das Ziel verfolgt, solide Tumoren mit einem R0-Resektionsrand, also im Gesunden, zu entfernen. Diese Therapie eignet sich primär für Tumoren, die nicht metastasiert haben. Ein organ- oder funktionserhaltendes Vorgehen ist hierbei meist unerlässlich [21] .

Das Konzept der onkologischen Chirurgie wird auch mit Chemo- und/oder Radiotherapie kombiniert. Es kann oftmals sinnvoll sein, letztere als neoadjuvante Therapieform anzuwenden. Eine hierdurch erreichte Größenreduktion des Primärtumors („Downsizing“, s.u.) erlaubt oft erst danach die chirurgische Sanierung [22] .

Die konventionelle Chemotherapie basiert weitestgehend auf dem Ansatz, dass Tumorzellen eine besonders hohe Proliferation und somit eine große Teilungsfähigkeit besitzen. An diese Zellen greifen Zytostatika an und entwickeln ihre toxische Wirkung auf verschiedenste Weisen (Vernetzung von DNA-Strängen, Mitosehemmung, DNA- und RNA-Synthesehemmung etc.) [23] . Limitierende Faktoren einer Chemotherapie sind ihre zytostatische Wirkung auf gesunde Zellen, ihre potenzielle Kanzerogenität und Mutagenität [24, 25, 26] . Es ist daher von größter Relevanz, den Nutzen einer Chemotherapie abzuwägen und die oft geringe therapeutische Breite nicht zu überschreiten. Die Wahrscheinlichkeit der Tumorvernichtung muss bei noch vertretbarem Risiko der unerwünschten Nebenwirkungen hoch sein, um ein optimales Verhältnis zwischen Wirkung und Nebenwirkung gewährleisten zu können.

In der Radiotherapie kommen ionisierende Strahlen zum Einsatz. Hierdurch werden die Zellen indirekt durch die Bildung freier Radikale und direkt durch DNA- und Zellschäden am Wachstum gehindert und Apoptose wird induziert. In der Radioonkologie gibt es verschiedene therapeutische Herangehensweisen: Durch Bestrahlung kann die (oft prä-operative) Verkleinerung des Tumors („Downsizing“), die Verhinderung eines post-operativen lokoregionären Rezidivs und/oder die

Devitalisierung des Tumors (um bei intraoperativer Verschleppung eine Metastasenbildung zu verhindern) erreicht werden [27]. Zusätzlich kann bei Vollremissionen nach Chemotherapie die Radiotherapie das erreichte Ergebnis stabilisieren bzw. für die Chemotherapie schwer erreichbare Organe (i.e. zentrales Nervensystem, Hoden) zum Ziel haben.

Die Strahlungssensibilität des Gewebes ist entscheidend dafür, ob eine Radiotherapie überhaupt in Betracht gezogen werden kann [28]. Lokale und systemische Früh- und Langzeitnebenwirkungen wie Keimzellschädigung und Krebsinduktion stellen wichtige Limitationen der Radiotherapie dar [29].

Die Antihormontherapie bekommt neben diesen drei klassischen Therapiestrategien eine immer größere Bedeutung. Sie basiert auf der Erkenntnis, dass Hormone eine entscheidende Rolle in der Wachstumsregulation verschiedenster Zellen haben. Unter ihrem Einfluss proliferieren auch einige Tumorzellarten besonders rapide. Um dieses Wachstum zu verlangsamen bzw. zu stoppen, nutzt man die Antihormontherapie: Körpereigene Hormone werden herunterreguliert, antagonisiert oder Hormonrezeptoren werden moduliert. Verschiedene Krebsarten sprechen auf eine Antihormontherapie an. Hierzu gehören Mamma-, Prostata-, Ovarial- und Endometriumcarcinome [30, 31, 32]. Dennoch ist eine Vollremission allein unter Antihormontherapie extrem selten. Kombinationen aus onkologischer Chirurgie und Antihormontherapie sind hingegen vielversprechend.

Die so genannte Krebsimmuntherapie ist eine Therapiestrategie, die auf dem Vermögen des menschlichen Immunsystems basiert, körperfremde Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Therapeutische monoklonale Antikörper, wie z.B. Bevacizumab (Colon-, Mamma-, Bronchialcarcinom), Rituximab (Non Hodgkin Lymphome) oder Trastuzumab (Mamma-, Magencarcinom), binden an Tumorzellen und lösen entweder durch eine direkte Signalkaskade eine Apoptose der Tumorzelle aus oder triggern durch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität die komplementabhängige Zytolyse [33].

Insgesamt hat sich als Therapiestrategie eine Kombination der verschiedenen Möglichkeiten durchgesetzt. So können sich systemische Wirkung von Chemo-, Antihormon- und Krebsimmuntherapie und lokal begrenzte Wirkungen von Chirurgie und Strahlentherapie in vielen Therapiekonzepten ergänzen.

Aufgrund des dennoch limitierten therapeutischen Potenzials steht neben oben genannten klassischen Therapiemöglichkeiten seit geraumer Zeit die Entwicklung neuer Therapiestrategien im Fokus medizinischer Forschung. Hierbei spielt die Tumorgentherapie eine entscheidende Rolle (siehe Kap. 1.2.2).

1.2.1 Therapie des malignen Melanoms

Die Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach dem jeweils aktuellen Tumorstadium bei Diagnosestellung. Hierbei kommt die klassische TNM-Einteilung (tumor, (lymph) node, metastasis) immer noch zum Einsatz. Sie wurde darüberhinaus durch die Tumorstadieneinteilung des AJCC (American Joint Committee on Cancer) im Jahre 2002 ergänzt (siehe Tab. 3) [34].

Tab. 3: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (modifiziert nach AJCC 2002).

| Stadium | Breslow-Level | Clark-Level | Ulzeration | Metastasen |
|--------------|---------------|-------------|------------|--|
| 0 | 0 mm | I | Keine | Keine |
| I A | < 1.0 mm | II – III | Keine | Keine |
| I B | < 1.0 mm | I - III | Vorhanden | Keine |
| I B | Irrelevant | IV – V | Keine | Keine |
| I B | 1.0 – 2.0 mm | Irrelevant | Keine | Keine |
| II A | 1.0 – 2.0 mm | Irrelevant | Vorhanden | Keine |
| II A | 2.0 – 4.0 mm | Irrelevant | Keine | Keine |
| II B | 2.0 – 4.0 mm | Irrelevant | Vorhanden | Keine |
| II B | > 4.0 mm | Irrelevant | Keine | Keine |
| II C | > 4.0 mm | Irrelevant | Vorhanden | Keine |
| III A | Irrelevant | Irrelevant | Keine | 1 – 3 LK*- Mikrometastasen |
| III B | Irrelevant | Irrelevant | Keine | Mind. 1 LK*- Makrometastase |
| III B | Irrelevant | Irrelevant | Vorhanden | 1 – 3 LK*- Mikrometastasen |
| III B | Irrelevant | Irrelevant | Irrelevant | In-Transit- oder Satellitenmetastasen |
| III C | Irrelevant | Irrelevant | Vorhanden | Mind. 1 LK*- Makrometastase |
| III C | Irrelevant | Irrelevant | Irrelevant | > 4 LK*- Makrometastasen |
| IV | Irrelevant | Irrelevant | Irrelevant | Fernmetastasen |

* LK: Lymphknoten

Die Therapiestrategie der Wahl beinhaltet in allen Stadien zunächst die vollständige Resektion des Primärherdes (auf einzelne Ausnahmen bei Primärtumoren, die durch ihre Lokalisation im Gesicht oder an den Akren keine Möglichkeit der chirurgischen Therapie bieten, soll hier nicht weiter eingegangen werden). Die Breite des Resektionsrandes richtet sich nach der Tumordicke nach Breslow (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Abhängigkeit von Tumordicke (nach Breslow) und Resektionsrand in der onkologischen Chirurgie des malignen Melanoms [35] .

| Tumordicke nach Breslow | Sicherheitsabstand |
|--------------------------------|---------------------------|
| Melanoma in situ | 0,5 cm |
| < 2,0 mm | 1 cm |
| > 2,0 mm | 2 cm |

Ab Tumoren mit einem Breslow-Level von 1 mm wird eine Biopsie des Wächterlymphknotens empfohlen, um die Ausbreitung des Melanoms einschätzen zu können. Ob eine (radikale) Lymphadenektomie anschließend jedoch von Vorteil für den Patienten ist, wird aktuell in der Literatur kontrovers diskutiert [36, 37, 38] .

Die Strahlentherapie spielt eine untergeordnete Rolle in der Therapie des malignen Melanoms. Sie kommt sowohl zum Einsatz, wenn eine chirurgische Resektion nicht möglich oder erwünscht ist, als auch bei postoperativ persistierenden in-transit Metastasen, Knochen- und Hirnmetastasen [39, 40] .

Eine immer größere Bedeutung gewinnen bei der Therapie des malignen Melanoms neuartige Therapiestrategien. Hierzu gehören die Immuntherapie mit Interferonen wie zum Beispiel IFN α allein oder in Kombination mit isolierter (hyperthermer) Extremitätenperfusion (ILP, Isolated Limb Perfusion), ebenso wie die ILP kombiniert mit Zytokinen wie TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) und bestimmten Chemotherapeutika, wie z.B. Melphalan [41, 42] .

Die unerwünschten Nebenwirkungen bei systemisch applizierten Chemo- und Immuntherapien können mit der ILP weitestgehend vermieden werden. Da besonders das superfiziell spreitende und das noduläre Melanom am ehesten an den

Extremitäten lokalisiert sind, hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten die ILP als Therapiestrategie dieser Formen etabliert [43, 44] .

Bei der ILP, deren Prinzip bereits 1958 erstmals durch Creech et al. beschrieben wurde, wird die Durchblutung der betroffenen Extremität vom körpereigenen Kreislauf getrennt [45] . Während der lokalen Behandlung des Melanoms wird mit Hilfe einer Herz-Lungen-Maschine die extrakorporale Zirkulation aufrecht erhalten. Über den arteriellen Zufluss können nun Chemotherapeutika und Zytokine in hohen Dosen appliziert werden, die bei einer systemischen Applikation eine große Anzahl unerwünschter Wirkungen mit sich brächten. Deshalb ist es von größter Bedeutung, dass es nicht zu einem Leck kommt, durch das die Therapeutika schließlich in den Körperkreislauf gelangen könnten.

TNF α , ein körpereigenes proinflammatorisches Zytokin des Immunsystems, hat sich in der lokoregionären Therapie des malignen Melanoms in Kombination mit ILP bewährt [46, 47] . Neben der proapoptotischen und antiproliferativen Wirkung hat TNF α auch einen positiven Einfluss auf die erhöhte Aufnahme von Chemotherapeutika in das Tumorgewebe [48] .

Aufgrund des Risikos von Komplikationen während und nach der ILP sowie dem therapeutischen hohen Aufwand, rückt in der Suche nach neuartigen Applikationsmöglichkeiten die Gentherapie immer mehr in den Fokus aktueller Studien [49] .

1.2.2 Gentherapie und Tumorgentherapie

Die Gentherapie hat sich in den letzten Jahren in der medizinischen Forschung immer mehr als Therapiestrategie etabliert. Die ursprüngliche Idee der Gentherapie für die Heilung monogenetischer Erkrankungen wurde um den Gedanken erweitert, auch Erkrankungen wie Krebs als Ziel zu definieren. Aufgrund der hohen Inzidenz dieser Erkrankung sind international große Bemühungen für die Entwicklung einer effektiven Tumorgentherapie zu verzeichnen. Inzwischen machen bereits 64,4% aller klinischen Gentherapie-Studien Tumorgentherapie aus (siehe Abb. 4).

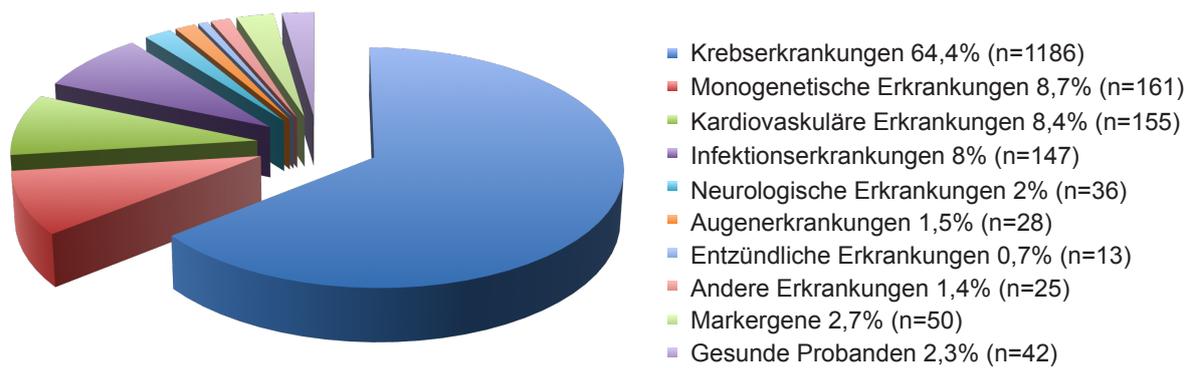


Abb. 4: Indikationen für klinische Genterapiestudien (modifiziert nach The Journal of Gene Medicine, Stand 2012).

Der genterapeutische Ansatz beruht auf dem Transfer eines Genkonstrukts in eine Zielzelle [28]. Hierbei kann die DNA bzw. RNA selbst als pharmazeutisch aktive Substanz fungieren, die episomal in den Zellen zeitlich begrenzt persistiert oder aber in das Genom stabil integriert wird. In einer Vielzahl genterapeutischer Studien kodiert diese DNA für ein intaktes therapeutisches Gen, das ein von Mutation betroffenes Gen (z. B. Proto-Onkogen, Tumorsuppressorgen) ersetzen soll und so den Malignitätsgrad der Tumorzellen reduzieren kann.

In der Tumorgentherapie werden verschiedene Therapiestrategien verfolgt. Hierzu zählen unter anderem Suizidgentherapie, Immuno-Gentherapie, Gensuppressionstherapie und die Anti-Angionese Gentherapie [50].

Die in der Forschung am stärksten vertretene Strategie stellt die Suizidgentherapie dar. Hierbei wird ein Suizidgen selektiv in Tumorzellen gebracht, wo es die Zellen direkt zum Absterben bringt. Suizidgene sind z.B. bakterielle oder virale Enzyme (z.B. HSV-Tk, Cytosin-Deaminase), die aus so genannten Prodrugs toxische Metabolite generieren, die die Tumorzelle zum Absterben bringen. Durch die Selektivität dieser Therapie können – anders als bei der klassischen Chemotherapie – systemische Nebenwirkungen im Körper vermieden werden.

Die Transgene werden über verschiedene Transportvehikel in die Zielzelle geschleust. Hierfür haben sich zwei Arten von Vektoren in der Forschung und klinischen Anwendung etabliert: virale und nicht-virale (siehe Kap. 1.2.2.1.1 und 1.2.2.1.2). Die Vektoren können mit Hilfe physikalischer oder chemischer Transfertechnologien in die Zielzelle eingebracht werden (siehe Kap. 1.2.2.2), in der sie ihre Wirksamkeit entfalten sollen [51].

1.2.2.1 Vektoren in der Gentherapie

Entscheidend für eine erfolgreiche Tumorgentherapie ist ein effizientes Transportvehikel für den Transfer genetischer Information. Diese Vektoren haben einen ausschlaggebenden Effekt auf Transgenexpression, Bioverteilung und Sicherheit der Therapie. Der ideale Vektor für die Tumorgentherapie bedarf folgender Eigenschaften: Sichere und effektive Applikation, einfache Produktion, langanhaltende Persistenz oder stabile Integration in das Zielgenom, hohe Transgenexpression in Verbindung mit hoher Zielzellspezifität und geringe Immunogenität [52]. Anhand dieser Kriterien ergeben sich sowohl für virale als auch für nicht-virale Vektoren Vor- und Nachteile.

1.2.2.1.1 Virale Vektoren

Virale Vektoren bestehen aus rekombinanten, meist replikationsdefizienten DNA- oder RNA-Viren (Retroviren), die das therapeutische Transgen in ihrem Genom tragen. Sie zeichnen sich durch ihre hohe Transfereffizienz und hieraus resultierende hohe Expression des Transgens und im Falle der Retroviren durch entsprechende Langzeitexpression aus [53]. Ihre Kapazität für Transgene wird durch die Größe des funktionellen Virusgenoms beschränkt. Ein Targeting dieser Vektoren kann über Modifikationen von Virushüllproteinen realisiert werden. Aktuell werden für klinische Gentherapiestudien in 66,8% der Studien DNA- (Adenovirus, AAV) oder RNA-Virusvektoren (Retroviren) verwendet (siehe Abb. 5).

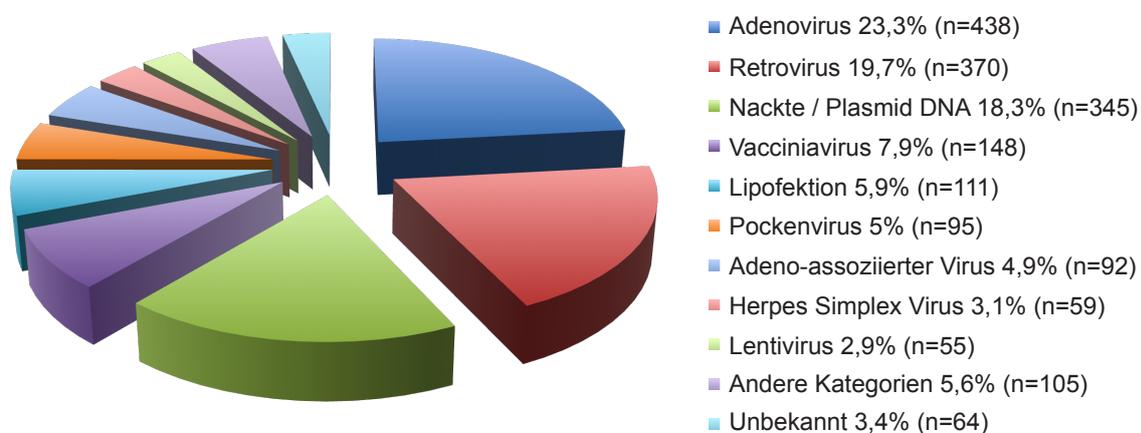


Abb. 5: Genutzte Vektoren in klinischen Gentherapiestudien (modifiziert nach: The Journal of Gene Medicine, Stand 2012).

Trotz des hohen Anteils viraler Vektoren in klinischen Studien ist es noch nicht vollständig gelungen, die potenziellen Nebenwirkungen, die sie mit sich bringen, vollkommen zu überwinden. So besteht die Gefahr der Toxizität, einer ausgeprägten Immunogenität gegenüber viralen Antigenen oder potenziellen viralen Rekombinationen sowie insertioneller Mutagenese [54, 55] .

1.2.2.1.2 Nicht-virale Vektoren

Die potenziellen Risiken der Anwendung von viralen Vektoren können mit der Nutzung nicht-viraler Vektoren umgangen werden. Bereits 18,3 % aller klinischen Versuche in der Gentherapie werden mit dem Transfer von nackter DNA durchgeführt (siehe Abb. 5). Im Rahmen der nicht-viralen Gentherapie werden meist Plasmid-basierte Vektoren verwendet, die als nackte DNA oder aber auch in Komplexen mit Lipiden, Liposomen oder anderen Polymeren transfiziert werden. Neuere Entwicklungen konnten kleinere Vektoren, wie z.B. so genannte Minicircle für die Gentherapie generieren. Nicht-virale Vektoren erfüllen einen hohen Sicherheitsanspruch und besitzen inzwischen auch immer effizientere und zellspezifischere Transfer- und Expressionseigenschaften [56] .

Diese nicht-viralen Vektoren, die je nach Konstrukt in Größe und Transgenkapazität stark variieren können, müssen entweder mit physikalischen (Elektroporation, Ultraschall) oder chemischen Transfermethoden (Lipoplexe, Liposomen) in die Zielzelle eingebracht werden (Transfektion). Sie besitzen nicht die Fähigkeit der eigenständigen Transduktion wie virale Vektoren.

1.2.2.1.3 MIDGE Vektor

Für das Erreichen einer ausreichend hohen Effizienz der *in vivo* Transgenexpression mit gleichzeitig größtmöglicher Biosicherheit wurde ein neuartiger minimalistischer Genexpressionsvektor (MIDGE, Mologen Berlin) entwickelt. Der doppelsträngige DNA-Vektor besteht aus einer Transkriptionseinheit mit einem CMV Promoter und der Transgen-Sequenz. Er ist an beiden Enden mit sogenannten Haarnadelstrukturen kovalent geschlossen (siehe Abb. 6) [57, 58] . Mit einer Größe von circa 2 kb ist der MIDGE Vektor verglichen mit viralen Vektoren, die eine Größe von 7 bis 200 kb aufweisen, außergewöhnlich klein [59] . Verglichen mit nicht-viralen Plasmidvektoren erreicht der MIDGE Vektor eine Größenreduktion von 50 – 80%.

Diese maximale Reduktion von therapeutisch nicht benötigten und potenziell risikobehafteten Gensequenzen (bakterielle und Resistenzgensequenzen) ist entscheidend für die hohe Sicherheit des MIDGE Vektors [58].

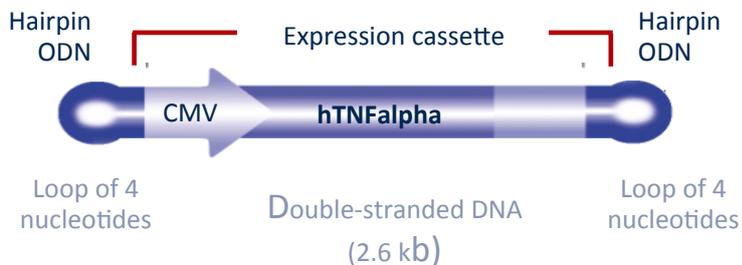


Abb. 6: Schematische Darstellung des MIDGE-CMVhTNF Vektors. Der Vektor besitzt eine Transkriptionseinheit (CMV Promoter, humane TNF α cDNA, RNA stabilisierende Sequenzen) und Haarnadelstrukturen am 5'- und 3'-Ende zum kovalenten Verschluss des Moleküls.

1.2.2.2 Technologien für den Gentransfer

Die Etablierung nicht-viraler Vektorsysteme in der Tumorgentherapie ging mit der Entwicklung neuer Transfertechnologien einher. Im Gegensatz zu viralen Vektoren sind nicht-virale Vektoren prinzipiell nicht in der Lage, effizient selbstständig in die Zielzelle zu gelangen. Vielmehr spricht man im Falle des Einbringens von Fremd-DNA und -RNA von Transfektion. Die stabile Transfektion beinhaltet die teilweise Integration der Fremd-DNA in das Zielgenom. Generell jedoch basiert der nicht-virale Gentransfer auf einer transienten Transgenexpression, da z.B. Plasmidvektoren in der Hauptsache episomal die Transgenexpression vermitteln.

Um eine erfolgreiche Transfektion von therapeutischer Fremd-DNA zu erreichen, wurden neben der einfachen Nadelinjektion verschiedene chemische und physikalische Methoden entwickelt. Hierzu zählen neben Lipofektion, Polyfektion und Kalzium-Phosphat-Präzipitation auch die Elektroporation, Sonoporation, Gene Gun (ballistischer Gentransfer) und Jet-Injektion [60, 61, 62, 63].

Die physikalischen Methoden sind ein wichtiger Bestandteil des Gentransfers nackter DNA. Bei der Elektroporation wird mittels der Erzeugung eines elektrischen Feldes

die Zellmembran der zu transfizierenden Zelle so modifiziert, dass eine Porenbildung stattfindet. Durch diese Poren kann die DNA nun in die Zielzelle eindringen. Durch den anschließend teilweise fehlenden Verschluss erzeugter Zellmembranporen kann sich jedoch die Zellviabilität reduzieren und somit die Anwendung limitieren [60]. Eine ähnliche Porenbildung der Zellmembran kann durch Sonoporation, also eine Behandlung der Zellen mit Ultraschallwellen, erfolgen [61]. Die Transfektion mit der Gene Gun, der sogenannten Genkanone, erfolgt mittels Bindung einzubringender DNA an Nanopartikel wie Wolfram oder Gold und eventuell anschließender Beschichtung mit einem kationischen Polymer zur weiteren Steigerung der Transfektionseffizienz [62]. Diese Partikel können zelluläre Barrieren überwinden, sodass die Fremd-DNA schließlich die Zielzellen erreicht.

Die Jet-Injektion stellt eine besonders effektive Gentransfermethode für nicht-virale Vektoren dar [64]. Hierbei wird nadellos mit Hilfe von bis zu 3,0 bar Druck die Fremd-DNA in das Gewebe appliziert. Diese Technik erlaubt das Einbringen von kleinsten DNA Mengen in kleinen Volumina in verschiedene Zielorgane oder Gewebe mit einer hohen Penetrationstiefe und lokal weitreichender Dispersion. In einer klinischen Phase I Studie konnte bereits ein erfolgreicher Gentransfer ohne jegliche Nebenwirkungen beim Patientenkollektiv via Jet-Injektion erzielt werden [64].

1.2.2.3 Bioverteilung von Vektoren nach Gentransfer

Die in der Tumorgentherapie verwendeten Vektoren und Transfermethoden unterscheiden sich maßgeblich in ihren Eigenschaften (siehe Kap.1.2.2.1 - 1.2.2.2). Die potenzielle Toxizität für den Organismus, mögliche Keimbahnmutationen und die ungewollte Verteilung des Genkonstruktes im Zielorganismus im Zuge der klinischen Tumorgentherapie machen Untersuchungen zur Biosicherheit jeder Genthapiemethode unumgänglich [65].

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) hat sich in Studien zur Biosicherheit in der Gentechnik bewährt [66]. Mit dieser Methode können kleinste Mengen von Vektor-DNA in distanten Organen detektiert werden. Diese genaue Kontrolle der Vektorverteilung im Zielorganismus ist besonders in den Gonaden von größter Relevanz, da eingebrachte Fremd-DNA hier zu ungewollten Geninsertionen oder Keimbahnmutationen führen kann. Solche unerwünschten Nebenwirkungen

würden zu hohe Risiken der Methode darstellen und deren klinische Anwendbarkeit stark limitieren.

Es existieren verschiedene Studien zur Biodistribution von viralen und nicht-viralen Vektoren und deren Sicherheit [65, 67, 68] . Besonders bei der Applikation nackter DNA kann eine schnelle Degradation und Clearance der eingebrachten DNA beobachtet werden [69] . Andererseits werden gerade in Studien mit nackter DNA immer bessere Expressionslevel mittels der eingebrachten DNA erzielt. Somit gewinnt nackte DNA immer mehr an Bedeutung, wenn es um hohe Transfer- und Expressionseffizienz und geringe Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung geht [70] .

2. ZIELSTELLUNG

In der Therapie maligner Krebserkrankungen nimmt die Tumorgentherapie einen immer bedeutenderen Platz ein. Aufgrund noch immer bestehender Sicherheitsrisiken bezüglich des Nebenwirkungsspektrums von viralen Vektoren geraten nicht-virale Vektoren zunehmend in den Fokus aktueller Studien. Da außerdem Transfereffizienz und systemische Bioverteilung auch nicht-viraler Vektoren maßgeblich durch die jeweilige Transfertechnologie beeinflusst werden, spielen auch diese eine wichtige Rolle in der Evaluation und Etablierung neuer Gentherapiestrategien.

Ziel dieser Arbeit war die präklinische quantitative und qualitative Analyse der zeitabhängigen intratumoralen und systemischen Distribution eines neuartigen, TNF- α exprimierenden, minimalistisch immunologisch definierten Genexpressionsvektors (MIDGE-CMVhTNF) nach intratumoraler *in vivo* Jet-Injektion im Melanom-Xenotransplantatmodell.

Hierzu erfolgte zunächst der Nachweis von MIDGE-CMVhTNF Vektor-DNA mittels quantitativer real-time PCR im Tumorgewebe zur Bestimmung der Transfereffizienz des MIDGE Vektor Gentransfers mittels Jet-Injektion. In Korrelation zur Detektion der zeitabhängigen intratumoralen Vektorakkumulation, Verteilung und Clearance wurde auch die intratumorale Expression des Transgens auf mRNA-Ebene mittels real-time RT-PCR und auf Proteinebene mittels ELISA und Immunhistochemie analysiert.

Für die Analyse der systemischen Bioverteilung und Clearance der MIDGE-CMVhTNF Vektor-DNA wurden das Blutplasma und distante Organe (Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz, Hirn, Ovarien) mit der real-time PCR untersucht. Weiterhin wurde die mögliche TNF- α Expression der systemisch verteilten Vektor-DNA in den Organen mittels real-time RT-PCR quantitativ analysiert.

Zusammenfassend soll diese Arbeit wichtige präklinische Daten zur Kinetik der Bioverteilung und Clearance der Jet-injizierten Vektor-DNA im Tumorgewebe und systemisch sowie deren Korrelation zur Transgenexpression liefern. Damit sollen essentielle Aussagen zu Sicherheit und Effizienz dieses Gentherapie-Ansatzes für die spätere klinische Applikation ermöglicht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Puffer

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| BSA | Serva GmbH, Heidelberg, DE |
| Coomassie Brilliantblau G-250 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| DAB Substrat-Chromogen | Dako, Glostrup, DK |
| DNAse I | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| EDTA | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| FKS (Fetales Kalbsserum) | Biochrom, Berlin, DE |
| Glycergel | Dako, Glostrup, DK |
| Hämalaunlösung nach Mayer | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Hypnomidat | JanssenCilag, Neuss, DE |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Magnesiumchlorid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| PBS | PAA Laboratories, Cölbe, DE |
| RIPA Puffer | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| RPMI 1640 (+L-Glutamin) | PAA Laboratories, Cölbe, DE |
| Trizol Reagenz | Invitrogen, Karlsruhe, DE |
| Trypsin | PAA Laboratories, Cölbe, DE |
| Wasserstoffperoxid | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Wasser ultra pure | Invitrogen, Karlsruhe, DE |

3.1.2 Materialien für die Zellkultur

| | |
|--------------------------|--------------------------------|
| DMEM | PAA, Laboratories, Cölbe, DE |
| FKS (Fetales Kalbsserum) | Biochrom, Berlin, DE |
| RPMI 1640 (+L-Glutamin) | PAA Laboratories, Cölbe, DE |
| Zellkulturflaschen | PAA Laboratories, Cölbe, DE |
| Zellkulturplatten | BD Biosciences, Heidelberg, DE |

3.1.3 Tiermodell

| | |
|------------------------------------|----------------------|
| NMRI- <i>nu/nu</i> Mäuse, weiblich | EPO GmbH, Berlin, DE |
|------------------------------------|----------------------|

3.1.4 Materialien für Restriktionsverdau, PCR und RT-PCR

| | |
|--------------------------------|--|
| cDNA Reverse Transkription Kit | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| DNase I | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| dNTPs | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| h-G6PDH Housekeeping Gene Set | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| MgCl ₂ | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| PCR Enzymmix | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| PCR Puffer II | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| Primer und Sonden | TIB MOLBIOL, Berlin, DE |
| Random Hexamere | Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA |

| | |
|------------------------------|--|
| Reverse Transkriptase (MuLV) | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| RNAse Inhibitor | Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA |
| Restriktionsenzyme | Fermentas, St. Leon-Rot, DE |

3.1.5 Antikörper

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Anti-TNF α Antikörper | R & D Systems, Minneapolis, MN, USA |
| HRP konj. Anti-Ziege Antikörper | Abcam, Cambridge, UK |

3.1.6 Kits

| | |
|--|---------------------------------------|
| cDNA Reverse Transkription Kit | Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA |
| DNA-, RNA- und Protein Purifikation Kit | EurogentecRoboklon, Berlin, DE |
| LightCycler DNA Master HybProbe Kit (FITC und LCRed-640) | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| PeliKine Compact human TNF α ELISA Kit | Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, DE |
| Quick Blood DNA Purifikation Kit | EurogentecRoboklon, Berlin, DE |

3.1.7 Geräte

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Countess automated cell counter | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE |
| Infinite M200 Pro Plate Reader | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Jet Injektor | EMS, Nyon, Schweiz |

| | |
|---------------------------------------|---|
| Kryomikrotom Leica CM 1900 | Leica Microsystems GmbH, Nussloch, DE |
| Kühlzentrifuge 5804 R | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Lichtmikroskop AxioCam HRc | Zeiss, Göttingen, DE |
| LightCycler 480 | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| NanoDrop TM2000 | Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA |
| T3000 Thermocycler | Biometra GmbH, Göttingen, DE |
| Tischzentrifuge | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Ultra low Temperature Freezer (-80°C) | Sanyo Fisher Sales, München |

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die A 375 humanen Melanomzellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator gehalten. Die Zellen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) auf Identität überprüft. Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:4 – 1:10 gesplittet, hierfür in PBS gewaschen und trypsinisiert, um sie dann vollständig resuspendiert in neue Zellkulturflaschen auszusäen. Ein regelmäßiger Mykoplasmentest diente zur routinemäßigen Kontrolle der Zellkultur.

Für die Zellzählung wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 in einer 0,4%-igen Trypanblaulösung verdünnt. Hiervon wurden 10 µl für die Zählung mittels eines automatischen Zellzählers (Countess, Invitex, Berlin, Germany) eingesetzt. Diese Zellen wurden für die Etablierung der Xenotransplantat Tumoren subkutan auf NMRI-*nu/nu* Mäusen inokuliert.

3.2.2 Tiermodell mit Etablierung der Xenotransplantat Tumoren

Alle Experimente in Zusammenhang mit dem Mausmodell wurden in Kooperation mit der EPO GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die in der Studie verwendeten 30 weiblichen NMRI-*nu/nu* Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen in belüfteten Käfigen gehalten. Eine regelmäßige ausreichende Versorgung mit Futter und Wasser war zu jeder Zeit sichergestellt. In einem Alter von 6 Wochen wurden 1×10^7 humane A 375 Melanomzellen in 100 μ l PBS in den Bereich der linken Flanken der Tiere subkutan appliziert. Nach 4 Wochen hatten die soliden subkutanen Tumoren eine Größe von etwa 5 x 5 mm erreicht.

3.2.3 In Vivo Jet-Injektion

Für die Jet-Injektion wurden die Mäuse je Zeitpunkt der späteren Analysen in 3 Tiere pro Gruppe eingeteilt. Zur Vorbereitung der *in vivo* Jet-Injektion erfolgte die Anästhesie der NMRI-*nu/nu* Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 400 μ l Hypnomidat (2 mg/ml Etomidat, JanssenCilag, Neuss, Deutschland). Die anschließende Jet-Injektion (EMS Medical Systems SA, Nyon, Schweiz; Technik siehe Abb. 7) erfolgte intratumoral in die im Flankenbereich xenotransplantierten subkutanen Tumoren. Hierbei erhielt jedes Tier fünf Jet-Injektionen mit jeweils 10 μ l DNA-Lösung (1 μ g MIDGE CMVhTNF DNA / μ l PBS) mit einem Druck von 2,8 bar (siehe Abb. 8). Somit erhielt jedes Tier eine Gesamtdosis von 50 μ g MIDGE-CMVhTNF DNA.

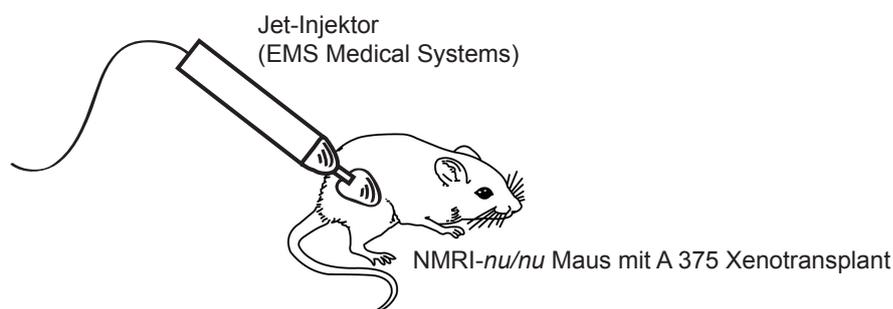


Abb. 7: Schematische Darstellung der *in vivo* Jet-Injektion. Jet-Injektion in NMRI-*nu/nu* Mäuse: Mittels des Jet-Injektors (EMS Medical Systems) werden mit 2,8 bar je 10 μ l DNA-Lösung (1 μ g MIDGE-CMVhTNF DNA / μ l PBS) an fünf Injektionsstellen des subkutanen xenotransplantierten A 375 Tumors appliziert.

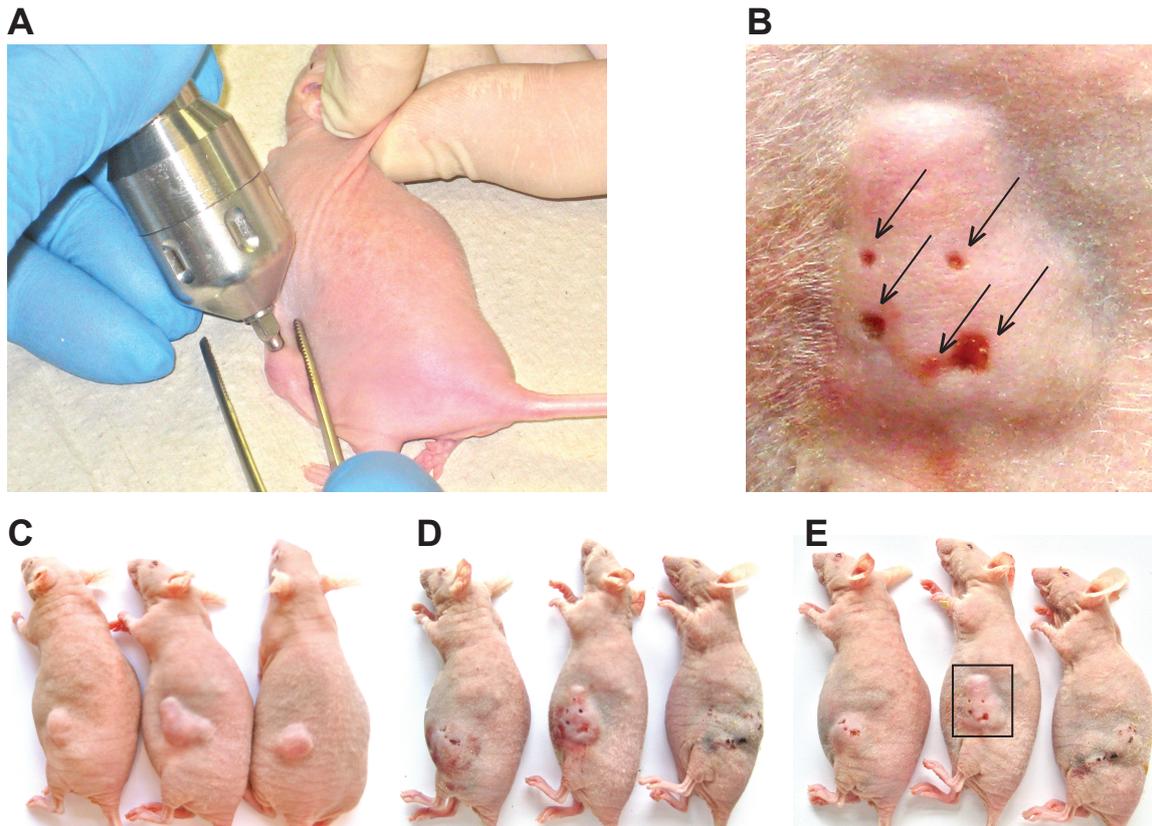


Abb. 8: NMRI-nu/nu Maus während und nach intratumoraler Jet-Injektion. (A) Mittels des Jet-Injektors wird MIDGE-CMVhTNF DNA direkt in das xenotransplantierte A 375 Melanom der anästhesierten Maus an fünf Stellen appliziert. (B) 48 Stunden nach Injektion sind die fünf Injektionsstellen (siehe Pfeile) noch sichtbar und frei von Rötung, Schwellung oder anderen potenziellen Entzündungszeichen. (C) NMRI-nu/nu Mäuse mit xenotransplantierten Melanomen im Flankenbereich. (D) Mäuse aus (C) 24 h nach Jet-Injektion. (E) Mäuse aus (C) 48 h nach Jet-Injektion.

Die Mäuse wurden in 10 Gruppen mit je 3 Tieren für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt unterteilt und für die zeitabhängige Analyse von Bioverteilung und Clearance 0, 5, 10, 30, 60 Minuten und 3, 6, 24 und 48 Stunden nach Jet-Injektion getötet. Tumoren wurden entfernt und zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Blutproben und Organe (Gehirn, Lunge, Herz, Niere, Leber, Milz und Ovarien) wurden entnommen und zur weiteren Analyse ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert. Eine Gruppe nicht Jet-injizierter Mäuse ($n=3$) diente als Kontrolle.

3.2.4 DNA Isolierung aus Tumor- und Organgeweben und Vollblut

Zur differenzierten zeitabhängigen Analyse der Bioverteilung und Clearance von MIDGE-CMVhTNF DNA in den Tumoren der Jet-injizierten Mäuse erfolgte zunächst die DNA Isolation aus den Tumoren der verschiedenen Zeitgruppen. Hierfür wurden Schnitte der schockgefrorenen Tumoren mit dem Kryomikrotom (Leica Microsystems CM 1900, Nussloch, Deutschland) in verschiedenen Schnittserien angefertigt: 20 (je nach Tumordurchmesser \pm 5) Schnitte á 12 μ m für die DNA- und RNA Isolierung (siehe Kap. 3.2.4 und 3.2.5), 60 Schnitte á 12 μ m für die Anfertigung von Tumorlysaten zur Durchführung des ELISA (siehe Kap. 3.2.9) und 3 Schnitte á 6 μ m zur Darstellung der TNF α positiven Areale im Tumorgewebe via Immunhistochemie (siehe Kap. 3.2.10).

Die DNA- und RNA-Isolierung erfolgte entsprechend der Vorschrift des Herstellers vom verwendeten DNA-, RNA- und Protein Purifikation Kit (EurogentecRoboklon, Berlin, Deutschland). Für die Isolierung der DNA wurden die mit dem Kryomikrotom gewonnenen Schnitte (12 μ m) mit Lysepuffer aufgenommen und in drei Waschschritten vom Überstand getrennt (siehe Tab. 5). Die so gewonnene reine DNA auf den DNA Bindungs-Zentrifugationssäulen (EurogentecRoboklon) wurde mit DNase freiem Wasser gebunden. Für spätere Analyse wurde die DNA bei -20°C unter Vermeidung von multiplem Wiederauftauen und Einfrieren aufbewahrt.

Tab. 5: DNA-Isolierung gemäß Vorschrift des Herstellers (Eurogentec Roboklon, Berlin, Deutschland).

| | | |
|------------------------------|-----|--|
| 1. Probenvorbereitung | 1.1 | Kryomikrotomschnitte homogenisieren (300 μ l Puffer DRP) |
| | 1.2 | Probe lysieren (200 μ l Lyse ALL) |
| | 1.3 | Probe zentrifugieren (3 min., 14.000 rpm) |
| 2. DNA Bindeschritt | 2.1 | Überstand auf DNA Bindungs-Zentrifugationssäule überführen |
| | 2.2 | Säule zentrifugieren (2 min., 14.000 rpm) |
| 3. DNA Waschung 1 | 3.1 | 400 μ l Puffer (Wash-RB1) auf DNA Bindungssäule geben |
| | 3.2 | Säule zentrifugieren (1 min., 12.000 rpm) |

- | | | |
|--------------------------|-----|---|
| 4. DNA Waschung 2 | 4.1 | Durchfluss verwerfen |
| | 4.2 | 650 µl Puffer (Wash-RBW) auf die Säule geben |
| | 4.3 | Säule zentrifugieren (1 min., 12.000 rpm) |
| 5. DNA Waschung 3 | 5.1 | Durchfluss verwerfen |
| | 5.2 | 350 µl Puffer (Wash-RBW) auf die Säule geben |
| | 5.3 | Säule zentrifugieren (2 min., 12.000 rpm) |
| 6. DNA Elution | 6.1 | 100 µl DNAse freies Wasser (80°C) auf Säulenmembran geben |
| | 6.2 | Säule inkubieren (RT, 2 min.) |
| | 6.3 | Säule zentrifugieren (2 min., 12.000 rpm) |
| | 6.4 | DNA bei -20°C lagern |

Für die DNA-Isolierung aus dem Vollblut wurden den Tieren jeweils 200 µl Blut entnommen (retroorbital). Nach Proteinverdau mit Proteinase K erfolgte die Bindung der DNA auf den Bindungs-Zentrifugationssäulen (EurogentecRoboklon) mit anschließendem Waschen und schließlich Elution der reinen DNA für die Polymerase Kettenreaktion (siehe Tab. 6).

Tab. 6: DNA-Isolierung aus Blutproben gemäß Vorschrift des Herstellers (Eurogentec Roboklon, Berlin, Deutschland).

- | | | |
|---|-----|--|
| 1. Vorbereiten der Extraktion | 1.1 | 40 µl Puffer (ActivationBuffer QB) auf Säule pipettieren |
| 2. Solubilisierung und Proteinase K Verdau | 2.1 | 200 µl Blut, 10 µl Proteinase K und 200 µl Puffer (SOL-QB) mischen |
| | 2.2 | Lysat inkubieren (10 min., 70°C) |
| 3. Optimierung der Bedingungen für die DNA Bindung | 3.1 | 200 µl Ethanol (96%) zufügen und vortexen (1 min.) |
| | 3.2 | Lysat zentrifugieren (1 min., 12.000 rpm) |

| | |
|-------------------------|--|
| 4. DNA-Bindung | 4.1 Lysat auf Säule pipettieren 4.2 Säule zentrifugieren (2 min., 12.000 rpm) |
| 5. DNA Waschen 1 | 5.1 Durchfluss verwerfen 5.2 500 µl Puffer (Wash-QBX1) auf die Säule geben 5.3 Säule zentrifugieren (1 min., 12.000 rpm) |
| 6. DNA Waschen 2 | 6.1 Durchfluss verwerfen 6.2 500 µl Puffer (Wash-QBX2) auf die Säule geben 6.3 Säule zentrifugieren (2 min., 12.000 rpm) |
| 7. DNA Elution | 7.1 100 µl Elutionspuffer (70°C) auf die Säule geben 7.2 Säule inkubieren (RT, 3 min.) 7.3 Säule zentrifugieren (1 min., 12.000 rpm) 7.4 DNA bei -20°C langfristig lagern |

3.2.5 RNA Isolierung aus Tumor- und Organgeweben

Der gewonnene Überstand aus der DNA-Isolierung (siehe Kap. 3.2.4) wurde mit Ethanol versetzt und auf RNA Bindungs-Zentrifugationssäulen gegeben (Eurogentec Roboklon). Nach drei Waschschrritten und einem direkten DNase-Verdau (DNase I, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) auf der Säule wurde die so gewonnene reine RNA mit RNase freiem Wasser von den Säulen gelöst und bei - 20°C eingefroren. Die RNA-Isolierung wurde nach diesem Prinzip für alle Mausorgane (Hirn, Lunge, Herz, Niere, Leber, Milz und Ovarien) durchgeführt.

3.2.6 DNA Restriktionsverdau

Für die optimale Detektion von MIDGE-CMVhTNF DNA in der real-time qPCR wurde ein Restriktionsverdau der DNA durchgeführt.

Restriktionsverdau-Ansatz (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland):

| | |
|------------|--|
| | 10 μ l DNA |
| | je 1 μ l Restriktionsenzym (FastDigest KpnI / EcoRI) |
| | 2 μ l 10x Puffer (FastDigest) |
| | <u>6 μl H₂O</u> |
| Endvolumen | 20 μ l |

Inkubation bei 37° für 60 min.

Nach Zentrifugation (10 min., 12.000 rpm) wurden die Proben 60 min. bei 37°C inkubiert, mit H₂O auf 100 μ l aufgefüllt und auf Eis gestellt. Die DNA Konzentration der einzelnen Proben wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert (Infinite M200 Pro, Tecan, Schweiz).

3.2.7 Real-time qPCR zur Vektor Quantifizierung

Die real-time qPCR ist ein modernes Verfahren zur exakten quantitativen Analyse von DNA. Bei der hier eingesetzten qPCR im LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics) binden zwei so genannte Hybprobes (FITC und LCRed-640, Roche Diagnostics) am amplifizierten DNA Fragment in der Annealingphase. Basierend auf einem strahlungslosen Energie Transfer (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer; FRET) wird durch die vom FITC emittierte Lichtenergie das LCRed-640 aktiviert und Licht mit einer Wellenlänge von 640 nm ausgesandt (siehe Abb. 9). Die so detektierte Menge an Fluoreszenzlicht ist direkt proportional zur Menge der Ziel-DNA und kann in jedem Zyklus neu erfasst werden.

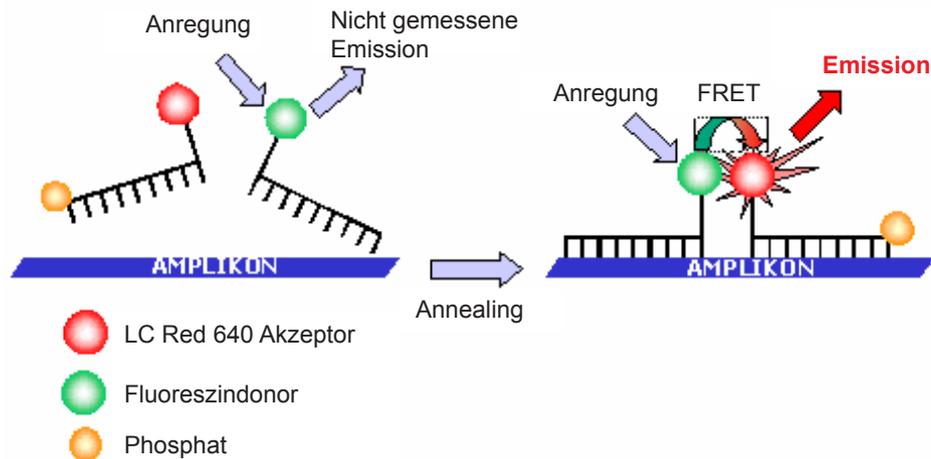


Abb. 9: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Prinzip des FRET (siehe Kap. 3.2.7) in der quantitativen real-time PCR (nach LightCycler Manual, Roche).

Für die genaue Quantifizierung der DNA wurde eine Spike Eichkurve als Standard etabliert und in jeder PCR Reaktion mitgeführt. Hierzu wurde eine serielle Verdünnung von der zu detektierenden MIDGE-CMVhTNF DNA angefertigt und als Standard genutzt. Die MIDGE DNA wurde in definierten Konzentrationen (0,02 fg, 0,02 pg , 2 pg, und 2 ng) zu jeweils 250 ng zellulärer DNA aus A 375 Zellen pipettiert (spiking). Vorangegangene Experimente im Mausmodell zeigten, dass bei einer Konzentration von 250 ng eingesetzter zellulärer DNA je qPCR eine reproduzierbare quantitative Detektierbarkeit gewährleistet werden kann. Somit betrug bei allen folgenden PCR Läufen die eingesetzte zelluläre DNA Menge 250 ng.

3.2.7.1 Real-time PCR Ansatz

| | |
|---------------------|--------------|
| H ₂ O | 4.6 µl |
| MgCl ₂ | 0.8 µl |
| Primer (forward) | 0.5 µl |
| Primer (reverse) | 0.5 µl |
| FITC HybProbe | 0.3 µl |
| LCRed-640 HybProbe | 0.3 µl |
| Hyb Master Enzymmix | 1 µl |
| DNA | 2 µl |
| <i>Endvolumen:</i> | <i>10 µl</i> |

3.2.7.2 PCR Programm

| | |
|-------------------|---|
| Denaturierung | 30s, 95°C |
| HybProbe Reaktion | 45 Zyklen á 10s, 95°C, 10s, 62°C, 10s, 72°C |
| Abkühlung | 10s, 40°C |

3.2.7.3 Primer und Sonden für MIDGE-CMVhTNF

| Primer | Sonden |
|---|--|
| Forward: 5'-CTCTGGCCCAGGCAGTCAGA-3' | Fluorescein-Isothiocynat (FITC): 5'-GCATTGGCCCGGCGGTTC-3'-FL |
| Reverse: 5'- TCGGCAAAGTCGAGATAGTC-3' | LC Red 640: LCRed640-5'- LC640- CCACTGGAGCTGCCCCTCAGCT-3'- PH |

3.2.8 Quantitative real-time RT-PCR Analyse der TNF α Expression

Die real-time qRT-PCR ist eine sensitive Methode für die quantitative Expressionsanalyse der Transkription von zu untersuchenden Genen. Basierend auf dem Prinzip der qRT-PCR können kleinste Mengen von RNA bis in den Femtogrammbereich sicher detektiert werden.

Zur Expressionsanalyse der TNF α mRNA in Tumoren und Organen wurde zunächst die zelluläre RNA mittels DNA-, RNA- und Protein Purifikation Kit (Eurogentec Roboklon) nach Vorschriften des Herstellers isoliert (siehe Kap. 3.2.5). Durch einen 10 minütigen DNA-Verdau (DNase I, Roche Diagnostics) auf der Säule wurde die Gewinnung reiner zellulärer RNA gewährleistet, die frei von jeglichen DNA-Kontaminationen ist. Dies ist wichtig, um mögliche Kontaminationen mit der Vektor-DNA zu vermeiden. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Infinite M200 Pro, Tecan).

Mittels eines High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) wurde die RNA in eine einzelsträngige DNA umgeschrieben (15 min. 42° C, 5 min. 99° C, 5 min. Abkühlung im Thermocycler T3000). Hierfür wurden 30 ng gesamt RNA pro Tumor und RT-Reaktion eingesetzt. Die anschließende quantitative real-time PCR wurde mit den LightCycler Hybprobes und dem LightCycler G6PDH House-Keeping Gene Set (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die hierfür verwendeten TNF α spezifischen Sonden und Primer sowie das PCR Programm sind in Kap. 3.2.7.1, 3.2.7.2 und 3.2.7.3 aufgeführt.

Die qRT-PCR Analyse erfasste parallel die Expression von TNF α und dem als Referenz eingesetzten „House-Keeping Gens“ Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH). Somit konnte anhand einer Standardkurve die relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgen. Von jeder TNF α spezifischen Konzentration im Duplikat wurde der entsprechende Mittelwert auf den dazugehörigen G6PDH-Wert normalisiert und auf die festgelegte interne Standardprobe (siehe spiked Eichkurve in Kap. 3.2.7) kalibriert.

3.2.9 ELISA zur Detektion von TNF α Protein im Tumorgewebe

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein Nachweisverfahren, das zur Detektion und Quantifizierung von spezifischen Proteinen genutzt wird. Der hier verwendete PeliKine Compact human TNF α ELISA Kit (Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg) basiert auf der Funktionsweise eines Sandwich ELISA: Der an eine Mikrotiterplatte gebundene monoklonale anti-TNF α Antikörper bindet humanes TNF α . Ein biotinylierter zweiter monoklonaler TNF α Antikörper wird zwecks weiterer Bindung (Sandwich) hinzugegeben – an die biotinylierte Seite des Sandwich kann nun ein mit HRP (Horseradish Peroxidase) konjugiertes Streptavidin binden. Eine Substratlösung (z.B. Diaminobenzidin, in diesem Fall das stabilere und weniger giftige Tetramethylbenzidin) bewirkt einen Farbumschlag in direkter Proportion zur Menge an TNF α , der anschließend per Photometer gemessen werden kann (Prinzip siehe Abb. 10).

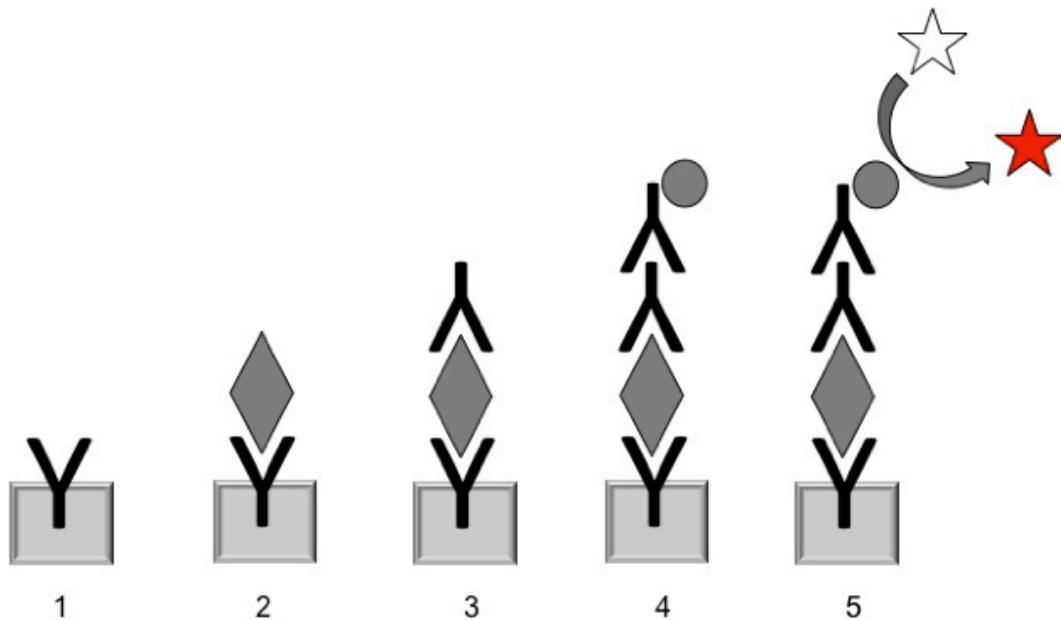


Abb. 10: Schematische Darstellung des Sandwich ELISA. (1) An eine Mikrotiterplatte gebundener monoklonaler anti-TNF α Antikörper. (2) Humanes TNF α der Tumorgewebsproben bindet an den Antikörper. (3) Biotinylierter monoklonaler anti-TNF α Antikörper bindet an TNF α . (4) Zugabe und Komplexbildung des enzyme-linked Antikörpers (HRP und konjugiertes Streptavidin, siehe Kap. 3.2.9). (5) Zugabe der Substratlösung mit Umsetzung zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt zur anschließenden photometrischen Quantifizierung.

Für die Gesamtproteinbestimmung in den einzelnen Tumoren wurden pro Gewebeprobe 60 Schnitte (\hat{a} 12 μ m) mit dem Kryomikrotom (Leica Microsystems CM 1900) angefertigt. Es erfolgte eine 30 minütige Lyse mit RIPA Puffer (Roche Diagnostics) mit anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm (4°C). Zur Quantifizierung von Protein im so gewonnenen Lysat erfolgte ein Bradford-Test. Das dabei verwendete Coomassie Brilliantblau G-250 (#1856210, Thermo Scientific, Waltham, MA) bindet hierbei unspezifisch an die basischen Gruppen der Aminosäuren in Proteinen. Im Vergleich mit einer Standardkurve (etabliert durch eine Verdünnungsreihe von BSA mit 1000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1, 1,4 und 0 mg Protein / ml) konnte so photometrisch bei 595 nm die Gesamtproteinkonzentration der Proben (mg Protein / ml) erfasst werden (Infinite M200 Pro, Tecan).

Anschließend wurden die Proben im PeliKine Compact human TNF α ELISA Kit (Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg) laut Vorschrift des Herstellers (Funktionsweise siehe

Abb. 10) bezüglich ihres TNF α Gehaltes quantifiziert. Ein interner Standard wurde mit Verdünnungen von humanem TNF α mit 1000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1, 1,4 und 0 pg / ml Puffer (working-strength dilution buffer) mitgeführt. Alle Proben wurden im Duplikat mit einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt. Die Mittelwerte der TNF α Konzentrationen wurden auf die Gesamtproteinmenge des Lysates normalisiert und konnten somit als pg TNF α pro mg Protein angegeben werden.

3.2.10 Immunhistochemischer Nachweis von TNF α in Tumorschnitten

Ein immunhistochemischer Nachweis dient der Lokalisation von Proteinen in Geweben. Er basiert auf einer Antigen-Antikörper Reaktion. Hierbei kommt es zu einer spezifischen und hoch affinen Bindung zwischen Primärantikörper und dem zu lokalisierenden Epitop. Bei der in dieser Arbeit angewendeten indirekten Immunhistochemie bindet anschließend ein sekundärer Antikörper gekoppelt mit HRP am Primärantikörper. Die Färbung mit einer Diaminobenzidin Lösung führt dann zu einem braunen Farbumschlag. Zur besseren Visualisierung der Gewebestruktur werden die Präparate mit einer Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt, sodass eine Differenzierung zwischen Zellkernen und Zytoplasma möglich ist.

Für die immunhistochemische Färbung wurden zunächst 6 μ m Gewebeschnitte mit dem Kryomikrotom (Leica Microsystems CM 1900) angefertigt. Um eine hydrophobe Schranke um das Präparat auf dem Objektträger zu bilden wurden die Schnitte mit einem Dako Pen (#S200230-2, Dako, Glostrup) umrandet und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und 5 min. in PBS gewaschen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Aktivität endogener Gewebesperoxidasen zu vermeiden, wurden diese für 20 min. mit 1%-igem H₂O₂ blockiert. Es erfolgte eine Permeabilisierung (0,5 ml Triton X-100, 2,5 g BSA, 99,5 ml PBS) für 10 min. und anschließende Blockierung in PBS mit 1,5 g BSA und 3,5 g Casein. Der primäre TNF α Antikörper (1:2 in TBST; #AF210-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN) wurde über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Es folgte dreimal 10 minütiges Waschen mit PBS und TBST. Anschließend wurde der sekundäre anti-goat-HRP Antikörper (1:100 in TBST; #ab7132, Abcam, Cambridge, UK) für 60 min. inkubiert, mit TBST gewaschen und erneut dreimal 10 min. in TBST inkubiert. Es folgten Färbung mit DAB-Lösung (#K3467, Dako, Glostrup, Denmark) für 5 min. und Waschen mit destilliertem Wasser. Um später die Zellkerne im

Präparat darstellen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (#T865.1, Carl Roth, Karlsruhe) gegengefärbt (2 min. Färbung, 5 min. unter Leitungswasser). Die Schnitte wurden mit Glycergel (#Co563, Dako) als Eindeckmedium auf dem Objektträger fixiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte per Lichtmikroskop (AxioCamHRc, Zeiss, Oberkochen).

3.2.11 Statistische Verfahren

Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPadPrism Version 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) durchgeführt. Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Es erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni. Die Signifikanz ist bei allen Experimenten durch einen P-Wert von $p < 0,05$ definiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Analyse zur Optimierung der Vektor Recovery

Die optimale DNA Recovery ist ausschlaggebend für die Genauigkeit aller folgenden Untersuchungen zur Vektorquantifizierung in gentransfizierten Geweben. Hierfür ist die richtige Auswahl des entsprechenden Kits zur DNA Isolation entscheidend.

Um die größtmögliche DNA Recovery gewährleisten zu können, wurden im Vorfeld der DNA Präparationen aus den dann Jet-injizierten Geweben zunächst Recovery-Analysen mit einem Luziferase-Reporter gen tragenden Plasmid durchgeführt. Mit definierten Mengen von 2,0, 0,2 und 0,02 ng Plasmid DNA / μl wurde eine quantitative real-time qPCR im Duplikat (Ansatz und Programm siehe Kapitel 3.2.7) durchgeführt. Die gewonnenen Werte dienten ohne Hinzunahme eines Isolationskits mit einer Recovery von 100% als Standard zum Vergleich.

Zur Beurteilung der vier verschiedenen Isolierungs-Kits zur DNA Recovery diente in der Analyse aus 1×10^7 A 375 humanen Melanomzellen isolierte genomische DNA, die jeweils zusammen mit 2, 0,2 und 0,02 ng Plasmid DNA / μl in die qPCR eingesetzt wurde (Spiking der DNA).

Die Ergebnisse (siehe Abb. 11) zeigten je nach genutztem Isolations-Kit (Nucleo Spin Tissue XS, Nucleo Spin Tissue, Invisorb Spin Plasmid Mini Two und GeneMatrix Universal DNA / RNA / Protein Purification Kit) unterschiedlichste Recoverywerte, die zwischen 3,84% und 100% schwankten.

Ausgehend von den Ergebnissen wurde der GeneMatrix Universal DNA, RNA und Protein Purifikations Kit (Eurogentec/Roboklon) für alle weiteren Experimente verwendet. Er zeigte eine Recovery zwischen 66% und 100% für die verschiedenen Mengen eingesetzter DNA.

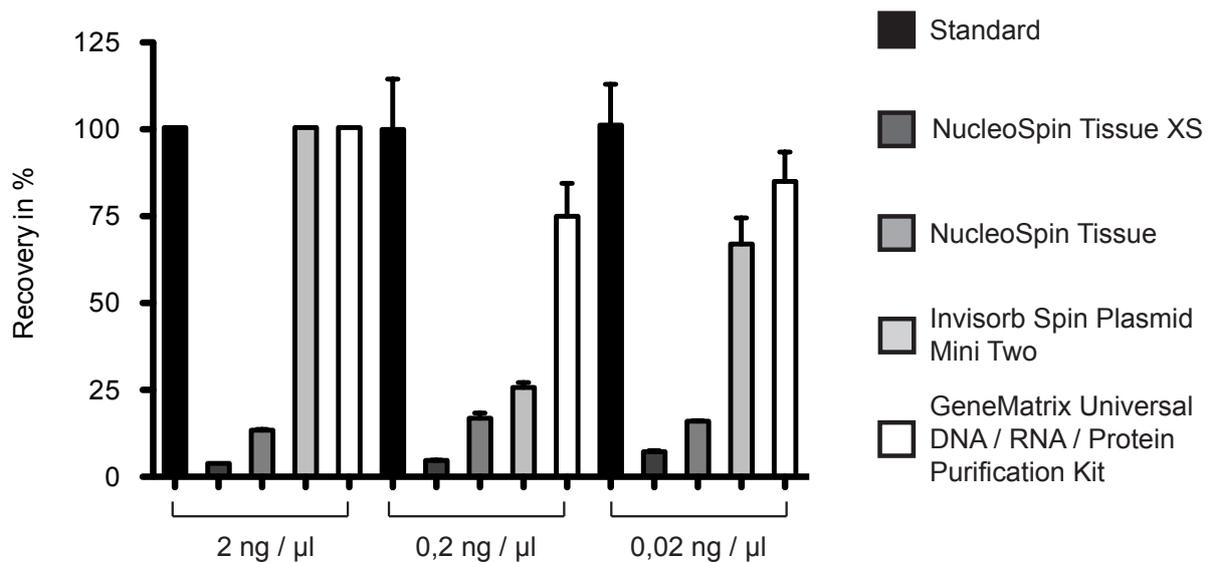


Abb. 11: Analyse der Vektor Recovery unter Verwendung vier verschiedener DNA Isolationskits. Die Recovery ist in % der Kontrolle bei Einsatz von gespikter 2,0, 0,2 und 0,02 ng Plasmid DNA / µl in der qPCR angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren SEM.

4.2 Analyse der *in vivo* MIDGE Vektorverteilung Jet-injizierter MIDGE DNA

Um die exakte zeitabhängige Bioverteilung des MIDGE Vektors nach Jet-Injektion in Tumor, Blut und Organen zu analysieren wurde ein quantitativer DNA Nachweis mittels einer quantitativen real-time PCR durchgeführt (siehe Kap. 3.2.7). Mit dieser konnte die zeitabhängige Akkumulation und Clearance im Tumor als auch die systemische Verteilung und Clearance in den distanten Organen bestimmt werden.

4.2.1 Quantitativer Nachweis von MIDGE Vektor-DNA im Tumorgewebe

Die zeitabhängige Verteilung des MIDGE Vektors im Tumorgewebe nach Jet-Injektion wurde mittels real-time qPCR analysiert. Je Zeitpunkt wurden n=3 Tiere für die Analysen verwendet. Eine Gruppe NMRI-*nu/nu* Mäuse (n=3), die keiner Jet-Injektion unterzogen wurde, diente als Kontrollgruppe.

Abbildung 12 zeigt den Nachweis von MIDGE Vektor-DNA im Tumor zu den Zeitpunkten 0 min., 5 min., 10 min., 30 min., 60 min., 3 h, 6 h, 24 h und 48 h.

In vorangegangenen Experimenten zur Bioverteilung von Plasmiden nach Jet-Injektion konnte gezeigt werden, dass bei Einsatz einer Menge von 250 ng Gewebe-DNA in

die qPCR eine korrekte und reproduzierbare quantitative Detektierbarkeit der Vektor-DNA gewährleistet werden kann [71] . Somit wird auch hier die Menge der MIDGE DNA in Relation zu 250 ng Tumor DNA angegeben.

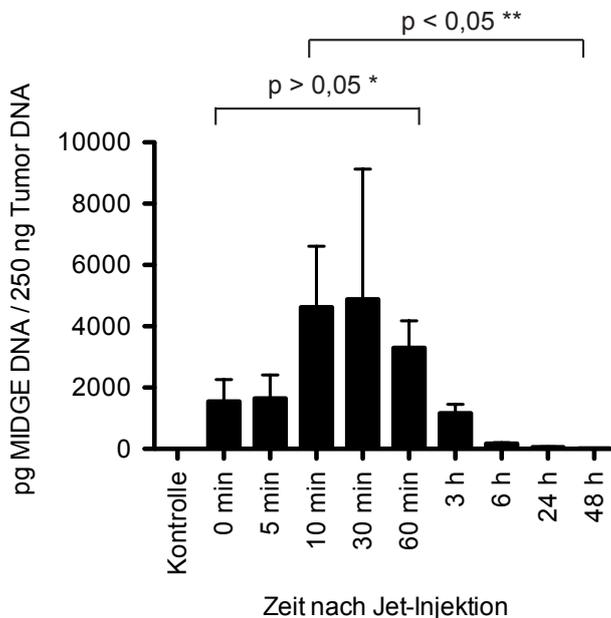


Abb. 12: Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen in den Tumorgeweben (Vektor-DNA in pg / 250 ng Tumor DNA). Intratumorale MIDGE-CMVhTNF Distribution nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE. Der * p-Wert (>0,05) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 0 bis 60 min.. Der ** p-Wert (<0,05) zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 3 und 6 h.

Es zeigt sich eine schnelle Akkumulation der MIDGE DNA nach *in vivo* Jet-Injektion in das zu untersuchende Tumorgewebe. Ein Peak der Vektor-DNA Werte ist zwischen 0 und 60 min. nach Jet-Injektion zu erkennen: Hier ergeben sich Höchstwerte der detektierten MIDGE Vektor-DNA von 8174 pg (10 min.), 13370 pg (30 min.) und 4508 pg (60 min.) pro 250 ng Tumor DNA. Ab dem Zeitpunkt 6 h nach Jet-Injektion reduziert sich die Menge MIDGE DNA drastisch auf einen Höchstwert von nur noch 223 pg / 250 ng Tumor DNA. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der MIDGE DNA vom Zeitpunkt 3 h zu 6 h (p<0,05).

Insgesamt sieht man eine Reduktion um 86% verglichen mit dem Ausgangswert direkt nach der Jet-Injektion zu Zeitpunkt 0 min..

Die später gemessenen Werte der Vektor-DNA 24 h und 48 h nach Jet-Injektion von 69 und 19 pg / 250 ng Tumor DNA sind im Vergleich sehr gering und sprechen für eine rasch beginnende Clearance des applizierten Vektors aus dem Tumorgewebe innerhalb von 48 h, die von der systemischen Vektorverteilung gefolgt wird.

Um eine differenziertere Untersuchung von der Verteilung der MIDGE Vektor-DNA in einzelnen Tumoren durchführen zu können, wurden die Tumoren zweier Tiergruppen genauer analysiert. Hierzu dienten die Gruppen, die jeweils 5 min. und 30 min. nach Jet-Injektion für die Analysen getötet wurden. In jeweils 10 einzelnen Fraktionen der Tumoren wurde mittels qPCR der Gehalt von MIDGE Vektor-DNA detektiert (siehe Abb. 13 und 14). Diese Fraktionen repräsentieren einen analytischen Querschnitt der Vektorverteilung über den Jet-injizierten Tumor.

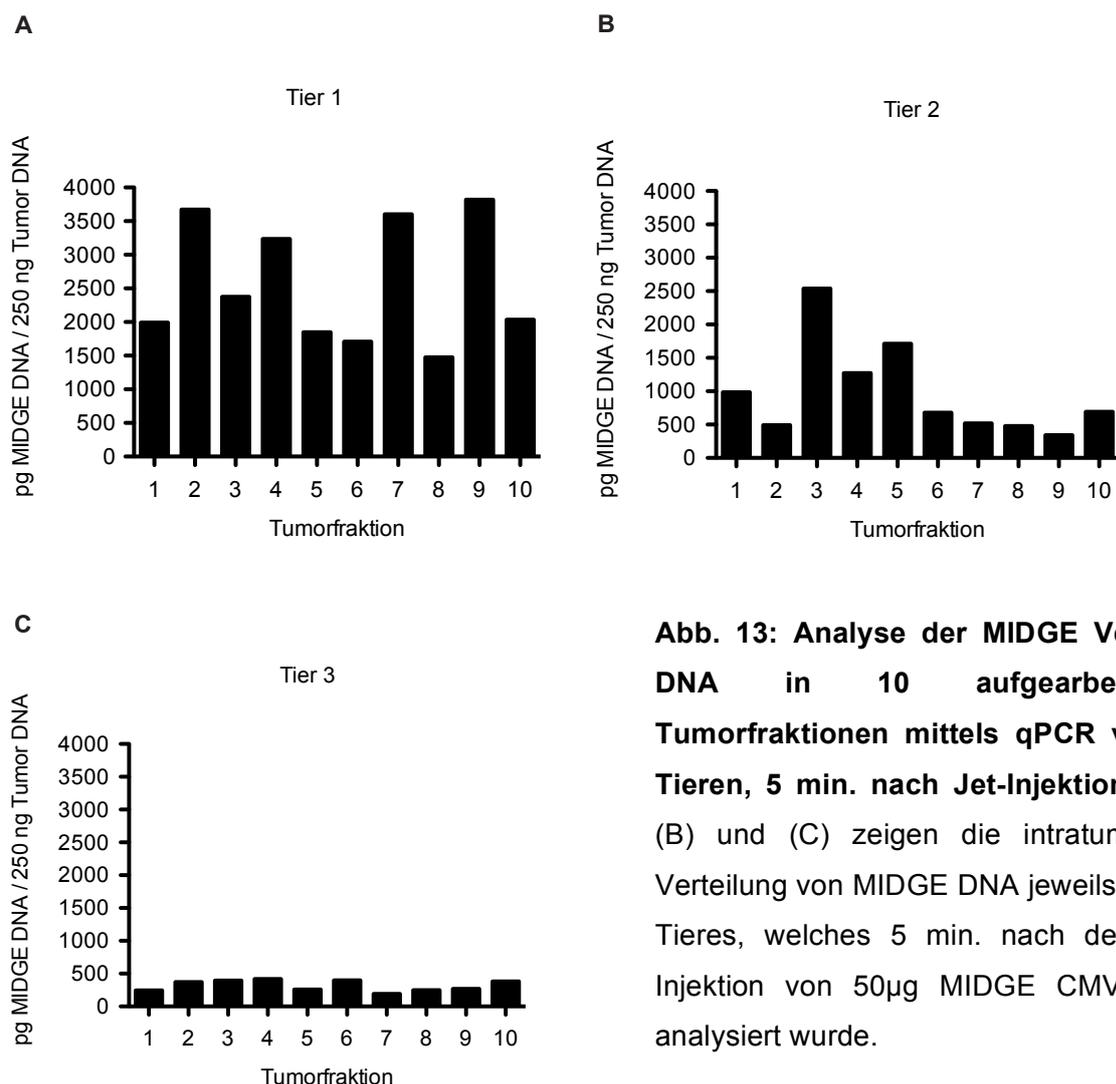


Abb. 13: Analyse der MIDGE Vektor-DNA in 10 aufgearbeiteten Tumorfraktionen mittels qPCR von 3 Tieren, 5 min. nach Jet-Injektion. (A), (B) und (C) zeigen die intratumorale Verteilung von MIDGE DNA jeweils eines Tieres, welches 5 min. nach der Jet-Injektion von 50µg MIDGE CMVhTNF analysiert wurde.

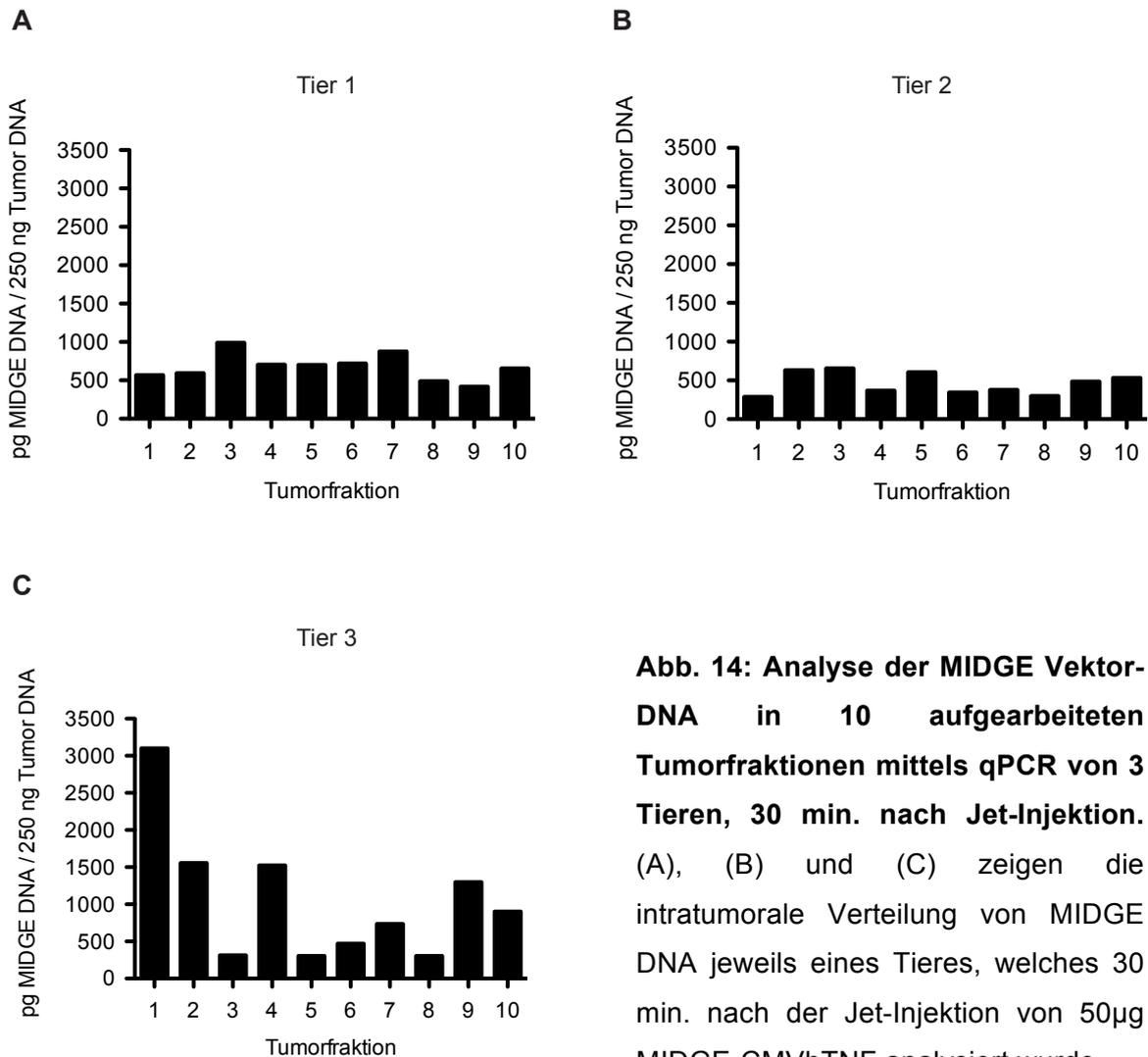


Abb. 14: Analyse der MIDGE Vektor-DNA in 10 aufgearbeiteten Tumorfraktionen mittels qPCR von 3 Tieren, 30 min. nach Jet-Injektion. (A), (B) und (C) zeigen die intratumorale Verteilung von MIDGE DNA jeweils eines Tieres, welches 30 min. nach der Jet-Injektion von 50µg MIDGE-CMVhTNF analysiert wurde.

Die analysierten Fraktionen zeigen eine sehr heterogene aber weite Verteilung der MIDGE DNA in den einzelnen Tumoren. Die Menge der detektierten DNA schwankt darüber hinaus erheblich im Vergleich der einzelnen Tiere (siehe Tab. 7). Daher ergeben sich nach Jet-Injektion sowohl intratumoral als auch interindividuell sehr heterogene Verteilungen der MIDGE Vektor-DNA.

Tab. 7: Minimale und maximale Werte detektierter MIDGE DNA in Tumorfractionen der analysierten Tiere 5 min. und 30 min. nach Jet-Injektion.

| 5 min. nach Jet-Injektion | Minimum MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Tumor DNA | Maximum MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Tumor DNA |
|----------------------------------|--|--|
| Tier 1 | 1475 | 3818 |
| Tier 2 | 343 | 1711 |
| Tier 3 | 192 | 418 |

| 30 min. nach Jet-Injektion | Minimum MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Tumor DNA | Maximum MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Tumor DNA |
|-----------------------------------|--|--|
| Tier 1 | 419 | 989 |
| Tier 2 | 286 | 655 |
| Tier 3 | 305 | 3102 |

Diese Heterogenität der detektierten Werte ist sowohl durch die Eigenschaft der Jet-Injektion als auch durch die Heterogenität der Beschaffenheit der Tumoren selbst zu erklären (siehe Kap. 5). Diese Faktoren bewirken eine inhomogene Verteilung der MIDGE Vektor-DNA. Es zeigen sich sowohl Areale mit bis zu 3818 pg MIDGE DNA / 250 ng Tumor DNA, als auch Areale mit nur 192 pg MIDGE DNA / 250 ng Tumor DNA (siehe Tab. 7). Generell jedoch konnte in allen Tumorgeweben die Vektor-DNA gut und reproduzierbar detektiert werden, was für die effektive Applikation der nackten Vektor-DNA mittels *in vivo* Jet-Injektion spricht.

4.2.2 Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma

Bei Studien zur Applikation neuer Vektoren und Gentransfertechnologien in der Gentherapie ist die Biodistribution des eingebrachten Genkonstrukts von besonderem Interesse. Sie ist ein entscheidender Parameter auch für die mögliche

Zulassung einer neuartigen Therapiestrategie zur klinischen Anwendung. Können Genkonstrukt und Gentransfertechnologie nicht die nötige Biosicherheit aufweisen, sind diese nicht klinisch anwendbar. Daher wurde die Menge an MIDGE Vektor-DNA mittels quantitativer real-time PCR zeitabhängig sowohl im Blutplasma als auch in ausgewählten distanten Organen analysiert (siehe Kap. 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3). Abbildung 15 zeigt die Verteilung von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma der untersuchenden Tiere zu den Zeitpunkten 0 min., 5 min., 10 min., 30 min., 60 min., 3 h, 6 h, 24 h und 48 h.

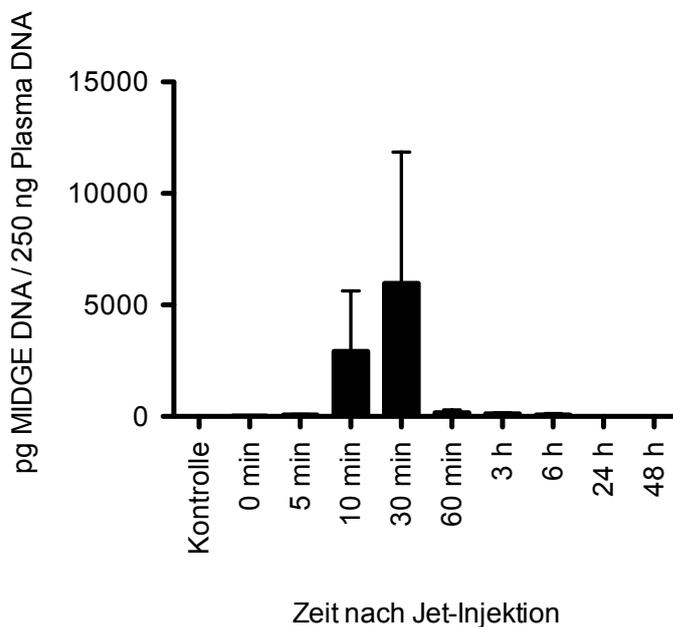


Abb. 15: Analyse der MIDGE Vektor-DNA Bioverteilung pro 250 ng Blutplasma DNA zu den Zeitpunkten 0 min., 5 min., 10 min., 30 min., 60 min., 3 h, 6 h, 24 h und 48 h nach intratumoraler *in vivo* Jet-Injektion. Die Analyse fasst alle Werte der Tiere (n=3) zu den jeweiligen Zeitpunkten zusammen. Fehlerbalken repräsentieren SE.

Bei Untersuchung des Blutplasmas der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Jet-Injektion zeigen sich Höchstwerte der MIDGE Vektor-DNA nach 10 und 30 min. mit 8360 pg (10 min.) und 17756 pg (30 min.). Die Analysen zeigen auch für die Bioverteilung der Vektor-DNA im Blut eine sehr große Heterogenität. Tabelle 8 zeigt die einzelnen Werte der drei Tiere 10 und 30 min. nach Jet-Injektion, die diese Beobachtung belegen.

Tab. 8: MIDGE DNA in pg pro 250 ng Blutplasma DNA zu den Zeitpunkten 10 und 30 min..

| Tier | 10 min. nach Jet-Injektion MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Blutplasma-DNA | 30 min. nach Jet-Injektion MIDGE Vektor-DNA in pg / 250 ng Blutplasma-DNA |
|-------------|--|--|
| 1 | 8360 | 17.756 |
| 2 | 85 | 5 |
| 3 | 293 | 137 |

Insgesamt ist schon 60 min. nach Jet-Injektion ein deutlicher Abfall der MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma aller analysierten Tiere zu erkennen. Der DNA Gehalt beträgt hier nur noch zwischen 7 und 196 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Blutplasma DNA. Nach 48 h ist die Clearance mit DNA Werten zwischen 0 und 19 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Blutplasma DNA im Wesentlichen abgeschlossen.

4.2.3 Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA in Organen

Um die Menge von MIDGE Vektor-DNA in den distanten Organen zu bestimmen, führten wir eine quantitative real-time PCR für folgende Organe durch: Ovarien, Leber, Hirn, Herz, Lunge, Milz und Niere.

Die folgenden Abbildungen 16 bis 20 zeigen die Bioverteilung von MIDGE Vektor-DNA in den einzelnen Organen. In allen Organen beträgt der Gehalt an MIDGE Vektor-DNA zu keiner Zeit über 100 pg / 250 ng Gewebe DNA. Zum Vergleich unterschreiten im Tumor die MIDGE DNA Werte erst zum Zeitpunkt 24 h nach Jet-Injektion 100 pg - das heißt diese Vektormengen unterscheiden sich in Organ- und Tumorgewebe um Größenordnungen.

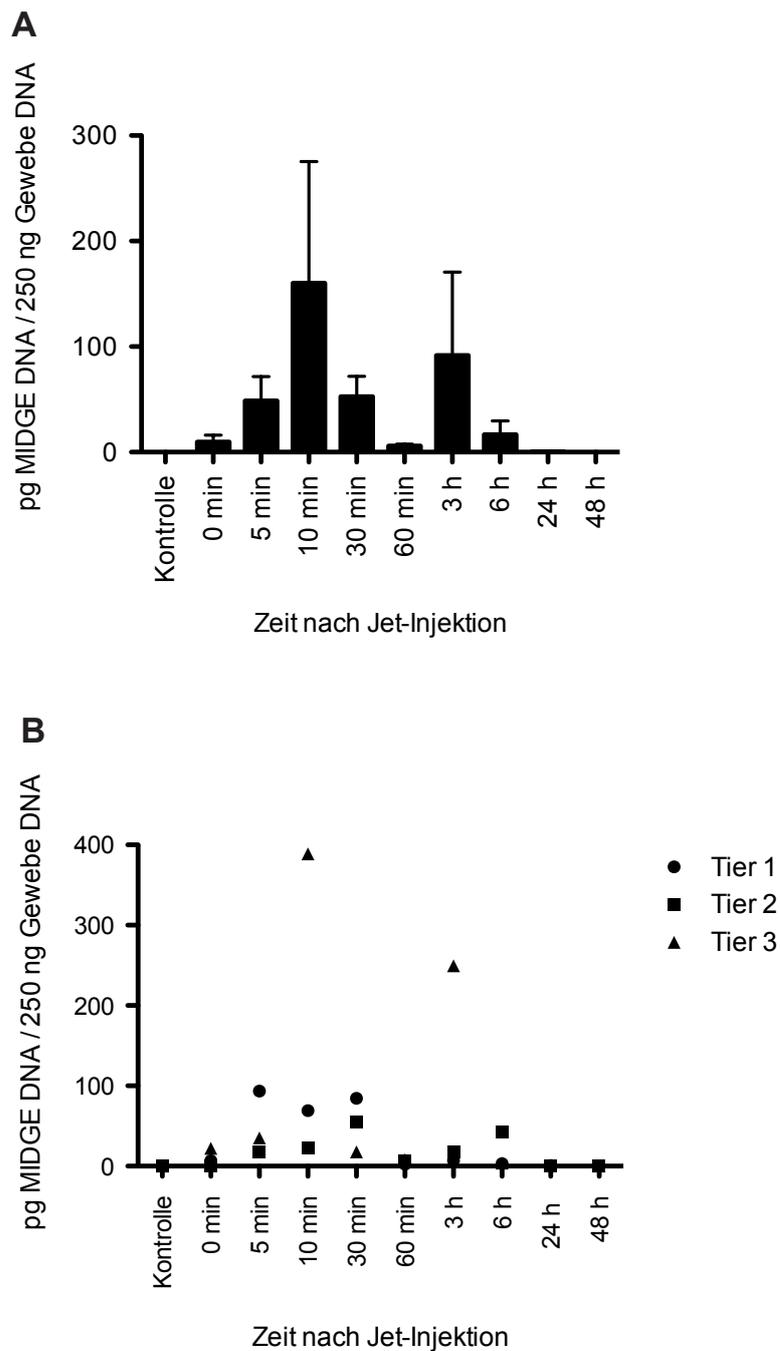


Abb. 16: (A) Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen im Ovargewebe (Vektor-DNA in pg / 250 ng Ovargewebe DNA). MIDGE-CMVhTNF Distribution im Ovar nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE. (B) Differenzierte Darstellung der einzelnen MIDGE-CMVhTNF Werte pro 250 ng Ovargewebe DNA der jeweils n=3 Tiere pro Zeitpunkt nach Jet-Injektion.

Insgesamt bleibt der Wert der MIDGE Vektor-DNA in den Ovarien zu allen Zeitpunkten bis auf zwei Ausnahmen (10 min. Tier 3 und 3 h Tier 3; siehe Abb. 16 B)

unter 100 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA. Zwischen 5 und 30 min. nach Jet-Injektion zeigen sich die im Vergleich höchsten Werte zwischen 17 und 84 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA (ausgenommen Tier 3 bei 10 min.). Diese Werte sinken zum Zeitpunkt 60 min. nach Gentransfer bereits auf 0 bis maximal 43 pg MIDGE DNA. In den Ovarien ist nach 24 h mit Höchstwerten von nur 0,7 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA die Clearance abgeschlossen.

Die in der Leber detektierten Werte von MIDGE Vektor-DNA betragen insgesamt über alle Zeiträume in den analysierten Tieren durchweg unter 50 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA. Abbildung 17 zeigt, dass in der Leber die Clearance der MIDGE Vektor-DNA bereits zum Zeitpunkt 3 h nach Gentransfer weitestgehend abgeschlossen ist. Alle nach dem Zeitpunkt 3 h nach Jet-Injektion gemessenen Werte betragen unter 5 pg bzw. 0 pg (24 h) MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA.

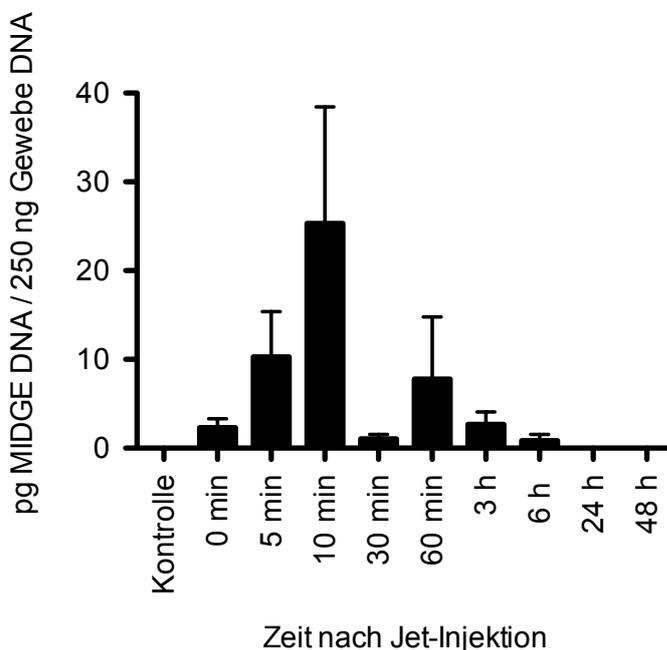


Abb. 17: Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen im Lebergewebe (Vektor-DNA in pg / 250 ng Lebergewebe DNA). MIDGE-CMVhTNF Distribution in der Leber nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE.

Die Analyse des Hirngewebes zeigt, dass hier die Maximalwerte 22 pg MIDGE DNA pro 250 ng Gewebe DNA zu keinem Zeitpunkt überschreiten (siehe Abb. 18). Der scheinbare Peak der Werte zum Zeitpunkt 10 min. nach Jet-Injektion ist durch den einzelnen Maximalwert mit 22 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA (Tier 3) zu erklären.

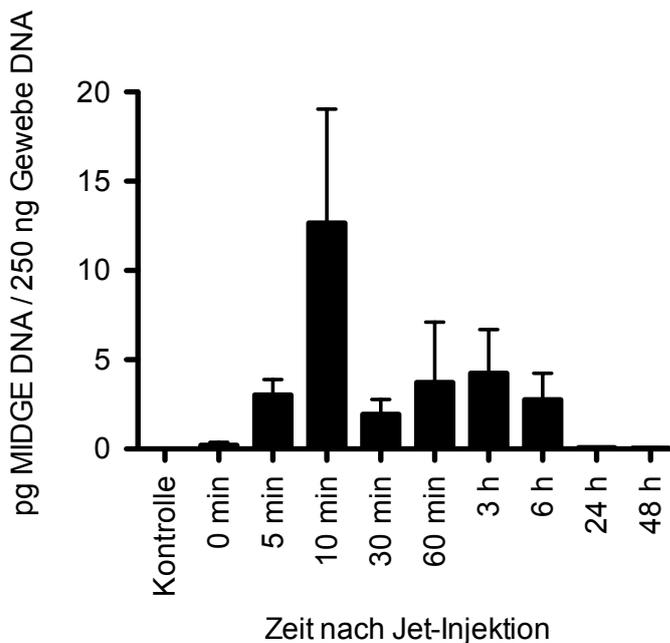


Abb. 18: Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen im Gehirngewebe (Vektor-DNA in pg / 250 ng Gehirngewebe DNA). MIDGE-CMVhTNF Distribution im Gehirn nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE.

Die Clearance im Hirngewebe ist zum Zeitpunkt 6 h nach Gentransfer bereits im Wesentlichen abgeschlossen. Alle Werte der späteren Zeitpunkte nach Jet-Injektion betragen 0 bis maximal 5 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA.

Im analysierten Herzgewebe betragen die detektierten MIDGE Vektor-DNA Werte zu allen Zeiten zwischen 0 und höchstens 7 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA (siehe Abb. 19). Ein einzelner höherer Wert von 24 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA 3 h nach Jet-Injektion (Tier 2) stellt eine Ausnahme dar. Die

Clearance ist nach 24 h mit Werten von ausschließlich 0 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA vollständig abgeschlossen.

Auch im Lungengewebe fällt nur ein einzelner erhöhter Wert von 19 pg MIDGE DNA zum Zeitpunkt 60 min. nach Jet-Injektion bei Tier 3 auf (siehe Abb. 19). Zu keinem anderen Zeitpunkt überschreitet die MIDGE Vektor-DNA Menge im Lungengewebe den Wert 11 pg MIDGE DNA / 250 ng Gewebe DNA. In der Lunge ist die Clearance nach 6 h mit Werten von 0 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA abgeschlossen.

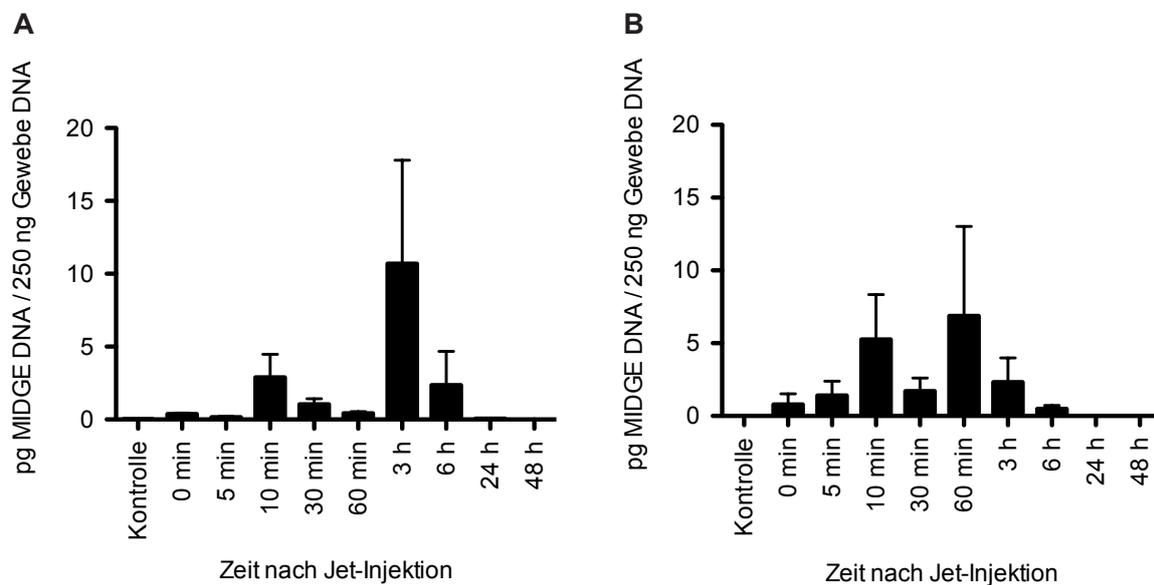


Abb. 19: Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen im Herz- und Lungengewebe (Vektor-DNA in pg / 250 ng Gewebe DNA). MIDGE-CMVhTNF Distribution in (A) Herz und (B) Lunge nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE.

In Milz und Niere ist mittels der qPCR keine MIDGE Vektor-DNA nachweisbar gewesen (siehe Abb. 20). Ein Höchstwert von 1,7 pg MIDGE Vektor-DNA / 250 ng Gewebe DNA (10 min., Tier 1) in der Milz überschreitet als einziger Wert 1 pg. Alle anderen Werte liegen ausnahmslos im Bereich von 0 pg.

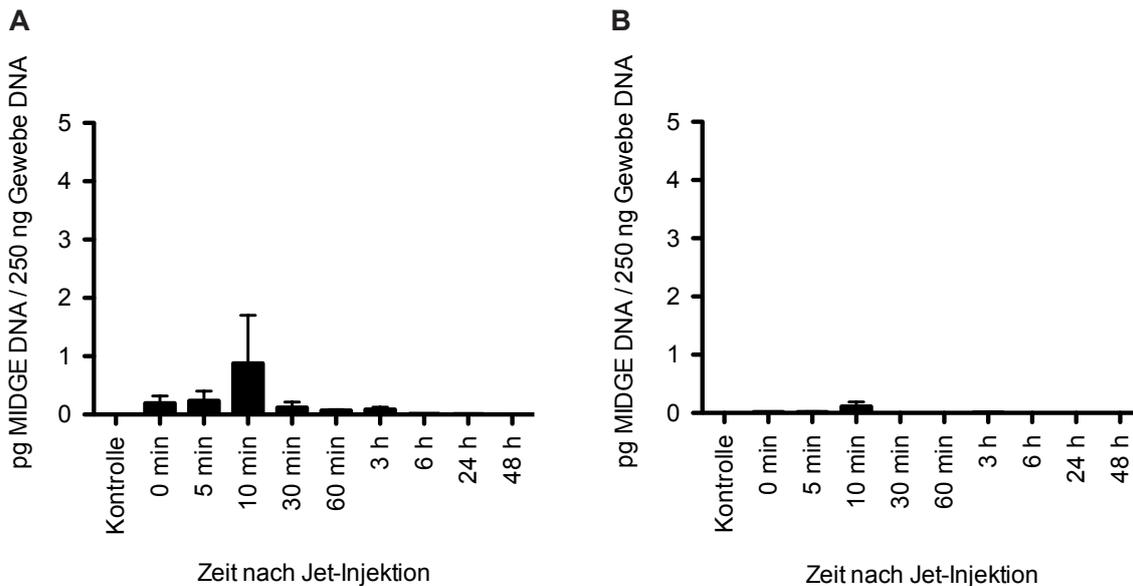


Abb. 20: Darstellung der MIDGE Vektor-DNA Verteilungen im Milz- und Nierengewebe (Vektor-DNA in pg / 250 ng Gewebe DNA). MIDGE-CMVhTNF Distribution in (A) Milz und (B) Niere nach *in vivo* Jet-Injektion von 50 µg DNA zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE.

4.3 Analyse der TNF α Expression

Zur Expressionsanalyse von TNF α im Tumorgewebe wurde eine quantitative real-time RT-PCR durchgeführt (siehe Kap. 3.2.8). Als so genanntes „House-Keeping“ Gen wurde Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) eingesetzt, welche ein konstantes Expressionsmuster in humanen Zellen und auch in Tumorgeweben aufweist. Die in der qRT-PCR ermittelten Werte der TNF α mRNA-Expression wurden in Relation zur G6PDH errechnet und sind in Abb. 21 dargestellt.

Um sicher zu gehen, dass zu keinem Zeitpunkt eine Expression von TNF α in distanten Organen stattfindet, wurden darüber hinaus auch Ovar und Leber mittels qRT-PCR analysiert, da diese Organe bei der Analyse der MIDGE DNA Bioverteilung (siehe Kap. 4.2.3) die höchsten Werte zeigten. Ebenso wie beim Nachweis der MIDGE Vektor-DNA wurden auch hier die Tiere 0 min., 5 min., 10 min., 30 min., 60 min., 3 h, 6 h, 24 h und 48 h nach Jet-Injektion analysiert. Zu keinem Zeitpunkt konnte in Leber und Ovar mittels real-time qRT-PCR die Expression von TNF α nachgewiesen werden.

4.3.1 Quantitative Analyse der TNF α mRNA Expression im Tumor

Im Tumorgewebe konnte die erfolgreiche TNF α mRNA Expression mittels real-time qRT-PCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 21). Diese zeigt einen Peak zwischen 30 und 60 min. nach intratumoraler *in vivo* Jet-Injektion. Jedoch ist ein starker Abfall der Expression zwischen 3 und 24 h nach Jet-Injektion zu beobachten, der sich dann bis 48 h drastisch fortsetzt. Der Nachweis von TNF α mRNA im Tumorgewebe unterstützt die Beobachtung, dass die Transkription des Transgens nach Jet-Injektion erfolgreich ist.

Hierbei ist zu beachten, dass der Peak der intratumoralen Vektor-DNA (siehe Abb. 12) zwischen 0 und 60 min. liegt – der Peak der mRNA Expression ist also zeitlich verschoben und liegt zwischen 30 und 60 min. nach Jet-Injektion. Das TNF α Transkript ist bis zum Zeitpunkt 48 h nach Jet-Injektion in den Tumoren detektierbar.

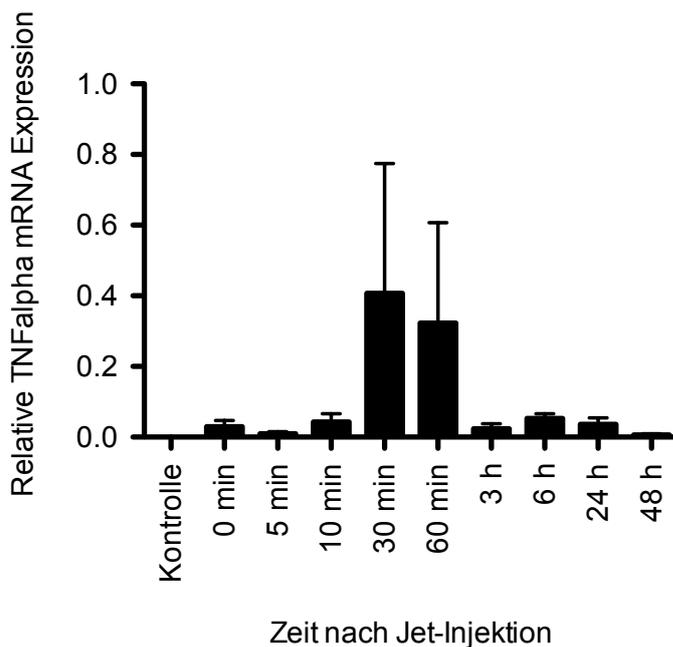


Abb. 21: Darstellung der TNF α mRNA Expression im Tumorgewebe mittels qRT-PCR zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte im Duplikat für n=3 Tiere pro Zeitpunkt in Relation zur Expression des "House-Keeping" Gens G6PDH. Die Fehlerbalken repräsentieren den SE.

4.3.2 Quantitative Analyse der TNF α Proteinexpression im Tumor mittels ELISA

Um die Korrelation zwischen der Expression von TNF α auf mRNA- und Proteinebene zu untersuchen, wurde ein ELISA zur quantitativen Analyse der TNF α Proteinexpression im Tumorgewebe durchgeführt.

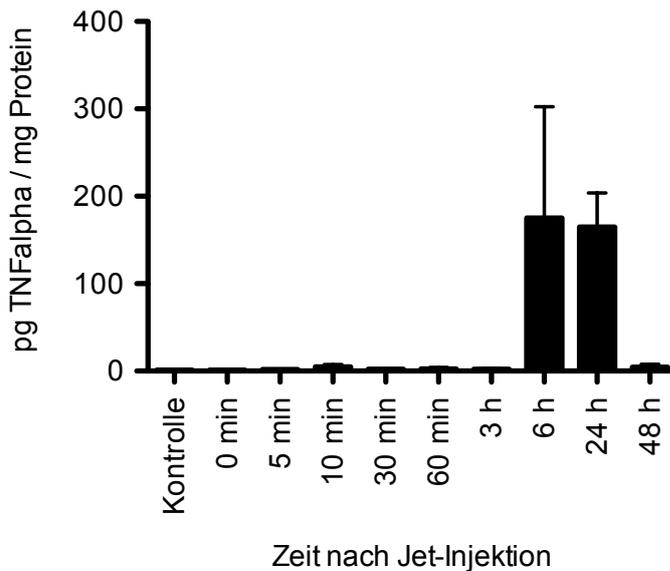


Abb. 22: Analyse der TNF α Proteinexpression im Tumorgewebe (pg TNF α / mg Protein) mittels TNF α -ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten nach *in vivo* Jet-Injektion.

In Abbildung 22 zeigt sich ein Peak der Proteinexpression von TNF α nach 6 bzw. 24 h mit einem Höchstwert von 425 pg TNF α pro mg Protein im Tumorgewebe (6 h, Tier 3). Nach 24 h zeigen sich hohe Werte zwischen 99 und 233 pg TNF α . Diese sind nach 48 h rückläufig und fallen auf Werte zwischen 1 und 11 pg TNF α / mg Protein ab. Die Analyse macht darüber hinaus die zeitliche Verschiebung zwischen dem Peak der TNF α Transkription (30 – 60 min.) und der TNF α Translation (6 – 24 h) in den Jet-injizierten Tumoren deutlich. Generell belegen die Daten die effektive Transgenexpression nach intratumoralem Gentransfer mittels Jet-Injektion.

4.3.3 Evaluation der TNF α Expression im Tumor mittels Immunhistochemie

Um die Verteilung des TNF α Proteins im Tumorgewebe zu analysieren wurde eine TNF α -spezifische Immunhistochemie durchgeführt. Repräsentative Ausschnitte der Tumoren von jeweils zwei Tieren 6 h und 24 h nach Jet-Injektion wurden in 20- und 40-facher Vergrößerung analysiert um die lokale Verteilung und mögliche biologische Wirkung von TNF α im Gewebe darzustellen (siehe Abb. 23).

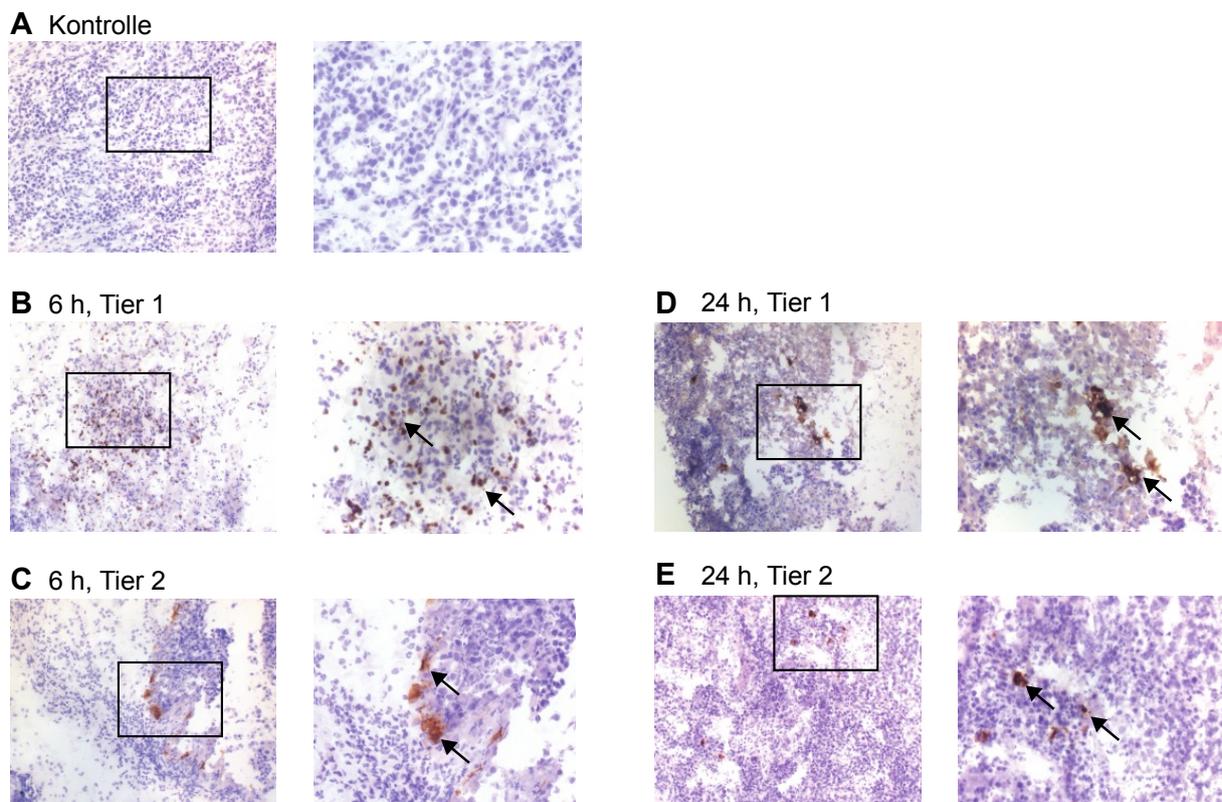


Abb. 23: Distribution des TNF α Proteins im Tumorgewebe analysiert mittels Immunhistochemie. (A) Bilder der Negativkontrolle. (B) und (C) Photographien von jeweils zwei Tieren (6 h und 24 h nach Jet-Injektion) wurden mit 20 bzw. 40facher Vergrößerung angefertigt. Die Pfeile zeigen die TNF α Expression in Tumorzellen und die TNF α Sekretion im Interzellularraum.

Zur Negativkontrolle der Immunhistochemie wurden Schnitte des Tumors eines Tieres der nicht Jet-injizierten Kontrollgruppe angefertigt. Hier zeigen sich keine

angefärbten Areale; es gibt keinen Hinweis auf Proteinexpression von humanem TNF α .

Die Abbildungen 23 B und C zeigen angefärbte, TNF α -positive Areale in den Tumorschnitten der Tiere, die 6 bzw. 24 h nach Jet-Injektion untersucht wurden. Die Pfeile deuten auf Areale mit besonders hoher TNF α Proteinexpression. Diese zeigt sich sowohl im Intra- als auch im Interzellularraum.

Insgesamt zeigt sich auf Proteinebene eine sehr inhomogene Verteilung der TNF α -Expression in den einzelnen Tumoren, welche auf die Heterogenität der Applikation des Jet-Injektors zurückgeführt werden können (siehe Kap. 5). Apoptotische und nekrotische Areale sowie die Infiltration von Lymphozyten und Granulozyten weisen auf eine mögliche biologische Wirkung von TNF α in den Tumoren hin.

5. DISKUSSION

In dieser präklinischen tierexperimentellen Studie wurde die intratumorale und systemische Distribution sowie die Biosicherheit des via *in vivo* Jet-Injektion applizierten neuen MIDGE Vektors im Rahmen einer Tumorgentherapie mit TNF α als Transgen in xenotransplantierten humanen Melanomen auf NMRI-*nu/nu* Mäusen untersucht.

Verschiedene Vektoren erfüllen unterschiedliche Sicherheitsansprüche bei wiederum unterschiedlich hohen Transfereffizienzen. Wir nutzten einen neuartigen minimalistischen immunologisch definierten Genexpressionsvektor (MIDGE) und analysierten tierexperimentell die Biosicherheit des Gentransfers dieses Vektors und parallel seine Expressionseffizienz. Die Verwendung von in der Größe signifikant reduzierten Vektoren (z.B. auch Minicircle) hat den Vorteil, dass nicht benötigte Gensequenzen eliminiert werden und somit die Effektivität des Vektors in der Genexpression erhöht werden kann. So hat Bureau *et al.* bereits 2004 beschrieben, dass die Größe eines (Plasmid-)Vektors einen entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz hat. Je kleiner der Vektor ist, desto höher ist die Effizienz für die Transgenexpression [72]. Der in dieser Arbeit verwendete MIDGE Vektor weist gegenüber herkömmlichen Plasmidvektoren eine 50 – 80%ige Größenreduktion auf und ist daher als Vektorsystem vor allem in der nicht-viralen Gentherapie von besonderem Interesse.

5.1 Analyse der *in vivo* Vektorverteilung Jet-injizierter MIDGE Vektor-DNA

Der effiziente *in vivo* Gentransfer dieses nicht-viralen Vektorsystems wurde mit der Jet-Injektion erreicht [73]. Als physikalische Transfertechnologie bietet die nadellose Jet-Injektion die Möglichkeit einer relativ tiefen Penetration ins Zielgewebe verbunden mit einer guten Dispersion. Schon bei Einsatz geringer DNA-Mengen in kleinen Volumina von 5 – 10 μ l kann ein erfolgreicher Gentransfer erzielt werden, der zur effektiven Transgenexpression führt [74]. Andere Studien zum Transfer von so genannten DNA-Vakzinen via Jet-Injektion berichten ebenso über einen vielversprechenden Einsatz dieser Transfertechnologie [75].

Die zeitabhängige intratumorale MIDGE Vektor-DNA Distribution wurde in dieser Arbeit mit dem Nachweis von Vektor-DNA im Tumor mittels real-time qPCR

nachgewiesen. Die Werte zur intratumoralen DNA Verteilung in Abbildung 12 zeigen eine konstant hohe Akkumulation von MIDGE Vektor-DNA zwischen 0 und 60 min. nach Jet-Injektion. Die hohen SE-Werte weisen auf starke interindividuelle Unterschiede hin. Alle xenotransplantierten Tumoren erreichten durchschnittlich eine Größe von 5 x 5 mm. Schon geringe Schwankungen in Größe und Dichte der Tumoren sind jedoch relevant und können mitverantwortlich für die ungleiche Vektor-DNA Applikation und damit Verteilung sein. Weiterhin spielt hierbei der methodische Aspekt bei der Analyse des Tumorgewebes eine große Rolle. Es wurde nicht der absolut gesamte Tumor untersucht, sondern einzelne Fraktionen des Gewebes. Diese Fraktionen geben einen Überblick über die intratumorale Verteilung des Vektors, können jedoch relativ großen Schwankungen unterliegen. So ist es durchaus möglich, dass in Fraktionen nahe der Jet-Penetration bei großem Tumordurchmesser mehr Vektor-DNA zu finden ist, als in Fraktionen, die entfernt von der Jet-Penetration liegen. Ähnliche Vektorverteilungen wurden auch in Studien mit Jet-injizierter Plasmid-DNA gefunden (71).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Arbeit war die Analyse der zeitabhängigen Akkumulation sowie Clearance der Vektor-DNA im Jet-injizierten Tumorgewebe. Nach einer schnellen Akkumulation von MIDGE Vektor-DNA im Tumorgewebe nach der Jet-Injektion folgt die rasche Clearance bereits nach 6 h. Ein Auswaschen der Vektor-DNA durch den Blutfluss ist hierfür maßgeblich verantwortlich. Da im Tumorgewebe verschieden ausgeprägte Vaskularisationsverhältnisse herrschen, ist die Heterogenität dieses Auswaschens mit hieraus resultierenden unterschiedlich hohen Anteilen von MIDGE Vektor-DNA zu erklären. Die Clearance wird außerdem auch durch den Abbau von eingebrachter DNA durch endogene Nukleasen begünstigt. Dieses Phänomen wurde bereits in vielen Studien zum Gentransfer von DNA beobachtet [76, 77, 78] .

Im Vergleich mit anderen Biodistributionsanalysen zeigt die *in vivo* Jet-Injektion eine besonders schnelle Clearance. Nach 48 Stunden beträgt die Menge an MIDGE Vektor-DNA durchschnittlich nur noch 11 pg / 250 ng Tumorgewebe DNA. In Studien mit anderen Gentransfertechnologien, wie z.B. der Elektroporation, konnte eine stabile Verweildauer des Vektors und damit verbundene Expression des Transgens im Zielgewebe von bis zu 9 Monaten beobachtet werden [79] . Auch nach

hydrodynamischer Schwanzveneninjektion verblieb das Transgen in verschiedenen *in vivo* Studien zwischen 7 und 10 Tagen und maximal bis zu 12 und 24 Wochen nach Injektion nachweisbar [80, 81, 82, 83] .

Es ergeben sich somit Präferenzen für verschiedene Gentransfertechnologien je nachdem, ob eine stabile längere Verweildauer oder nur eine kurze Akkumulation mit limitierter Transkription bzw. Translation als Ziel definiert ist. Eine kurze, schnelle und dabei hohe DNA-Akkumulation gefolgt von rascher Clearance (im Zielgewebe nach 48h, in distanten Organen bereits nach 3 bis 6 h) werden für den MIDGE Vektor bei Jet-Injektion erzielt und sind für lokale Gentherapie-Strategien auch sinnvoll.

Um die Analyse der MIDGE Vektor-DNA Verteilung innerhalb des Tumorgewebes präziser und aussagekräftiger zu gestalten, wurden zehn weitere Fraktionen pro Tier zum Zeitpunkt 5 min. und 30 min. nach Jet-Injektion untersucht. Die unterschiedlich hohen Werte (siehe Tab. 7) sprechen für eine große Heterogenität in der Distribution des Vektors im Zielgewebe. Diese ist durch die physikalischen Eigenschaften des Jet-Injektors zu erklären. Fünf verschiedene Injektionsstellen dienen jeweils der Applikation des Genkonstruktes. Hierbei ist ein unterschiedlicher Einschusswinkel der DNA-haltigen Flüssigkeit anzunehmen. Entlang des Jets, ebenso wie am distalen Punkt der Penetration ist mit einem höheren Gehalt von MIDGE Vektor-DNA zu rechnen (Pooling). An anderen Stellen des Tumors hingegen sind Areale mit niedrigeren DNA-Mengen zu beobachten. Diese Inhomogenität konnte bereits in anderen Distributionsstudien bei Verwendung der Jet-Injektion gezeigt werden und hängt mit der verschiedenen Verteilung hochbeschleunigter Flüssigkeit (Jet) in unterschiedlich dichten Gewebearalen zusammen [64, 71, 84, 85] .

5.2 Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma

Neben der hohen Transfereffizienz steht bei der Einführung neuer Vektoren für die Tumorgentherapie die Biosicherheit an vorderster Stelle. Um eine hohe Sicherheit zu gewährleisten und klinische Studien verwirklichen zu können, sind zunächst präklinische Studien zur Biosicherheit unerlässlich und durch die Zulassungsbehörden gefordert. Eine mögliche Freisetzung des eingebrachten Vektors aus dem Zielgewebe in den Blutkreislauf kann nicht zu 100% verhindert

werden. Das Ausmaß dieser systemischen Freisetzung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Beschaffenheit des Zielgewebes spielt hierbei eine große Rolle. Tumorgewebe ist oftmals stärker vaskularisiert als andere Gewebe. Die Verteilung der Vektor-DNA in den Blutkreislauf kann hierdurch begünstigt werden. Des Weiteren wird postuliert, dass durch Jet-Injektion eingebrachte DNA eine Penetrationstiefe von 5 – 10 mm erreichen kann [84] . Bei Tumoren mit größerem Durchmesser ist dies von Vorteil; die einzubringende DNA erreicht auch tiefer gelegene Tumorabschnitte. Dennoch kann die weitreichende Penetrationstiefe auch nachteilige Effekte haben. So kann bei kleineren Tumoren nicht vollkommen gewährleistet werden, dass die Jet-Injektion der Vektor-DNA tiefere, das Zielgewebe überschreitende Areale nicht auch erreicht und möglicherweise ungewollt angrenzendes Normalgewebe transfizieren kann.

In der vorliegenden Studie konnte eine Freisetzung von Vektor-DNA in das Blutplasma beobachtet werden. Nach der Jet-Injektion in das Zielgewebe zeigt sich ein Anfluten von MIDGE Vektor-DNA in den Blutkreislauf. Die DNA Mengen im Blutplasma zeigen eine große Heterogenität (siehe Abb. 15 und Tab. 8) und sind zeitlich versetzt zur Akkumulation im Zielgewebe. Die interindividuell unterschiedlich hohen Werte lassen sich durch den Schusskanal des Jet-Injektors erklären. Liegen Blutgefäße, besonders solche mit großem intraluminalen Durchmesser, in Reichweite des Schusskanals, kann MIDGE Vektor-DNA auf direktem Weg in den Blutkreislauf gelangen. Hierfür spricht, dass die Werte von MIDGE Vektor-DNA im Blutplasma zweier Tiere (Tier 1, 10 min. und Tier 1, 30 min.) sogar die jeweiligen intratumoralen Werte überschreiten. Diese Werte sind nicht durch ein Auswaschen der DNA zu erklären, sondern zeigen, dass Vektor-DNA auf diese Weise wahrscheinlich direkt in Blutgefäße gelangt ist und systemisch verteilt wird.

5.3 Quantitative Analyse und Clearance von MIDGE Vektor-DNA in Organen

Durch die Verteilung von MIDGE Vektor-DNA über den Blutkreislauf kann diese auch in distanten Organen in geringer Menge nachgewiesen werden. Die Menge an Vektor-DNA ist jedoch ohne Ausnahme in allen Organen um Größenordnungen niedriger als im Tumorgewebe. So unterschreiten die Werte im Tumorgewebe erst nach 24 h mit beginnender Clearance 100 pg Vektor-DNA pro 250 ng Tumorgewebe,

wobei in distanten Organen die Werte in allen Messungen immer unter 100 pg Vektor-DNA pro 250 ng Organgewebe betragen. Die Jet-Injektion besitzt demnach eine hohe lokale Transfereffizienz im Tumorgewebe, jedoch nur ein geringes Risiko der Vektorverteilung in zielfremde Gewebe. Die Werte der MIDGE Vektor-DNA sind je nach untersuchtem Organgewebe unterschiedlich hoch. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Werte erläutert und Erklärungsansätze gefunden werden.

Im Ovargewebe zeigen sich durchschnittlich niedrige Werte zwischen 17 und 84 pg Vektor-DNA pro 250 ng Gewebe. Zwei vereinzelt hohe Werte (389 bzw. 250 pg) stellen Ausnahmen dar. Die Möglichkeit, dass durch den Flüssigkeitsstrahl des Jet-Injektors bei diesen Tieren MIDGE Vektor-DNA direkt in ein das Ovar versorgende Blutgefäß injiziert wurde, ist denkbar. Die Menge der Vektor-DNA korreliert nicht mit hohen Werten im Blutplasma, sodass ein Transport der DNA über den Blutkreislauf nicht wahrscheinlich bzw. unmöglich ist. Aufgrund der Lage des xenotransplantierten Tumors in der Flankenregion der Tiere ist die Möglichkeit einer ungewollten, direkten Applikation in nahe Regionen der Ovarien denkbar. Die Erkenntnis, dass die im Vergleich höheren Werte im Ovargewebe nicht durch Auswaschen des Vektors über den Blutkreislauf, sondern über die anatomische Nähe der Ovarien zur Stelle der Injektionen im Mausmodell zu erklären ist, spielt jedoch eine nur geringe Rolle für zukünftige klinische Studien. Das maligne Melanom ist beim Menschen am häufigsten an Rumpf und Unterschenkel (57%) gefolgt von Rücken, Brust und Extremitäten (21%) und Gesicht (8%) lokalisiert (siehe Tab. 1). Diese Lokalisationen bieten keine direkte anatomische Nähe zu den Gonaden. Weiterhin unterscheidet sich die Penetrationstiefe der Jet-Injektion bei Mäusen im Vergleich zum Menschen prozentual zur Körpergröße bzw. in Relation zu den Abständen der Organe zur Injektionsstelle um Größenordnungen. Penetriert der Strahl des Jets den Tumor der Maus 10 mm in die Tiefe, ist es realistisch, dass umliegende Gewebe, auch Organgewebe bzw. große Blutgefäße, getroffen werden. Beim Menschen jedoch ist dies kaum möglich. Befindet sich ein Melanom am Rumpf oder Unterschenkel, befindet sich im Regelfall allenfalls Unterhautfett-, Muskel- oder Bindegewebe in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle. Große Gefäße sind nicht in Reichweite des Injektionsstrahls; sie verlaufen beim Menschen in tieferen und somit Melanomferneren Regionen. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass für klinische Studien allein die MIDGE Vektor-DNA von Bedeutung ist, die über den Blutkreislauf durch die

Tumervaskularisation in die distanten Organen verteilt werden kann. Dabei ist jedoch wesentlich, inwieweit derartig systemisch verteilte Vektor-DNA tatsächlich zu einem Gentransfer an distanten Organen führen kann. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in distanten Organen zu keinem Zeitpunkt mRNA des untersuchten Plasmids vorhanden war [71] . Diese Ergebnisse konnten mit unserer Studie bestätigt werden (s.u.).

In der Leber detektierten wir von allen distanten Organen die zweithöchsten MIDGE Vektor-DNA Werte, die jedoch 50 pg nie überschritten (siehe Abb. 17). Die topographische Nähe der Leber zur Injektionsstelle kann hierbei keine Rolle spielen, da die Tumoren ausschließlich in der linken Flankenregion der Mäuse lokalisiert waren. Die Leber zählt zu den am besten durchbluteten Organen des Körpers. Sie wird sowohl mit nährstoffreichem venösen Blut als auch mit sauerstoffreichem arteriellen Blut versorgt und bietet Speicher für etwa 10% des gesamten Blutvolumens. Diese Faktoren haben Einfluss auf die Menge von MIDGE Vektor-DNA im Gewebe. In Plasmidstudien zur Biodistribution von Vektor-DNA konnte diese vermehrte Vektoransammlung in der Leber ebenso beobachtet werden [71] . In der Literatur wird die Leber in diesem Kontext als „DNA Schwamm“ bezeichnet, da es als ein Organ mit hoher DNA Aufnahmekapazität gilt [86] . Dennoch darf in unserem Falle die Vektor-Menge, die zu keinem Zeitpunkt 50 pg Vektor-DNA überschreitet, nicht außer Acht gelassen werden. Höchstwerte im Jet-injizierten Tumorgewebe weisen das 267-fache dieses Wertes auf und demonstrieren so die vergleichsweise geringe Biodistribution der Vektor-DNA selbst in sehr stark vaskularisierte Organe wie die Leber.

Im Hirngewebe betrug der höchste gemessene Wert von MIDGE Vektor-DNA 22 pg pro 250 ng Hirngewebe (siehe Abb. 18). Diese geringe Ansammlung von Vektor-DNA kann durch die Blut-Hirn-Schranke erklärt werden, denn sie stellt die physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und Zentralem Nervensystem dar. Die Endothelzellen der Blutgefäße, die diese Barriere aufrecht erhalten, weisen besondere Zell-Zell Kontakte auf, so genannte Tight-Junctions. Sie verhindern den Durchtritt von größeren Molekülen in das Zentrale Nervensystem und halten unter anderem die intrazerebrale Homöostase aufrecht [87] . Durch diese Barriere ist der Eintritt von Molekülen, wie der MIDGE Vektor-DNA, stark behindert, sodass niedrige

Mengen Vektor-DNA im Hirngewebe nur in geringen Mengen durchaus zu erwarten sind und sich experimentell in dieser Arbeit bestätigt haben.

Sowohl das Herz- als auch das Lungengewebe weisen besonders niedrige MIDGE Vektor-DNA Werte auf; in Milz und Niere ist praktisch keine Vektor-DNA nachweisbar (siehe Abb. 19 und 20). Diese Werte sprechen insgesamt für eine geringe Vektordissemination über den Blutkreislauf in distante Organe. Trotz der anatomischen Nähe von Milz und Niere zur Injektionsstelle scheinen im Falle dieser Organe keine zuführenden Blutgefäße direkt getroffen worden zu sein.

5.4 Analyse der TNF α Expression

Um die erfolgreiche Transkription des humanen TNF α zu analysieren, wurde eine Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) durchgeführt und die mRNA-Menge im Tumorgewebe untersucht. Da Ovar- und Lebergewebe die höchsten MIDGE Vektor-DNA Werte in distanten Organen aufwiesen, analysierten wir auch diese mittels qRT-PCR, um eine mögliche Transkription von TNF α mRNA in diesen Organen auszuschließen.

Wie zu erwarten konnte keine Transkription von TNF α in distanten Organen (Ovar und Leber; nicht abgebildet) nachgewiesen werden. Die geringe Menge Vektor-DNA, die über den Blutkreislauf bzw. durch akzidentelle direkte Jet-Injektion (s.o.) verteilt wird und distante Organe erreicht, ist demnach nicht ausreichend, um eine suffiziente Transkription zu bewirken [71] .

Im Tumorgewebe hingegen genügten die Jet-injizierten DNA-Mengen von 50 μ g, um die Transkription von mRNA zu ermöglichen (siehe Abb. 21). Dass der Vektor-DNA Gehalt im Gewebe mit der Transkriptionsaktivität, also mit der Menge detektierter mRNA korreliert, konnten bereits Bureau et al. nach intramuskulärer Injektion von DNA zeigen [69] . Die Expression der TNF α mRNA nach Jet-Injektion mit dem MIDGE Vektor zeigt ein ähnliches Muster wie die RNA-Expression in Distributionsstudien, in denen Plasmid-vermittelte Expressionen nach *in vivo* Gentransfer analysiert wurden [88, 89, 90] . Es zeigt sich eine zeitliche Verschiebung des Auftretens von mRNA zur Vektor-DNA. Der Peak der analysierten

mRNA erstreckt sich von 30 bis 60 min., der DNA-Peak beginnt sehr viel früher bei 0 min. nach Jet-Injektion. Die Transkription findet somit zeitlich versetzt zur Akkumulation der DNA statt. Die DNA wird also im Tumorgewebe erfolgreich in mRNA umgeschrieben.

Neben der Analyse der mRNA Level und der somit erfolgreichen Transkription, ist es von besonders großem Interesse, ob es nach dieser auch zu einer Translation und somit zur Bildung von TNF α auf Proteinebene kommt. Bereits in einer Phase I klinischen Gentherapie-Studie konnte gezeigt werden, dass es nach Jet-Injektion von beta-Galactosidase exprimierendem Plasmid zur erfolgreichen Translation mit Synthese des LacZ-Proteins kommt [64] .

Auch in dieser Studie zeigt sich nach Jet-Injektion intratumoral ein Peak der Transkription des Transgens zwischen 30 und 60 min.. Eine zeitlich versetzte Translation findet danach statt. Zwischen 6 und 24 Stunden werden hier höchste Mengen von humanem TNF α Protein gemessen (siehe Abb. 22). Höchstwerte von 430 pg hTNF α pro mg Gewebeprotein sind klarer Beleg für die effiziente Translation der zuvor gebildeten TNF α mRNA und definieren auch das mögliche therapeutische Fenster durch die Präsenz der Zytokins im Tumor.

In vorangegangenen Studien zu TNF α konnte gezeigt werden, dass bereits 20 – 50 pg TNF α pro mg Protein in der Lage sind, therapeutische Effekte auszulösen [91] . Somit zeigt sich hier das große Potenzial der *in vivo* Jet-Injektion bezüglich der klinischen Anwendbarkeit und Nutzung von TNF α als therapeutisches Transgen in der Tumorgentherapie. Große Mengen Protein, die ausschließlich im Zielgewebe präsent sind, können lokal ihre Wirksamkeit entfalten. Es ist in anderen Untersuchungen gezeigt worden, dass es hierbei nicht zur systemischen Freisetzung des TNF α und damit verbundenen Nebenwirkungen kommt. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in distanten Organen keine Transkription der TNF α mRNA stattfindet.

Die Limitationen der klinischen Anwendung von TNF α zeigt sich in den systemischen Nebenwirkungen des Zytokins [92] . In Studien mit TNF α und ILP (Isolated Limb Perfusion) sah man am Patienten kardiovaskuläre, respiratorische und hämatologische Toxizität, sobald das Zytokin in relevanten Mengen in den

Körperkreislauf gelangte, welche hier von 431 bis 111.000 pg TNF α pro ml schwankten [93] . Die systemische Applikation von TNF α kommt als Therapieoption nicht in Frage, da das Verhältnis von Wirkung mit therapeutisch notwendigen hohen Dosen und Nebenwirkung nicht akzeptabel ist. Durch die Jet-Injektion von MIDGE Vektor mit TNF α als Transgen können diese Limitationen überwunden werden. Die hohen lokalen, intratumoralen Werte von MIDGE Vektor-DNA, TNF α mRNA und entsprechend TNF α Protein in Verbindung mit der Abwesenheit von TNF α mRNA und Protein in distanten Organen und im Blut ermöglichen neue Herangehensweisen mit TNF α in der Tumorthherapie.

Die chemosensitivierenden Eigenschaften von TNF α können in Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie Melphalan und Vindesin optimal genutzt werden. Das TNF α bewirkt, wenn wie im Fall der Jet-Injektion lokal intratumoral appliziert, eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und weist gleichzeitig eine proapoptotische Wirkung bezüglich der Tumorangiogenese auf [49, 94] . Durch die erhöhte Permeabilität der Gefäße kann eine Chemosensitivierung erreicht werden. Die intravenös verabreichten Chemotherapeutika entfalten intratumoral eine besonders hohe Wirkung. Die proapoptotische Wirkung auf die Tumor-assoziierte Vaskularisation zeigt sich in einer Destruktion der Gefäßauskleidung [49] . Um neben der TNF α Verteilung auch die lokale Wirkung von TNF α im Tumorgewebe näher zu analysieren, wurde eine Immunhistochemie durchgeführt.

5.5 Evaluation der TNF α Expression im Tumor mittels Immunhistochemie

In der immunhistochemischen Untersuchung des Jet-injizierten TNF α enthaltenden MIDGE Vektors konnten die intratumorale Verbreitung und die biologischen Effekte von TNF α auf das Tumorgewebe näher untersucht werden (siehe Abb. 23). Die histologische Analyse des Tumorgewebes zeigt eine heterogene Dissemination von TNF α im gesamten Tumor – sowohl intrazellulär als auch im Interzellularraum. Diese inhomogene Verteilung ist auf die physikalischen Eigenschaften des Jet-Injektors zurückzuführen. Bereits in vorangegangenen Distributionsstudien, in denen diese Transfertechnologie genutzt wurde, konnte ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet werden [71, 95] .

Weiterhin fallen sowohl apoptotische als auch nekrotische Areale in den Tumorabschnitten auf. Dieses Nebeneinander von Apoptose und Nekrose ist einerseits durch die Wirkweise von TNF α und andererseits durch die geringe Zahl an durch die Kraft des penetrierenden Jets destruierten Zellen zu erklären.

TNF α zeigt hier seine proapoptotische Wirkung auf die Tumor-assoziierte Vaskularisation (s.o.). Durch die Aktivierung verschiedener Caspasen kommt es zum programmierten Zelltod [49, 96]. Wie auch im histopathologischen Bild deutlich wird wandern Granulozyten und Lymphozyten im Sinne einer Entzündungsreaktion in die untersuchten Areale ein. Diese können als lokale Folge der nekrotischen Zellen gedeutet werden.

Insgesamt zeigt sich eine hohe lokale Transfereffizienz der MIDGE Vektor-DNA in das intratumorale Zielgewebe, die zur erfolgreichen Transkription und Translation des Transgens führt. Hierbei ist die systemische Distribution der Vektor-DNA dennoch vergleichsweise gering und ohne jegliche Transkriptionsaktivität, sodass von einer hohen Biosicherheit dieser Gentransfertechnologie ausgegangen werden kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Krebs gilt in Deutschland als zweithäufigste krankheitsbedingte Todesursache. Die Etablierung neuer Therapiestrategien dieser Erkrankung stehen im Fokus aktueller Forschung und werden bereits klinisch angewandt. Zu diesen neuen Strategien gehört auch die Tumorgentherapie.

In der Tumorgentherapie haben sich als Transfersysteme seit langem auch in klinischen Studien virale Vektoren etabliert, werden wegen ihres großen Nebenwirkungsspektrums jedoch noch immer hinterfragt. Nicht-virale Vektoren gewinnen deshalb an Interesse und gelten als besonders sicher. Sie erreichen mittels optimierter kleiner Vektorsysteme wie Minicircle und MIDGE immer höhere Transfereffizienzen und verbesserte Transgenexpression. Für den Transfer nicht-viraler Vektoren hat sich die Kombination mit verschiedenen physikalischen Transfertechnologien wie zum Beispiel der *in vivo* Jet-Injektion etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell ein neuartiger TNF α exprimierender minimalistischer immunologisch definierter Genexpressionsvektor (MIDGE) mittels Jet-Injektion in xenotransplantierte humane Melanome *in vivo* intratumoral appliziert. Der Fokus der molekularbiologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lag sowohl auf der Analyse der Effizienz des durch Jet-Injektion vermittelten MIDGE Vektor Gentransfers als auch auf der Analyse der Vektorverteilung und Clearance in Tumor, Blut und ausgewählten Organen (Leber, Herz, Niere, Lunge, Milz, Ovarien, Hirn).

Indikatoren für die Effektivität eines Gentransfers sind neben dem Nachweis des Transgen-tragenden Vektors im Zielgewebe auch die Analysen der Transkription und Translation des Transgens. Die hier durchgeführten Untersuchungen des Tumorgewebes im Tierexperiment zeigten neben einer erfolgreichen *in vivo* Jet-Injektion mit Vektornachweis in der real-time qPCR auch eine effiziente intratumorale Expression des Transgens auf mRNA- und Proteinebene mittels real-time qRT-PCR, ELISA und Immunhistochemie. Diese Ergebnisse sprechen für eine herausragende Effizienz des intratumoralen *in vivo* MIDGE Vektor Gentransfers mittels Jet-Injektion.

Als wichtiger Parameter der Sicherheit des Gentransfers muss bestimmt werden, inwieweit die systemische Verteilung des Vektors im Organismus in sehr geringen Mengen auftritt und nur transient ist, also eine rasche Clearance zeigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zwar nach intratumoraler Jet-Injektion zur Ausschwemmung von MIDGE Vektor-DNA in den Blutkreislauf und darüber hinaus auch in distante Organe kommt. Jedoch konnte hier zu keiner Zeit eine mRNA-Transgenexpression beobachtet werden. Darüber hinaus wurde 24 Stunden nach Jet-Injektion in keinem der untersuchten distanten Organe Transgen nachgewiesen. Es konnte somit gezeigt werden, dass es nach transientem Auftauchen von Vektor-DNA im gesamten Organismus innerhalb von 24 Stunden zu einer raschen vollständigen Clearance kommt. Diese Ergebnisse belegen eine hohe Biosicherheit des neuartigen MIDGE Vektors nach *in vivo* Jet-Injektion Gentransfer.

Als Transgen wurde humanes TNF α verwendet, da es bereits in Kombinationstherapien des malignen Melanoms als potentes Therapeutikum eingesetzt wurde. Die lokale Applikation des TNF α tragenden MIDGE Vektors in Verbindung mit nur geringer Bioverteilung im Organismus ist aufgrund der somit stark minimierten systemischen Nebenwirkungen von besonderem Vorteil. Somit kann der TNF α exprimierende MIDGE Vektor und dessen Transfer mittels *in vivo* Jet-Injektion in Zukunft zur effektiven lokal wirksamen Therapie maligner Melanome eingesetzt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MIDGE Vektor und Jet-Injektion eine vielversprechende Methode in der Tumorgentherapie darstellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass MIDGE Vektor und *in vivo* Jet-Injektion die Voraussetzungen für eine sichere Tumorgentherapie erfüllen und somit in Zukunft als effektive Therapie eingesetzt werden können.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Kraywinkel, K. (2012): Krebs gesamt, Berlin, Robert Koch-Institut
- [2] Gaber, E., Wildner, M. (2011): Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede, Institut, Robert Koch. Berlin
- [3] Lowe, S. W. und Lin, A. W. (2000): Apoptosis in cancer, Carcinogenesis (Band 21), Nr. 3, Seite 485-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688869>
- [4] Sung, J.; Turner, J.; McCarthy, S.; Enkemann, S.; Li, C. G.; Yan, P.; Huang, T. und Yeatman, T. J. (2005): Oncogene regulation of tumor suppressor genes in tumorigenesis, Carcinogenesis (Band 26), Nr. 2, Seite 487-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498783>
- [5] Croce, C. M. (2008): Oncogenes and cancer, The New England journal of medicine (Band 358), Nr. 5, Seite 502-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234754>
- [6] Jiao, Y. und Torquato, S. (2011): Emergent behaviors from a cellular automaton model for invasive tumor growth in heterogeneous microenvironments, PLoS computational biology (Band 7), Nr. 12, Seite e1002314. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215996>
- [7] Nakayama, K.; Nakayama, N.; Katagiri, H. und Miyazaki, K. (2012): Mechanisms of ovarian cancer metastasis: biochemical pathways, International journal of molecular sciences (Band 13), Nr. 9, Seite 11705-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109879>
- [8] Liotta, L. A. und Stetler-Stevenson, W. G. (1991): Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation, Cancer research (Band 51), Nr. 18 Suppl, Seite 5054s-5059s. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1884381>
- [9] Martinez, A. S. und Huelsken, J. (2012): The niche under siege: novel targets for metastasis therapy, Journal of internal medicine. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253195>
- [10] Kaatsch, P.; Spix, C.; Katalinic, A.; Hentschel, S; Baras, N.; Barnes, B.; Bertz, J.; Dahm, S.; Haberland, J; Kraywinkel, K.; Laudi, A.; Wolf, U. (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008, Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 8, 60-61

- [11] Sterry, W. und Paus, R. (2004): Checkliste Dermatologie (Band 5), Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [12] Breslow, A. (1975): Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma, *Annals of surgery* (Band 182), Nr. 5, Seite 572-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1190862>
- [13] Lyth, J.; Hansson, J.; Ingvar, C.; Mansson-Brahme, E.; Naredi, P.; Stierner, U.; Wagenius, G. und Lindholm, C. (2012): Prognostic subclassifications of T1 cutaneous melanomas based on ulceration, tumour thickness and Clark's level of invasion: results of a population-based study from the Swedish Melanoma Register, *The British journal of dermatology*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066913>
- [14] Nachbar, F.; Stolz, W.; Merkle, T.; Cognetta, A. B.; Vogt, T.; Landthaler, M.; Bilek, P.; Braun-Falco, O. und Plewig, G. (1994): The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions, *Journal of the American Academy of Dermatology* (Band 30), Nr. 4, Seite 551-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157780>
- [15] Busam, K. J. (2001): Lack of relevant information for tumor staging in pathology reports of primary cutaneous melanoma, *American journal of clinical pathology* (Band 115), Nr. 5, Seite 743-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11345839>
- [16] Yajima, I.; Kumasaka, M. Y.; Thang, N. D.; Goto, Y.; Takeda, K.; Yamanoshita, O.; Iida, M.; Ohgami, N.; Tamura, H.; Kawamoto, Y. und Kato, M. (2012): RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy, *Dermatology research and practice* (Band 2012), Seite 354191. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013435>
- [17] Sotomayor, M. G.; Yu, H.; Antonia, S.; Sotomayor, E. M. und Pardoll, D. M. (2002): Advances in gene therapy for malignant melanoma, *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* (Band 9), Nr. 1, Seite 39-48. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907465>
- [18] Herold, G. (2012): *Innere Medizin*, Gerd Herold, Köln, ISBN: 3981466012.
- [19] Gomella, L. G.; Singh, J.; Lallas, C. und Trabulsi, E. J. (2010): Hormone therapy in the management of prostate cancer: evidence-based approaches,

- Therapeutic advances in urology (Band 2), Nr. 4, Seite 171-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789093>
- [20] Aarntzen, E. H.; Srinivas, M.; Radu, C. G.; Punt, C. J.; Boerman, O. C.; Figdor, C. G.; Oyen, W. J. und de Vries, I. J. (2012): In vivo imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans, Cellular and molecular life sciences : CMLS. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052208>
- [21] Rieder, E. und Swanstrom, L. L. (2011): Advances in cancer surgery: natural orifice surgery (NOTES) for oncological diseases, Surgical oncology (Band 20), Nr. 3, Seite 211-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832296>
- [22] Kroeger, N.; Gajda, M.; Zanow, J.; Petersen, I.; Settmacher, U.; Wunderlich, H. und Steiner, T. (2010): Downsizing a tumor thrombus of advanced renal cell carcinoma with neoadjuvant systemic therapy and resulting histopathological effects, Urologia internationalis (Band 84), Nr. 4, Seite 479-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20299776>
- [23] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, K.; Starke, K. (2009): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier, Urban & Fischer München / Jena.
- [24] Monsuez, J. J.; Charniot, J. C.; Vignat, N. und Artigou, J. Y. (2010): Cardiac side-effects of cancer chemotherapy, International journal of cardiology (Band 144), Nr. 1, Seite 3-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399520>
- [25] Mlineritsch, B. (2009): Is Higher Efficacy Always at the Price of More Side Effects during Chemotherapy?, Breast care (Band 4), Nr. 3, Seite 162-165. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847875>
- [26] Stoehlmacher, J. (2007): Prediction of efficacy and side effects of chemotherapy in colorectal cancer, Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer (Band 176), Seite 81-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607918>
- [27] Kauffmann, G. W.; Moser, E. und Sauer, R. (2006): Radiologie, Urban & Fischer in Elsevier.
- [28] Herzog, R. W.; Cao, O. und Srivastava, A. (2010): Two decades of clinical gene therapy--success is finally mounting, Discovery medicine (Band 9), Nr. 45, Seite 105-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193635>

- [29] Mavrogenis, A. F.; Pala, E.; Romantini, M.; Guerra, G.; Romagnoli, C.; Maccauro, G. und Ruggieri, P. (2011): Side effects of radiation in musculoskeletal oncology: clinical evaluation of radiation-induced fractures, *International journal of immunopathology and pharmacology* (Band 24), Nr. 1 Suppl 2, Seite 29-37. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669135>
- [30] (1997): Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, *Lancet* (Band 350), Nr. 9084, Seite 1047-59. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213546>
- [31] Sciarra, A.; Cardi, A.; Salvatori, G.; D'Eramo, G.; Mariotti, G. und Di Silverio, F. (2004): Which patients with prostate cancer are actually candidates for hormone therapy?, *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* (Band 30), Nr. 6, Seite 455-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15663802>
- [32] Langdon, S. P. und Smyth, J. F. (2008): Hormone therapy for epithelial ovarian cancer, *Current opinion in oncology* (Band 20), Nr. 5, Seite 548-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106659>
- [33] Grillo-Lopez, A. J.; White, C. A.; Varns, C.; Shen, D.; Wei, A.; McClure, A. und Dallaire, B. K. (1999): Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma, *Seminars in oncology* (Band 26), Nr. 5 Suppl 14, Seite 66-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561020>
- [34] Merkel, S.; Meyer, T.; Papadopoulos, T.; Schuler, G.; Gohl, J.; Hohenberger, W. und Hermanek, P. (2002): Testing a new staging system for cutaneous melanoma proposed by the American Joint Committee on Cancer, *European journal of cancer* (Band 38), Nr. 4, Seite 517-26. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872344>
- [35] Lens, M. B.; Dawes, M.; Goodacre, T. und Bishop, J. A. (2002): Excision margins in the treatment of primary cutaneous melanoma: a systematic review of randomized controlled trials comparing narrow vs wide excision, *Archives of surgery* (Band 137), Nr. 10, Seite 1101-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361412>

- [36] Biver-Dalle, C.; Puzenat, E.; Puyraveau, M.; Delroeux, D.; Boulahdour, H.; Sheppard, F.; Pelletier, F.; Humbert, P. und Aubin, F. (2012): Sentinel lymph node biopsy in melanoma: Our 8-year clinical experience in a single French institute (2002-2009), *BMC dermatology* (Band 12), Seite 21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228015>
- [37] Torjesen, I. (2013): Sentinel node biopsy for melanoma: unnecessary treatment?, *BMJ* (Band 346), Seite e8645. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299845>
- [38] Wong, S. L.; Balch, C. M.; Hurley, P.; Agarwala, S. S.; Akhurst, T. J.; Cochran, A.; Cormier, J. N.; Gorman, M.; Kim, T. Y.; McMasters, K. M.; Noyes, R. D.; Schuchter, L. M.; Valsecchi, M. E.; Weaver, D. L. und Lyman, G. H. (2012): Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline, *Annals of surgical oncology* (Band 19), Nr. 11, Seite 3313-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766987>
- [39] Macklis, R. (2012): Finally, a substantial role for radiotherapy in melanoma, *The lancet oncology* (Band 13), Nr. 6, Seite 561-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575587>
- [40] Jahanshahi, P.; Nasr, N.; Unger, K.; Batouli, A. und Gagnon, G. J. (2012): Malignant melanoma and radiotherapy: past myths, excellent local control in 146 studied lesions at Georgetown University, and improving future management, *Frontiers in oncology* (Band 2), Seite 167. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162795>
- [41] Kettelhack, C.; Hohenberger, P. und Schlag, P. M. (1997): [Isolated hyperthermic limb perfusion with melphalan and tumor necrosis factor in malignant melanoma], *Deutsche medizinische Wochenschrift* (Band 122), Nr. 7, Seite 177-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072487>
- [42] Li, J.; Wang, P.; Zhu, X. J.; Song, J. G. und Song, J. M. (2012): [Isolated limb hyperthermic perfusion chemotherapy for melanoma of the extremities], *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* (Band 34), Nr. 12, Seite 937-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336382>
- [43] Romics, L., Jr.; Dy, E. A.; Coffey, J. C.; Herlihy, D.; Aftab, F.; Chaudhry, M. Z.; Fogarty, K.; O'Donnell, J. A. und Redmond, H. P. (2011): Initial experiences with isolated limb perfusion for unresectable melanoma of the limb, *Irish*

- journal of medical science (Band 180), Nr. 2, Seite 517-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287291>
- [44] Boesch, C. E.; Meyer, T.; Waschke, L.; Merkel, S.; Goehl, J.; Hohenberger, W. und Knorr, C. (2010): Long-term outcome of hyperthermic isolated limb perfusion (HILP) in the treatment of locoregionally metastasised malignant melanoma of the extremities, International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group (Band 26), Nr. 1, Seite 16-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100048>
- [45] Creech, O., Jr.; Krementz, E. T.; Ryan, R. F. und Winblad, J. N. (1958): Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit, Annals of surgery (Band 148), Nr. 4, Seite 616-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13583933>
- [46] Grunhagen, D. J.; de Wilt, J. H.; van Geel, A. N. und Eggermont, A. M. (2006): Isolated limb perfusion for melanoma patients--a review of its indications and the role of tumour necrosis factor-alpha, European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology (Band 32), Nr. 4, Seite 371-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520016>
- [47] Deroose, J. P.; Eggermont, A. M.; van Geel, A. N.; de Wilt, J. H.; Burger, J. W. und Verhoef, C. (2012): 20 years experience of TNF-based isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: TNF dose matters, Annals of surgical oncology (Band 19), Nr. 2, Seite 627-35. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21879272>
- [48] Verhoef, C.; de Wilt, J. H.; Grunhagen, D. J.; van Geel, A. N.; ten Hagen, T. L. und Eggermont, A. M. (2007): Isolated limb perfusion with melphalan and TNF-alpha in the treatment of extremity sarcoma, Current treatment options in oncology (Band 8), Nr. 6, Seite 417-27. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18066703>
- [49] van Horssen, R.; Ten Hagen, T. L. und Eggermont, A. M. (2006): TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility, The oncologist (Band 11), Nr. 4, Seite 397-408. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614236>

- [50] Wysocki, P. J.; Karczewska-Dzionk, A.; Mackiewicz-Wysocka, M. und Mackiewicz, A. (2004): Human cancer gene therapy with cytokine gene-modified cells, *Expert opinion on biological therapy* (Band 4), Nr. 10, Seite 1595-607. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15461571>
- [51] Nishikawa, M. und Hashida, M. (2002): Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy, *Biological & pharmaceutical bulletin* (Band 25), Nr. 3, Seite 275-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11913519>
- [52] Verma, I. M. und Somia, N. (1997): Gene therapy -- promises, problems and prospects, *Nature* (Band 389), Nr. 6648, Seite 239-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305836>
- [53] Lundstrom, K. (2003): Latest development in viral vectors for gene therapy, *Trends in biotechnology* (Band 21), Nr. 3, Seite 117-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628368>
- [54] Walther, W. und Stein, U. (2000): Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases, *Drugs* (Band 60), Nr. 2, Seite 249-71. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983732>
- [55] Thomas, C. E.; Ehrhardt, A. und Kay, M. A. (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nature reviews. Genetics* (Band 4), Nr. 5, Seite 346-58. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728277>
- [56] Niidome, T. und Huang, L. (2002): Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene therapy* (Band 9), Nr. 24, Seite 1647-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457277>
- [57] Choi, Y.; Jeon, Y. H.; Kang, J. H.; Chung, J. K.; Schmidt, M. und Kim, A. C. (2007): MIDGE/hNIS vaccination generates antigen-associated CD8+IFN-gamma+ T cells and enhances protective antitumor immunity, *International journal of cancer. Journal international du cancer* (Band 120), Nr. 9, Seite 1942-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266027>
- [58] Schakowski, F.; Gorschluter, M.; Buttgereit, P.; Marten, A.; Lilienfeld-Toal, M. V.; Junghans, C.; Schroff, M.; Konig-Merediz, S. A.; Ziske, C.; Strehl, J.; Sauerbruch, T.; Wittig, B. und Schmidt-Wolf, I. G. (2007): Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression in vivo, *In vivo* (Band 21), Nr. 1, Seite 17-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17354609>

- [59] King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J. (2012): Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Inc., London, ISBN: 978-0-12-384684-6.
- [60] Saito, T. und Nakatsuji, N. (2001): Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation, *Developmental biology* (Band 240), Nr. 1, Seite 237-46. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784059>
- [61] Miller, D. L.; Pislaru, S. V. und Greenleaf, J. E. (2002): Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation, *Somatic cell and molecular genetics* (Band 27), Nr. 1-6, Seite 115-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774945>
- [62] Yang, N. S.; Burkholder, J.; Roberts, B.; Martinell, B. und McCabe, D. (1990): In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 87), Nr. 24, Seite 9568-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2175906>
- [63] Sawamura, D.; Ina, S.; Itai, K.; Meng, X.; Kon, A.; Tamai, K.; Hanada, K. und Hashimoto, I. (1999): In vivo gene introduction into keratinocytes using jet injection, *Gene therapy* (Band 6), Nr. 10, Seite 1785-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516730>
- [64] Walther, W.; Siegel, R.; Kobelt, D.; Knosel, T.; Dietel, M.; Bembenek, A.; Aumann, J.; Schleef, M.; Baier, R.; Stein, U. und Schlag, P. M. (2008): Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (Band 14), Nr. 22, Seite 7545-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010873>
- [65] Gonin, P. und Gaillard, C. (2004): Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development, *Gene therapy* (Band 11 Suppl 1), Seite S98-S108. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454964>
- [66] Lovatt, A. (2002): Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products, *Journal of biotechnology* (Band 82), Nr. 3, Seite 279-300. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999695>

- [67] Bragonzi, A.; Dina, G.; Villa, A.; Calori, G.; Biffi, A.; Bordignon, C.; Assael, B. M. und Conese, M. (2000): Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs, *Gene therapy* (Band 7), Nr. 20, Seite 1753-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083497>
- [68] Sugimoto, M.; Watanabe, M.; Kaku, H.; Li, S. A.; Noguchi, H.; Ueki, H.; Sakaguchi, M.; Huh, N. H.; Nasu, Y. und Kumon, H. (2012): Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy, *Oncology reports* (Band 28), Nr. 5, Seite 1645-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941469>
- [69] Bureau, M. F.; Naimi, S.; Torero Ibad, R.; Seguin, J.; Georger, C.; Arnould, E.; Maton, L.; Blanche, F.; Delaere, P. und Scherman, D. (2004): Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation, *Biochimica et biophysica acta* (Band 1676), Nr. 2, Seite 138-48. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14746908>
- [70] Wolff, J. A. und Budker, V. (2005): The mechanism of naked DNA uptake and expression, *Advances in genetics* (Band 54), Seite 3-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096005>
- [71] Walther, W.; Minow, T.; Martin, R.; Fichtner, I.; Schlag, P. M. und Stein, U. (2006): Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral in vivo jet injection, *Human gene therapy* (Band 17), Nr. 6, Seite 611-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776570>
- [72] Bloquel, C.; Fabre, E.; Bureau, M. F. und Scherman, D. (2004): Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications, *The journal of gene medicine* (Band 6 Suppl 1), Seite S11-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978747>
- [73] Cui, Z.; Baizer, L. und Mumper, R. J. (2003): Intradermal immunization with novel plasmid DNA-coated nanoparticles via a needle-free injection device, *Journal of biotechnology* (Band 102), Nr. 2, Seite 105-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697387>
- [74] Walther, W.; Stein, U. und Lage, H. (2010): Jet-injection of short hairpin RNA-encoding vectors into tumor cells, *Methods in molecular biology* (Band 629), Seite 123-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387147>

- [75] Omori-Urabe, Y.; Yoshii, K.; Ikawa-Yoshida, A.; Kariwa, H. und Takashima, I. (2011): Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus induces protective immunity in mice, *Microbiology and immunology* (Band 55), Nr. 12, Seite 893-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004565>
- [76] Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B. und Behr, J. P. (1995): A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 92), Nr. 16, Seite 7297-301. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638184>
- [77] Grigsby, C. L. und Leong, K. W. (2010): Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* (Band 7 Suppl 1), Seite S67-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734186>
- [78] Prigodich, A. E.; Alhasan, A. H. und Mirkin, C. A. (2011): Selective enhancement of nucleases by polyvalent DNA-functionalized gold nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society* (Band 133), Nr. 7, Seite 2120-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21268581>
- [79] Mir, L. M.; Bureau, M. F.; Rangara, R.; Schwartz, B. und Scherman, D. (1998): Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle, *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* (Band 321), Nr. 11, Seite 893-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879468>
- [80] Herweijer, H.; Zhang, G.; Subbotin, V. M.; Budker, V.; Williams, P. und Wolff, J. A. (2001): Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver, *The journal of gene medicine* (Band 3), Nr. 3, Seite 280-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11437333>
- [81] Herrero, M. J.; Monleon, D.; Morales, J. M.; Mata, M.; Serna, E. und Alino, S. F. (2011): Analysis of metabolic and gene expression changes after hydrodynamic DNA injection into mouse liver, *Biological & pharmaceutical bulletin* (Band 34), Nr. 1, Seite 167-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212539>

- [82] Maruyama, H.; Higuchi, N.; Nishikawa, Y.; Kameda, S.; Iino, N.; Kazama, J. J.; Takahashi, N.; Sugawa, M.; Hanawa, H.; Tada, N.; Miyazaki, J. und Gejyo, F. (2002): High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection, *The journal of gene medicine* (Band 4), Nr. 3, Seite 333-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112650>
- [83] Maruyama, H.; Higuchi, N.; Nishikawa, Y.; Hirahara, H.; Iino, N.; Kameda, S.; Kawachi, H.; Yaoita, E.; Gejyo, F. und Miyazaki, J. (2002): Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats, *Human gene therapy* (Band 13), Nr. 3, Seite 455-68. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860712>
- [84] Walther, W.; Stein, U.; Fichtner, I.; Malcherek, L.; Lemm, M. und Schlag, P. M. (2001): Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology, *Gene therapy* (Band 8), Nr. 3, Seite 173-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313788>
- [85] Walther, W.; Stein, U.; Fichtner, I.; Voss, C.; Schmidt, T.; Schleef, M.; Nellessen, T. und Schlag, P. M. (2002): Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer, *Molecular biotechnology* (Band 21), Nr. 2, Seite 105-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059110>
- [86] Liu, F.; Shollenberger, L. M.; Conwell, C. C.; Yuan, X. und Huang, L. (2007): Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection, *The journal of gene medicine* (Band 9), Nr. 7, Seite 613-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534886>
- [87] Renia, L.; Wu Howland, S.; Claser, C.; Charlotte Gruner, A.; Suwanarusk, R.; Hui Teo, T.; Russell, B. und Ng, L. F. (2012): Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier, *Virulence* (Band 3), Nr. 2, Seite 193-201. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460644>
- [88] Mukai, H.; Kawakami, S.; Takahashi, H.; Satake, K.; Yamashita, F. und Hashida, M. (2010): Key physiological phenomena governing transgene expression based on tissue pressure-mediated transfection in mice, *Biological & pharmaceutical bulletin* (Band 33), Nr. 9, Seite 1627-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823586>
- [89] Jiang, J.; Yamato, E. und Miyazaki, J. (2001): Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression, *Biochemical and biophysical*

- research communications (Band 289), Nr. 5, Seite 1088-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741303>
- [90] Glover, D. J.; Lipps, H. J. und Jans, D. A. (2005): Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans, *Nature reviews. Genetics* (Band 6), Nr. 4, Seite 299-310. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761468>
- [91] Walther, W.; Arlt, F.; Fichtner, I.; Aumann, J.; Stein, U. und Schlag, P. M. (2007): Heat-inducible in vivo gene therapy of colon carcinoma by human *mdr1* promoter-regulated tumor necrosis factor-alpha expression, *Molecular cancer therapeutics* (Band 6), Nr. 1, Seite 236-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237282>
- [92] Lejeune, F.; Lienard, D.; Eggermont, A.; Schraffordt Koops, H.; Rosenkaimer, F.; Gerain, J.; Klaase, J.; Kroon, B.; Vanderveken, J. und Schmitz, P. (1994): Rationale for using TNF alpha and chemotherapy in regional therapy of melanoma, *Journal of cellular biochemistry* (Band 56), Nr. 1, Seite 52-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806592>
- [93] Laurenzi, L.; Natoli, S.; Di Filippo, F.; Calamaro, A.; Centulio, F.; Anza, M.; Cavaliere, F.; Marcelli, M. E.; Garinei, R. und Arcuri, E. (2004): Systemic and haemodynamic toxicity after isolated limb perfusion (ILP) with TNF-alpha, *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* (Band 23), Nr. 2, Seite 225-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15354406>
- [94] Gu, C.; Zhang, J.; Chen, Y. und Lei, J. (2011): A trigger model of apoptosis induced by tumor necrosis factor signaling, *BMC systems biology* (Band 5 Suppl 1), Seite S13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689472>
- [95] Engwerda, E. E.; Abbink, E. J.; Tack, C. J. und de Galan, B. E. (2011): Improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rapid-acting insulin using needle-free jet injection technology, *Diabetes care* (Band 34), Nr. 8, Seite 1804-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715522>
- [96] Saini, A.; Al-Shanti, N.; Faulkner, S. H. und Stewart, C. E. (2008): Pro- and anti-apoptotic roles for IGF-I in TNF-alpha-induced apoptosis: a MAP kinase mediated mechanism, *Growth factors* (Band 26), Nr. 5, Seite 239-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651291>

8. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Publikation

Galling, N.; Kobelt, D.; Aumann, J.; Schmidt, M.; Wittig, B.; Schlag, P. M. und Walther, W. (2012): Intratumoral dispersion, retention, systemic biodistribution and clearance of a small-size TNF-alpha expressing MIDGE vector following nonviral in vivo jet-injection gene transfer, Human gene therapy methods. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075108>

10. ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nele Ruth Galling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Intratumorale Verteilung, systemische Biodistribution und Clearance eines TNF α exprimierenden MIDGE Vektors nach nicht-viraler in vivo Jet-Injektion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Nele Ruth Galling hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Galling, N.; Kobelt, D.; Aumann, J.; Schmidt, M.; Wittig, B.; Schlag, P. M. und Walther, W.: Intratumoral dispersion, retention, systemic biodistribution and clearance of a small-size TNF-alpha expressing MIDGE vector following nonviral in vivo jet-injection gene transfer, Human gene therapy methods. 2012.

Beitrag im Einzelnen: Erstautorin

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

11. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Schlag und Prof. Dr. W. Walther für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen bedanken.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. W. Walther für seine Unterstützung, welche den rein wissenschaftlichen Aspekt dieser Dissertationsarbeit weit überstieg.

Ich möchte mich außerdem bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern meiner Forschungsgruppe bedanken. Dennis Kobelt und Jutta Aumann gilt mein besonderer Dank für ihre ununterbrochene wissenschaftliche und technische Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Karola Galling und Manuel Scholz für ihre bedingungslose Unterstützung und Begleitung durch all die persönlichen Hochs und Tiefs während der Entstehung dieser Arbeit.