

Aus der Klinik für Neurochirurgie und dem
Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Intratumorale Gabe von Interleukin-1 β und Interferon- γ im
Rattengliommodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Amelunxen (geb. Frewert)

aus Paderborn

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Woiciechowsky
2. Prof. Dr. med. P. Vajkoczy
3. Prof. Dr. med. J. Vesper

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Primäre Hirntumore: allgemeiner Überblick.....	5
1.1.1 Maligne Gliome.....	5
1.2 Tumorimmunologie.....	8
1.3 Immuntherapie.....	10
1.4 Zytokine.....	12
1.4.1 Interleukin-1beta.....	13
1.4.2 Interferon- γ	16
1.5 Zytokine in der Glioblastombehandlung.....	18
1.6 Problemstellung.....	19
2 Methodik.....	21
2.1 Versuchsplan.....	21
2.2 Versuchstiere.....	22
2.3 Tumorzellen.....	22
2.3.1 Tumorzelllinie.....	22
2.3.2 Herstellung der Zelllösung.....	23
2.3.3 Zählung der Tumorzellen.....	23
2.3.4 Tumorzellinjektion.....	23
2.4 MRT-Aufnahmen.....	25
2.5 Zytokininfusion.....	25
2.5.1 Pumpensysteme.....	25
2.5.2 Pumpenfüllung.....	26
2.5.3 Pumpenimplantation.....	26
2.5.4 Pumpenentnahme in der Überlebensstudie.....	27
2.6 Gehirnentnahme.....	27
2.7 Gefrierschnitte.....	27
2.8 Immunhistologie.....	28
2.8.1 Primärantikörper.....	28
2.8.2 Sekundärantikörper (Vektor).....	32
2.8.3 Blocklösung.....	33

2.8.4 Avidin-Biotin-Komplex (ABC).....	33
2.8.5 Stammlösungen und Puffer.....	33
2.8.6 ABC-Färbung für monoklonale Antikörper mit Vektor-Sekundärantikörper....	34
2.9 Zählung der Immunzellen.....	37
2.10 Flächenbestimmung.....	37
3 Ergebnisbeschreibung.....	39
3.1 Versuchsreihe I.....	39
3.1.1 Immunzellverifizierung mittels immunhistochemischer Verfahren.....	39
3.1.2 Einwirkung der Zytokininfusion auf die TumorgroÙe.....	58
3.2 Versuchsreihe II – Überlebensstudie.....	59
4 Diskussion.....	63
4.1 CED als Applikationsart.....	63
4.2 Immunzelleinwanderung nach Zytokingabe.....	64
4.2.1 Infusion von IL-1 β	66
4.2.2 Infusion von IFN- γ	68
4.3 Tumorregression.....	69
4.4 Überlebenszeit.....	73
5 Zusammenfassung.....	76
6 Literaturverzeichnis.....	78

1 Einleitung

1.1 Primäre Hirntumore: allgemeiner Überblick

Primäre Hirntumore sind bösartige Neubildungen des Gehirns und der Meningen. Ihre Inzidenz beträgt 10/100.000/Jahr und es kommt zu ca. 7600 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr und im Kindesalter. Die Tumorentstehung wird durch Fehlregulationen von Genen (Onkogene, Tumorsuppressorgene), die Wachstum und Zelldifferenzierung steuern, verursacht. Konkrete Risikofaktoren wie Chemikalien, Viren und andere Karzinogene, wie bei anderen Tumorerkrankungen häufig bekannt, konnten bisher nicht mit der Entstehung von Hirntumoren in Verbindung gebracht werden (Berlit *et al.* 2006, Gleixner *et al.* 2002).

Die heutige Klassifikation der Hirntumore beruht auf der internationalen Einteilung durch die *World Health Organisation* (WHO) aufgrund der histologischen Morphologie. Die Zelldifferenzierung sowie Entwicklungsgeschichte des ZNS spielen hier eine Rolle. Insbesondere der Grad der Anaplasie trägt zur Malignitätsbestimmung bei (Kleihues *et al.* 1993).

Grad I und II zeichnen sich durch ein eher langsames Wachstum aus, während bei Grad III und IV mit einem schnellen invasiven Wachstum und starken perifokalen Ödem zu rechnen ist, wodurch die Überlebenszeit stark reduziert ist (Kleihues *et al.* 1993, Klingelhöfer *et al.* 2001). Unabhängig von dieser Dignität sind die intrakraniellen Komplikationen bestimmt durch Massenverschiebungen und Herniationen, der Einschränkung von Durchblutung und Liquorzirkulation, sowie der direkten oder indirekten Beeinträchtigung der vitalen Funktionen in Hypothalamus und Hirnstamm. (Berlit *et al.* 2006)

1.1.1 Maligne Gliome

Neuroepitheliale Tumoren – auch als Gliome zusammengefasst – machen mit ca. 50 % den größten Anteil unter den Hirntumoren aus. Zu ihnen gehören mit einem größeren

Anteil Astrozytome und Glioblastome, aber auch Oligodendrogliome, Medulloblastome, Neurinome, Gangliozytome und -blastome, Spongioblastome, Ependymome, Plexustumoren und Pinealome, benannt nach den jeweils entarteten Zellreihen (Gleixner *et al.* 2002).

1.1.1.1 Astrozytome

Etwa 25% der Hirntumoren sind Astrozytome und stellen somit den häufigsten primären Hirntumor dar. Unter Astrozytomen versteht man Tumoren aus der Reihe der Neurogliazellen. Astrozyten sind die größten Gliazellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Zellfortsätzen. Sie bilden das Stützwerk des Nervengewebes. Astrozytome wachsen entlang der Marklagerbahnen und infiltrieren weit ins umliegende Gewebe. Am häufigsten findet man Astrozytome im Frontal- und Temporallappen.

Die Einteilung der Astrozytome erfolgt nach histologischen Kriterien nach der WHO:

- Grad I – pilozytisches Astrozytom
- Grad II – niedriggradiges Astrozytom
- Grad III – anaplastisches Astrozytom
- Grad IV – Glioblastoma multiforme

Ein Astrozytom Grad IV entspricht dabei histologisch einem Glioblastoma multiforme. Ein Übergang niedriger Grade in ein Glioblastom ist möglich. Eine Entartung erfolgt mit einem Gipfel um das 40. Lebensjahr. Grad I und Grad II betreffen insbesondere das mittlere Lebensalter, Grad III und Grad IV das höhere Lebensalter. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Trotz operativer Eingriffe, Radiotherapie und Chemotherapie sind die Heilungschancen bei höhergradigen Astrozytomen eher gering. Die 5-Jahresüberlebensrate (JÜR) beträgt bei Grad I noch über 90%, bei Grad II 50%, bei Grad III nur noch 5%. Bei niedrig malignen Astrozytomen ist auch eine Dauerheilung möglich. Die Rezidivrate ist hoch, auch nach Jahrzehnten können Rezidive auftreten. (Berlit *et al.* 2006, Gleixner *et al.* 2002)

1.1.1.2 Glioblastome

Unter einem Glioblastom versteht man ein Astrozytom Grad IV nach WHO, auch Glioblastoma multiforme, bzw. entdifferenziertes Glioblastom, Gliosarkom oder Schmetterlingsgliom (aufgrund der Lokalisation beidseits im Marklager) genannt. Das Glioblastom ist mit einem Anteil von ca. 15% an allen primären Hirntumoren, der am häufigsten vorkommende maligne Hirntumor beim Erwachsenen (Berlit *et al.* 2006, Davis *et al.* 1999). Es handelt sich um einen hoch malignen Hirntumor mit sehr raschem Wachstum, Bildung von neuen Gefäßen und arteriovenösen Anastomosen, sowie starker Neigung zum perifokalem Hirnödem (Abbildung 1). Dies führt zu einem schnellen Anstieg des Hirndrucks und Massenverschiebungen. Histologisch zeigt sich ein vielgestaltiges Bild mit Zellpolymorphie, mehrkernigen Riesenzellen, Nekrosen, Blutungen und zystischen Tumorzerfallshöhlen.

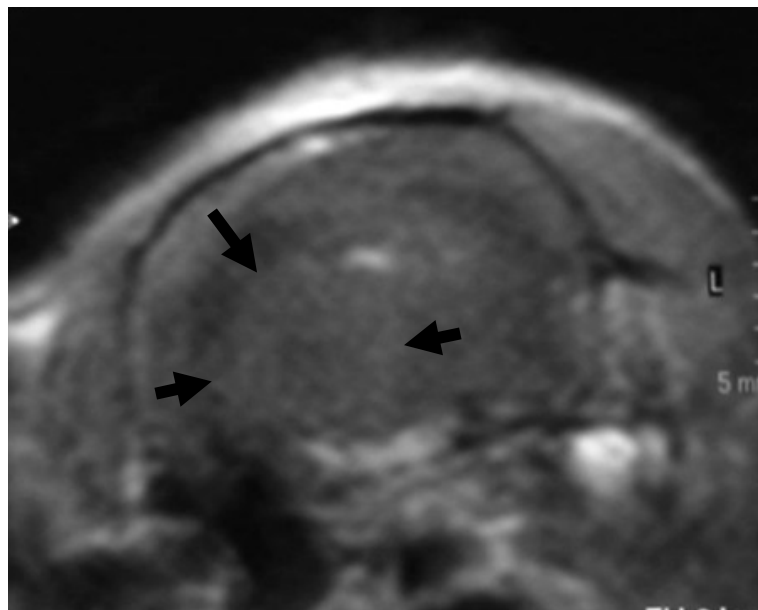


Abbildung 1 Mittels Magnetresonanztomographie (T1 gewichtet) wird hier ein Glioblastom der Ratte, welches nach intrazerebraler Injektion von Tumorzellen ins Rattenhirn erzeugt wurde, dargestellt. Der Tumor ist nach Gabe von Kontrastmittel in der linken Hemisphäre gut erkennbar. Ebenfalls deutlich zeigt sich das umliegende Ödem, welches gemeinsam mit dem Tumor die Mittellinienverlagerung bedingt. Zentral hypodens sind nekrotische Veränderungen sichtbar.

Klinisch nimmt das Beschwerdebild kurzfristig innerhalb von Wochen bis Monaten zu. Kopfschmerzen, Hemiparesen, zerebrale Herdsymptome und Krampfanfälle sowie

Bewusstseinsstörungen kennzeichnen das Krankheitsbild. Die Prognose ist trotz aller durchgeführten aggressiven Therapien (Operation, Radiatio, Chemotherapie) sehr schlecht (Berlit *et al.* 2006). Die 5-JÜR liegt bei nahezu 0% (Gleixner *et al.* 2002). Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt bei 9 bis 12 Monaten. Auch bei radikal entfernten Glioblastomen kommt es fast ausnahmslos zum Rezidiv (Castro *et al.* 2003).

1.2 Tumorimmunologie

Die Erforschung der Tumorimmunologie lässt sich bis zu Paul Ehrlich (1854 – 1915) zurückverfolgen, der die These aufstellte, dass es beim Menschen mit hoher Frequenz anomale Keime gibt, die uns bei einer fehlenden Überwachung durch das Immunsystem überwältigen würden (Ehrlich 1909). In den 1950ern stellte Burnet (1899 – 1985) seine Theorie der Immunüberwachung vor, nach welcher das Immunsystem in der Lage sei, abnorme Zellen zu erkennen und zu zerstören (Burnet 1970). Heute weiß man, dass Tumoren Antigene vorweisen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können und so eine Immunantwort auszulösen in der Lage sind. Leider funktioniert diese Überwachung durch das Immunsystem häufig nicht und insbesondere das Tumorwachstum wird nicht ausreichend eingeschränkt. Einer der postulierten Gründe ist die große Ähnlichkeit der Tumorzellen zu normalen Körperzellen, aus denen sich diese entwickelten. Ein anderer Grund mag die hohe Tumorzellwachstumsrate sein, die die Kapazitäten des Immunsystems überfordert. Weiterhin sind spezielle Mechanismen bekannt, wie Tumorzellen einer möglichen Immunantwort auszuweichen vermögen (Abbas *et al.* 2003).

Insbesondere in *in vitro* Studien, aber auch in tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass zellvermittelte und humorale Immunreaktionen zum Abtöten von Tumorzellen führten. Der Hauptmechanismus der Immunreaktion gegen Tumorzellen ist das Abtöten von Tumorzellen durch CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten. Diese Lymphozyten sind in der Lage über MHC-Klasse-I präsentierte mutierte zelluläre Peptide (Tumorassoziierte Antigene = TAA) zu erkennen und die malignen Zellen mittels Lyse zu töten. Inzwischen konnten unterschiedliche Arten von Tumorantigenen

nachgewiesen werden, die von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden können (Van den Eynde 1997; Jäger *et al.* 2001).

Desweiteren sind CD4+ T-Helfer-Zellen zur Bereitstellung von Zytokinen im Rahmen der Immunantwort wichtig. Insbesondere TNF- α und IFN- γ werden so ausgeschüttet und rufen die Präsentation von MHC-Klasse-I Molekülen auf Tumorzellen hervor und machen diese für zytotoxische T-Zellen empfindlicher. Auch für die Aktivierung von CD8+ Zellen spielen CD4+ Zellen eine wichtige Rolle (Zeng 2001).

Ein weiterer wichtiger Zelltyp des Immunsystems sind die NK-Zellen, die viele Arten von Tumorzellen abtöten können, insbesondere die Zellen, die die Präsentation von MHC-Klasse-I Molekülen reduzieren konnten und somit nicht von zytotoxischen T-Zellen entdeckt werden. In bestimmten Bereichen des Körpers, wie im ZNS präsentieren Zellen nur auf einem niedrigen Niveau MHC-Klasse-I Moleküle. Das Vorhandensein von MHC-Klasse-I Molekülen führt zur Hemmung von NK-Zellen, so dass deren Verlust wiederum die Tumorzellen zu einem guten Ziel für NK-Zellen macht (Ikeda *et al.* 1997; Janeway *et al.* 2005). In der Stimulation von NK-Zellen spielen Zytokine (Interferone und Interleukine wie IL-2 und IL-12) eine wichtige Rolle (Perussia 1991; Heberman 2002).

Potente T-Zell-Aktivatoren sind dendritische Zellen. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte Makrophagen wichtig für die Anti-Tumor Immunität sind. In *in vitro* Studien konnten aktivierte Makrophagen Tumorzellen sehr viel effizienter als normale Zellen abtöten (Cox 2001; Abbas *et al.* 2003). Das von T-Zellen produzierte IFN- γ trägt zur Aktivierung bei. Desweiteren produzieren Makrophagen TNF- α , welches unter anderem über eine Thrombosierung der Tumorgefäße zu einem Abtöten von Tumorzellen führen kann (Watanabe *et al.* 1988; Mauceri *et al.* 2002).

Wie erwähnt verfügen viele Tumorzellen über Mechanismen einer Immunantwort zu entgehen. Eine Möglichkeit ist, dass Tumorzellen die Präsentation von MHC-Klasse-I Molekülen herunterregulieren können und somit nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden (Abbas *et al.* 2003; Goldsby *et al.* 2003; Roitt *et al.* 1995). In experimentellen Studien konnte man über die Gabe von IFN- γ mittels Gentransfer eine Hochregulation von MHC-Klasse-I erreichen und somit eine über zytotoxische Zellen

vermittelte Lyse nachweisen (Gattoni 2006). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass kostimulierende Substanzen oder die zur Aktivierung von T-Helfer-Zellen nötigen MHC-Klasse-II Moleküle nicht produziert werden. Dies wiederum verhindert die Differenzierung von zytotoxischen Lymphozyten (Zeng 2001; Abbas *et al.* 2003). Ein weiterer Punkt ist der, dass Tumoren die Möglichkeit der Präsentation von Antigenen, die eine Immunreaktion hervorrufen, verlieren können. Insbesondere bei schnell wachsenden Tumoren mit hoher Mutationsrate ist dies häufig der Fall. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das Immunsystem Tumorantigene toleriert oder diese über Moleküle maskiert werden. So können Antikörper selbst an Tumorantigene binden und diese für T-Zellen blockieren (Ochsenbein 2002; Ochsenbein 2005; Abbas *et al.* 2003; Goldsby *et al.* 2003). Einige Tumore schütten selbst immunsupprimierende Substanzen aus. Tumor-growth-factor- β (TGF- β) hemmt zum Beispiel Wachstum und Funktion von Lymphozyten und Makrophagen (Torre-Amione *et al.* 1990). Glioblastome sezernieren Faktoren (z. B. TGF- β 2 und PGE2), welche die Immunreaktion über zytotoxische T-Zellen hemmen (Sawamura *et al.* 1990; Platten *et al.* 2001). Andere Tumoren sind in der Lage direkte physikalische Barrieren zu bilden, indem sie Kollagen oder Fibrin produzieren und sich so vor dem Immunsystem verstecken (Janeway *et al.* 2005).

1.3 Immuntherapie

Die heutzutage gegen Tumoren eingesetzten Behandlungen, wie übliche Chemotherapie und Bestrahlung, die in der Zellteilung und Vermehrung ansetzen, bringen leider den Nebeneffekt mit, dass auch die sich normal vermehrenden Zellen des Erkrankten angegriffen werden. Das Ziel wäre im Rahmen der Immunantwort gegen den Tumor zwischen Tumorzellen und normalen Körperzellen zu unterscheiden. Hier hätte die Immuntherapie den Vorteil, dass spezifisch die Zellen, die Tumorantigene präsentieren, angegriffen würden und andere Zellen nicht betroffen wären (Abbas *et al.* 2003).

Ansätze der Immuntherapie in Form von Impfungen wurden getestet, indem zum Beispiel gereinigte Tumorantigene verabreicht wurden oder entnommene Immunzellen nach Inkubation mit Tumorantigenen injiziert wurden. Die über MHC-Klasse-I

präsentierten Tumorantigene können so zytotoxische Lymphozyten aktivieren. Hierbei ist es jedoch schwer im Sinne einer therapeutischen Impfung eine ausreichend starke Immunantwort gegen alle Zellen des bereits wachsenden Tumors zu bewirken (Jäger *et al.* 2001; Abbas *et al.* 2003).

Eine weitere therapeutisch schon genutzte Behandlungsmöglichkeit ist die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen für einen Tumor spezifische Antigene (Carter 2001). Die Antikörper binden sich an die Tumorzelle und diese wird so dem Immunsystem präsentiert. So kann die Tumorzelle zum Beispiel über die Aktivierung von NK-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen abgetötet werden. Die Konjugation von Toxinen oder Radioisotopen mit Antikörpern wäre eine weitere effektive immuntherapeutische Behandlung (White *et al.* 2001; Abbas *et al.* 2003; Janeway *et al.* 2005).

Ein großer Forschungs- und Behandlungsbereich der Immuntherapie umfasst den Einsatz von Zytokinen, um eine ausreichende Immunantwort gegen Tumoren hervorzurufen. Viele Zytokine unterstützen die Aktivierung von Tumorspezifischen T-Zellen – insbesondere den CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten. Auch eine unspezifische inflammatorische Antwort kann mittels Zytokinen hervorgerufen werden. In tierexperimentellen gentechnischen Studien konnte mit IL-2, IL-4, IFN- γ oder GM-CSF ein rückläufiges Tumorwachstum beobachtet werden. Bei unterschiedlichen Zytokinen wurden unterschiedliche Mechanismen zur Stimulation der Antitumorimmunität nachgewiesen (Pardoll 1995; Terres *et al.* 1998; Rodrigues *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2007; Ojima *et al.* 2007).

Zytokine wurden bereits systemisch angewandt. In den bisher größten klinischen Studien wurde IL-2 in hohen Dosen verabreicht. Es wurde nachgewiesen, dass T- und B-Lymphozyten des Blutes sowie NK-Zellen zahlreicher vorhanden waren und die Konzentration von TNF, IL-1 and IFN- γ anstieg. Leider sind die therapeutischen Möglichkeiten aufgrund der stark toxischen Nebenwirkungen begrenzt (Pardoll 1995). Durch Veränderungen am Gefäßendothel und anderen Zellen kam es unter anderem zu Fieber bis hin zum Lungenödem und vaskulärem Schock. Aufgrund der nachgewiesenen Tumorregression wird IL-2 jedoch bei Melanomen und Nierenzellkarzinomen in der Klinik therapeutisch eingesetzt (Yang *et al.* 1997). Auch

INF- α kann in der Therapie von Melanomen und leukämischen Erkrankungen angewandt werden (Nohria *et al.* 1994; Huber *et al.* 2004).

1.4 Zytokine

Der Begriff Zytokine wird meist als generelle Bezeichnung für lösliche Proteine und Peptide verwendet, die als chemische Mediatoren biologisch wirksam werden und die Interaktion zwischen einer Reihe unterschiedlicher Zellen vermitteln und regulieren. Zu den Zytokinen gehören unter anderem die vor allem von Leukozyten sezernierten Interleukine (IL), die besonders von Lymphozyten sezernierten Lymphokine, die vor allem von Monozyten sezernierten Monokine, die einzelnen Interferone (IFN), die koloniestimulierenden Faktoren (CSF) und eine Reihe anderer Proteine.

Die meisten Zytokine werden häufig nur von zuvor aktivierten Zellen als Reaktion auf ein Induktionssignal hin synthetisiert. Diese Zellaktivierung wird häufig selbst durch Zytokine verursacht. Die Zytokinwirkung erfolgt über spezifische Membranrezeptoren. Zytokin-Rezeptoren existieren häufig in hochaffinen und niedrigaffinen Varianten und werden auf praktisch allen Zelltypen des Körpers exprimiert. Aufgrund der hohen Affinität sind oft schon nano- und picomolare Konzentrationen wirksam. Viele Zytokine wirken sowohl stimulierend als auch inhibierend und zeigen untereinander synergistische oder auch antagonistische Wirkungen. In einigen Fällen kann dasselbe Zytokin unter veränderten Bedingungen die entgegengesetzte Wirkung zeigen. Insbesondere die zeitliche Reihenfolge, in der einzelne Zytokine wirksam werden, die Dosis und die Kombination von unterschiedlichen Zytokinen sind hier wichtig.

Zytokine spielen im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Immunantwort, bei Entzündungsreaktionen, bei der Hämatopoiese und bei generellen systemischen Reaktionen auf Organ- und Gewebeverletzungen. Immer deutlicher wird auch die Beteiligung an neuroimmunologischen, neuroendokrinen und neuoregulatorischen Prozessen (Ibelgauffs 1992; Trotta 1991; Arai *et al.* 1990).

In der vorliegenden Arbeit werden die proinflammatorischen Effekte von IL-1 β und IFN- γ nach intratumoralen Gabe am Rattenglioblastommodell untersucht, sowie die Wirkung der eingewanderten Immunzellen auf das Tumorstadium.

1.4.1 Interleukin-1beta

Interleukin-1beta (IL-1 β) mit einem Molekulargewicht von 17kDa bildet mit Interleukin-1alpha eine der beiden funktionell gleichwertigen Hauptformen von Interleukin-1, welche von unterschiedlichen Genen codiert werden. Die Hauptmenge des sezernierten Interleukins ist IL-1 β . Beide Proteine zeigen nur einen geringen Grad an Homologie. Sie werden aus einem Vorläuferprotein durch proteolytische Spaltung vor und nach der Sekretion gebildet. IL-1 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, Monozyten und peripheren Neutrophilen gebildet. In geringeren Mengen erfolgt die Sekretion unter anderem auch von Endothel-Zellen, Fibroblasten, Osteoklasten, Astrozyten, Mikroglia, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Die Konzentration von IL-1 in der Zerebrospinalflüssigkeit beruht einerseits auf der lokalen Synthese und andererseits auf dem direkten Transport durch die Blut-Hirn-Schranke und der Fähigkeit aktivierter T-Lymphozyten, diese Schranke zu passieren. Die Synthese von IL-1 kann durch natürlich vorkommende Inhibitoren kontrolliert werden. IL-1 receptor antagonist (ra) antagonisiert als kompetitiv wirkender Inhibitor die Wirkung von IL-1. IL-1ra wird von den gleichen Zellen sezerniert, die auch IL-1 exprimieren. Lipoproteine, Lipide und α_2 -Macroglobulin hemmen ebenfalls die IL-1 Synthese (Ibelgaufts 1992; diGiovine *et al.* 1990; Dinarello 1991).

Zur Bindung von IL-1 existieren zwei Hauptformen von Rezeptoren. Das als Typ I-Rezeptor bezeichnete Rezeptorprotein wird hauptsächlich auf T-Zellen und Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert und bindet mit gleicher Affinität IL-1 α und IL-1 β . Das Typ II-Rezeptorprotein wird hauptsächlich auf B-Zellen und Zellen der myelomonozytären Zellreihe exprimiert. Im ZNS gibt es spezifische IL-1-Rezeptoren mit einer höheren Affinität zu IL-1 β als zu IL-1 α . Die Rezeptoren werden in unterschiedlicher Dichte auf unterschiedlichen Zelltypen gefunden und steigen nach Stimulierung mit IL-1 an (Ibelgaufts 1992; diGiovine *et al.* 1990; Dinarello 1991).

IL-1 wirkt in vielfältiger Weise sowohl lokal als auch systemisch. Die Produktion wird durch verschiedene andere Zytokine, bakterielle Endotoxine, Viren, Mitogene und Antigene angeregt. In erster Linie stimuliert IL-1 T-Helfer-Zellen zur Produktion und Sekretion von Interleukin-2 und IFN- γ sowie die Expression von IL-2-Rezeptoren. IL-2 wiederum ist ein essentieller Proliferationsfaktor für T-Zellen und B-Zellen und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Tumorüberwachung. Weiterhin stimuliert IL-2 in peripheren Leukozyten die Synthese von IFN- γ und induziert selbst die Sekretion von IL-1 und Tumornekrosefaktoren. In klinischen Versuchen zeigte sich eine signifikante Antitumor-Aktivität bei verschiedenen Tumorzelltypen. IL-1 wirkt direkt auf B-Zellen, indem es die Proliferation und Immunglobulinproduktion fördert. Es stimuliert außerdem die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen und Fibroblasten (Ibelgaufts 1992; diGiovine *et al.* 1990; Dinarello 1991).

IL-1 wirkt antiproliferativ auf verschiedene Tumorzelltypen. Es unterstützt die durch Monozyten vermittelte Tumorzytotoxizität und induziert die Tumorregression. Zusammen mit anderen Zytokinen ist IL-1 an der Entzündungsreaktion beteiligt, unter anderem durch eine Steigerung der Sekretion inflammatorischer Proteine. Außerdem wirkt IL-1 stark chemotaktisch auf Leukozyten. Weiterhin wirkt IL-1 auf die Akute-Phase-Reaktion ein (Ibelgaufts 1992; diGiovine *et al.* 1990; Dinarello 1991).

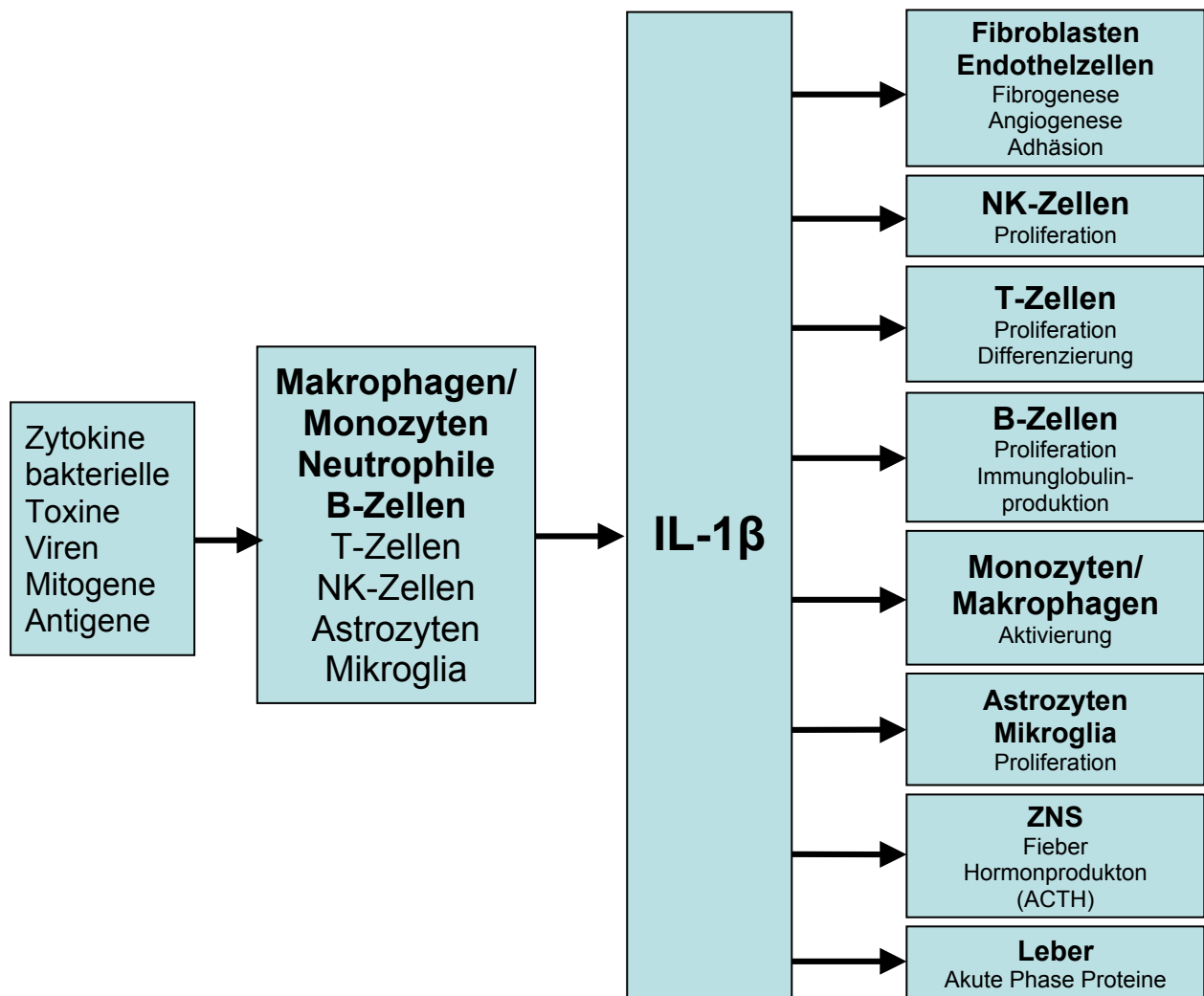


Abbildung 2 Wirkung von IL-1 β . IL-1 β beeinflusst zahlreiche Zellen und fördert insbesondere die Aktivierung und Proliferation von Immunzellen. Es wird als Antwort auf Antigene, Traumen oder Infektionen von unterschiedlichen Zelltypen gebildet.

Zentral beeinflusst IL-1 die Freisetzung einer Reihe von Hormonen. Es wirkt als endogenes Pyrogen und erzeugt Fieber und stimuliert ebenso wie IL-6 die Synthese von Adrenokortikotropen Hormon (ACTH) im Hypophysenvorderlappen. ACTH regt in der Nebennierenrinde die Synthese von Glukokortikoiden, Mineralkortikoiden und Sexualhormonen an. Die so gebildeten Glukokortikoide inhibieren als negative Rückkopplung die Produktion von IL-1 und IL-6. Astrozyten proliferieren in Gegenwart von IL-1 und produzieren wiederum IL-3, das als Wachstumsfaktor für Mikroglia und

peritoneale Makrophagen fungiert (Ibelgaufts 1992; diGiovine *et al.* 1990; Dinarello 1991) (Abbildung 2).

1.4.2 Interferon- γ

Bei den Interferonen (IFN) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Proteinen mit zum Teil ähnlichen biologischen Aktivitäten, die sich in vielen physiko- und immunchemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Man unterscheidet drei Hauptklassen der humanen Interferone, die als IFN- α , IFN- β und IFN- γ bezeichnet werden. Vom natürlich vorkommenden IFN- γ gibt es mindestens sechs in ihren Strukturen verschiedene Varianten. Eine Homologie zu den beiden anderen Interferonen IFN- α und IFN- β besteht nicht. IFN- γ wird hauptsächlich nach Aktivierung durch Antigene, Mitogene oder Alloantigene von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen synthetisiert. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Lymphozyten produzieren IFN- γ . IL-2 induziert ebenfalls die Synthese von IFN- γ (Ibelgaufts 1992; Vilcek *et al.* 1985; Gattoni *et al.* 2006).

Für IFN- γ existieren eine Reihe von Rezeptoren unterschiedlicher Molmassen, die auf fast allen humanen Zelltypen mit Ausnahme von reifen Erythrozyten gefunden wurden. Nach der Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor kommt es zur raschen Internalisierung der IFN- γ -Rezeptor-Komplexe durch Endozytose (Ibelgaufts 1992; Vilcek *et al.* 1985; Gattoni *et al.* 2006).

IFN- γ wirkt hauptsächlich als immunmodulatorisches Zytokin im Gegensatz zu den anderen Interferonen, die hauptsächlich antivirale Eigenschaften aufweisen. Es zeigt aber auch antivirale und antiparasitäre Aktivität und wirkt antimittotisch bzw. antiproliferativ auf natürliche und transformierte Zellen. IFN- γ synergisiert mit den Tumornekrosefaktoren in der proliferationshemmenden Wirkung auf verschiedene Zelltypen. Diese ist stärker ausgeprägt als bei den anderen Interferonen. In T-Helfer-Zellen induziert IL-2 die Synthese von IFN- γ und weiterer Zytokine. IFN- γ wirkt synergistisch mit IL-1 und IL-2 zusammen und scheint ebenfalls notwendig zu sein für die Expression von IL-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten. Eine Hemmung des IL-2-Rezeptors inhibiert ebenfalls die Synthese von IFN- γ . Auf diese Weise beeinflusst IFN- γ die zellvermittelte Zytotoxizität. IFN- γ reguliert außer der

Expression von MHC-Klasse I-Genen auch die von MHC-Klasse II-Genen und ist das einzige Interferon, das die Expression dieser Proteine stimuliert. Ebenfalls stimuliert es stark die Expression des Zelloberflächenproteins CD4 in T-Helfer-Zellen. IFN- γ induziert in Monozyten und Makrophagen die Sekretion des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF- α) sowie die Transkription der für koloniestimulierende Faktoren kodierenden Gene. Die Transkription einiger Gene wird spezifisch durch IFN- γ induziert (Ibelgaufts 1992; Vilcek *et al.* 1985; Gattoni *et al.* 2006) (Abbildung 3).

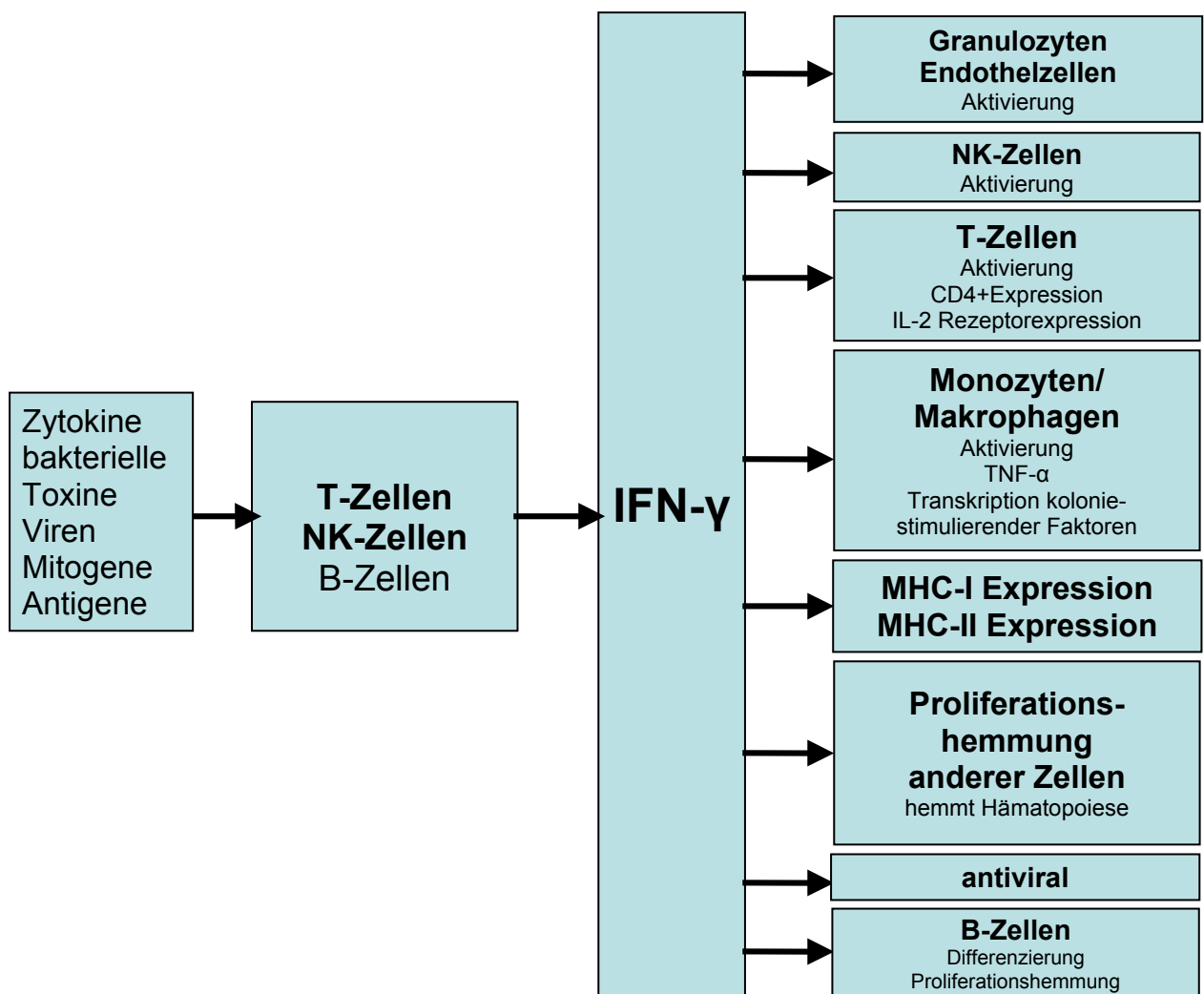


Abbildung 3 Wirkung von IFN- γ . IFN- γ wirkt immunmodulatorisch auf zahlreiche Zelltypen. Zusätzlich wirkt es antiproliferativ, z. B. auf transformierte Zellen. Es wird nach Aktivierung durch Antigene, Infektionen oder Traumen insbesondere von Lymphozyten gebildet.

1.5 Zytokine in der Glioblastombehandlung

Die Therapie maligner Gliome erweist sich bisher als äußerst schwierig. Trotz aggressiver Therapien mittels operativer Eingriffe, Radiotherapie und Chemotherapie liegt die mittlere Überlebenszeit von Glioblastompatienten nach Diagnosestellung unter einem Jahr (Castro *et al.* 2003). Bisherige Ausführungen der Glioblastomtherapie, welche auf Immuntherapie und biologischen Modifizierungen beruhten, konnten letztlich kaum signifikante Effekte demonstrieren (Marras *et al.* 2003). Dennoch zeigt sich die Anwendung biologischer Methoden, insbesondere die der Immuntherapie zur Behandlung von Glioblastomen als Erfolg versprechend und zukunftsweisend (Fine 1995). Verschiedene Studien zeigten in den letzten Jahren, dass proinflammatorische Zytokine fähig sind, eine Antitumor-Immunantwort im Tiermodell hervorzurufen.

Die systemische Gabe von Zytokinen führte in *in vivo* Studien zu ernststen Nebenwirkungen, jedoch nur zu geringen Konzentrationen innerhalb des Tumors. Letzteres ist unter anderem durch die Blockade der Blut-Hirn-Schranke zu erklären. Verbessert werden konnten die Ergebnisse über eine direkte intrakranielle Gabe von Immuntherapeutika. Doch auch die Diffusion insbesondere von hochmolekulargewichtigen Komponenten ist im Hirnparenchym stark verlangsamt, wodurch die Effektivität therapeutischer Gaben gemindert wird. Die Konzentration konnte jedoch durch kontinuierliche Applikation, wie im Rahmen der *convection-enhanced delivery* möglich, deutlich gesteigert werden (Bobo *et al.* 1994).

Unter TNF- α , IL-2 und IFN- γ kam es zunächst zu einer Verringerung des Tumorwachstums. TNF- α stimuliert die Proliferation von T-Zellen sowie die Aktivierung von Granulozyten und NK-Zellen. Die Sekretion von anderen Zytokinen, wie beispielsweise IL-2, IL-6 und IL-1 β wurde gesteigert (Romanczuk *et al.* 1999). IL-2 und INF- γ führten jeweils zu einer Immunzellgesteuerten Antitumorantwort, welche zu einer Verringerung des Tumorwachstums führte. Die Überlebenszeit konnte jedoch kaum verlängert werden, was auf die toxischen Effekte zurückgeführt wurde (Tjuvajev *et al.* 1995). Zusätzlich zeigte IFN- γ einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf Glioblastomzelllinien *in vitro* (Kominsky *et al.* 1998). Die Kombination von IFN- γ und IL-7 konnte ebenso die Glioblastomzellproliferation *in vivo* hemmen (Visse *et al.* 1999).

Schließlich konnte in einem Rattengliommodell nach retroviraler intrakranieller Einbringung von IFN- γ cDNA eine Tumorregression erreicht werden (Saleh *et al.* 2000). Mehrere Studien zeigten auch unter Gabe von IL-4 eine Tumorregression (Puri 1999; Kawakami *et al.* 2003).

Frühere Studien konnten zeigen, dass unter kontinuierlicher Infusion von IL-1 β ins Gehirn eine lokale inflammatorische Immunantwort bei Ratten hervorgerufen werden konnte. Die Infusion von IL-1 β ins Rattenhirn führte zu einer Hochregulation der Ausbildung von Adhensionsmolekülen und Chemokinen in Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen. So wurde unter anderem die Extravasation von Blutzellen ins ZNS ermöglicht. (Schöning *et al.* 2002).

1.6 Problemstellung

Trotz umfangreicher Studien im Rahmen der immuntherapeutischen Glioblastomtherapie konnten noch keine herausragenden signifikanten Effekte demonstriert werden. Noch gibt es viele unerforschte und unbekannte Aspekte im Rahmen der Tumorimmunantwort. Insbesondere die immunologischen Vorgänge im ZNS lassen zahlreiche Fragen offen.

Um die Rolle von IL-1 β und IFN- γ im Rahmen der Tumorimmunologie zu studieren wurde in dieser Arbeit ein Rattengliommodell zur lokalen Zytokinapplikation etabliert.

Tumorzelllinien wurden bereits in den 60er Jahren chemisch induziert. Mittels lokaler Gabe von karzinogenen Stoffen wie N-nitrosoureas (NNU), N-methylnitrosourea (NNMU) oder N-ethylnitrosourea (ENU) wurden ZNS-Tumoren in Nagern hervorgerufen (Druckrey *et al.* 1968; Schmidek *et al.* 1971). Bei schwangeren Ratten konnte der Tumor im kompletten Wurf erzeugt werden (Koestner *et al.* 1971).

Die fetale transplazentare Gabe von ENU bei CD Fischerratten generierte das F98 Gliom. Die Glioblastomzelllinie F98 ist nur schwach immunogen in einem synergistischen Wirt. Als anaplastischer Tumor ähnelt er sehr den Eigenschaften und dem Charakter des humanen Glioblastoms. Aus diesen Gründen eignet sich die F98

Tumorzelllinie besonders gut zur Gliomtherapieforschung, weshalb wir sie in unserem Studienansatz im Fischerrattenmodell nutzten.

Den Versuchsaufbau zur Tumorzellimplantation glichen wir den Erfahrungen früherer Studien an, in denen bereits erfolgreich ZNS-Tumoren im Rattenmodell mit Fischerratten generiert wurden (Fathallah-Shaykh *et al.* 1998).

Die lokale Gabe von IL-1 β , INF- γ im Vergleich zu Vehikellösung in das Tumorparenchym sollte insbesondere folgende Fragen beantworten:

- In welchem Rahmen findet nach Zytokingabe eine Immunantwort statt?
- Wie unterscheiden sich die Immunzelleinwanderungen quantitativ und qualitativ?
- Wird eine Tumorregression nach Zytokingabe erreicht?
- Wird eine Verlängerung der Lebenserwartung durch die Therapie erreicht?

Mittels *convection enhanced delivery* (CED) sollte die intratumorale ZytokinKonzentration über mehrere Tage konstant gehalten werden. Durch die zentrale lokale Gabe sollten systemische Nebeneffekte minimiert werden. Die Minipumpenimplantation und Zytokinapplikation wurde nach den Erfahrungen bisheriger Studien durchgeführt (Schöning *et al.* 1999; Schöning *et al.* 2002; Elepfandt *et al.* 2002).

Nach Zytokininfusion wurden die Zellinfiltrate immunhistologisch am Hirngefrierschnitt untersucht und ausgezählt. Die Größenbestimmung des Tumors erfolgte mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Die Ergebnisse der mit IL-1 β , INF- γ oder Vehikellösung behandelten Tiere wurden analysiert und statistisch ausgewertet.

2 Methodik

2.1 Versuchsplan

Es fand zunächst eine Versuchsreihe I zur Qualifizierung und Quantifizierung der eingewanderten Immunzellen im intrazerebralen Tumor bei 21 Ratten statt. Den Tieren wurde 8 Tage nach Tumorzellinjektion Interleukin-1 β , Interferon- γ oder Vehikellösung intrazerebral in den Tumor über 48 Stunden infundiert. Nur Vehikellösung erhielten 7 Tiere, 8 Tieren wurde recombinantes Ratten (rr) IL-1 β infundiert und 6 Tiere erhielten rr IFN- γ . Im Anschluss wurden die Tiere getötet, die Gehirne entnommen und diese mittels flüssigem Stickstoff gefroren (Abbildung 4). Nach Anfertigung von Gefrierschnitten wurde eine Immunhistologie zum Nachweis von eingewanderten Makrophagen, B- und T-Zellen, sowie Granulozyten durchgeführt. Außerdem wurde anhand der Schnitte die Tumorgöße bestimmt und geprüft, ob der Tumor nach Interleukin- bzw. Interferongabe eine geringere Größe aufwies als nach der Gabe von Vehikellösung.

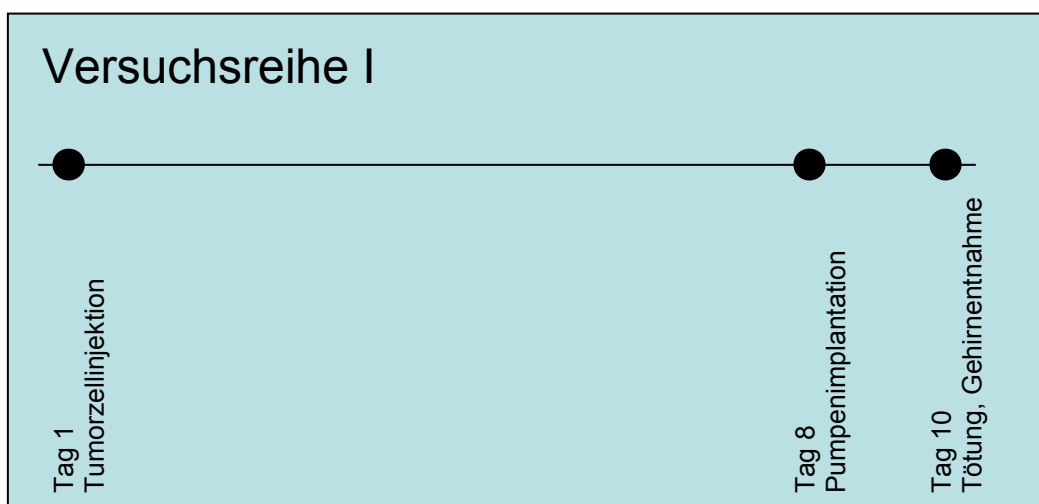


Abbildung 4 Zeitlinie zur Versuchsreihe I

Als Versuchsreihe II wurde mit 17 Ratten eine Überlebensstudie durchgeführt. Vor und nach Gabe von Vehikellösung bei 8 Tieren bzw. von rr IL-1 β bei 9 Tieren wurde die

Tumorgröße mittels MRT bestimmt (Abbildung 5). Ab der Pumpenimplantation, also ab dem Beginn der Behandlung, wurden die Lebenstage gezählt.

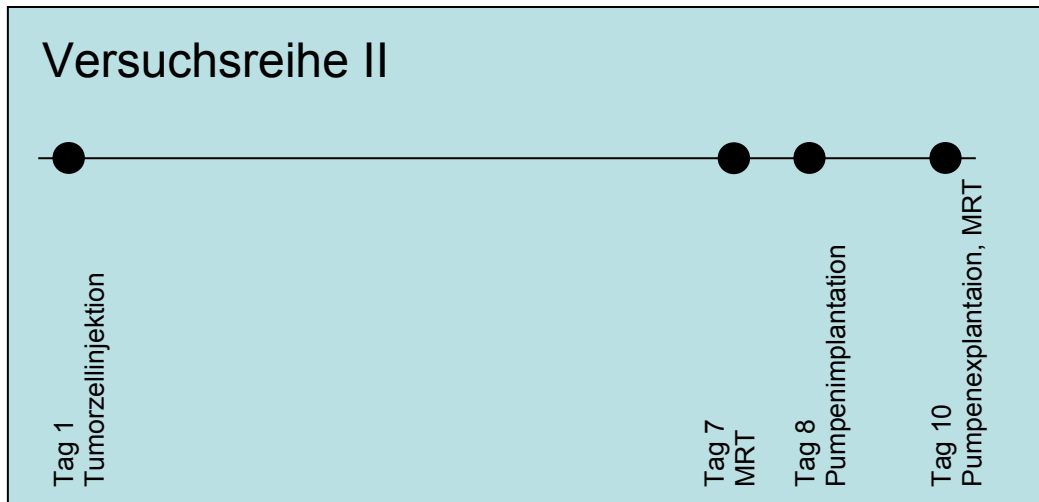


Abbildung 5 Zeitlinie zur Versuchsreihe II

2.2 Versuchstiere

Es wurden männliche Fischerratten vom Stamm F344 (Lieferant: Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet, die zu Beginn der Versuche ein Gewicht von 180 – 200 g aufwiesen. Die Versuche wurden durch den Senat von Berlin genehmigt.

2.3 Tumorzellen

2.3.1 Tumorzelllinie

Als Zelllinie wurde die Glioblastomtumorzelllinie F98 (ein großzügiges Geschenk von H. Kettemann, MDC, Berlin) verwendet. Die Zellen wurden mit 5 ml DMEM-Medium mit Zusätzen (Dulbecco's Mod Eagle Medium, GIBCO™) in Zellkulturflaschen (50 ml, FALCON®) im Brutschrank kultiviert. Mediumwechsel und Zellpassagen fanden regelmäßig statt.

2.3.2 Herstellung der Zelllösung

Agarose (Type VII, SIGMA A-9045) wurde in der 100-fachen Menge DMEM-Medium bei ca. 60 °C gelöst und bei mindestens 37 °C im Wasserbad in flüssigem Zustand gehalten.

Um die Tumorzellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurde die Mediumlösung abpipettiert und den Zellen 2 ml Trypsin (Trypsin EDTA 1x in HBSS w/o CAMGw/EDTA.4NA) beigefügt. Nach Ablösung wurde 5 ml DMEM-Medium mit Zusätzen zugegeben. Das enthaltene Kälberserum stoppt die Trypsinreaktion. Das Medium mit Zellen wurde bei 900 Umdrehungen bei 4 °C während 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen in 1 ml DMEM-Medium mit Zusätzen gelöst.

Nach Zellzählung wurde die Zellsuspension erneut bei 900 Umdrehungen bei 4 °C während 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert.

Das Zell-Pellet wurde so mit der Agaroselösung vermischt, dass pro Milliliter Agaroselösung 10^7 Zellen enthalten waren. Die Zelllösung konnte bei 37 °C maximal 180 Minuten zur Implantation im flüssigem Zustand aufbewahrt werden.

2.3.3 Zählung der Tumorzellen

Zur Zellzählung wurde eine Zählkammer (0,0025 m², Neubauer, Supe/Rior) verwendet. Die erstellte Lösung wurde mit Trypan blue solution (0,4 %ig) im Verhältnis 1:10 gefärbt und in der Kammer in 4 x 4 Feldern ausgezählt. Die Menge der Zellen pro ml Lösung ergab sich aus dem Kammerwert x 10^5 . (Denn die Kammergröße betrug 1 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 0,1 µl. Daraus folgt: 1 / 0,1 µl = 10 / µl = 10000 / ml = 10^4 / ml. Bei voriger Verdünnung 1:10 ergeben sich 10^5 pro ml Medium.)

2.3.4 Tumorzellinjektion

Die Tiere wurden drei Minuten mit einem Isoflurangemisch (FORENE® zu 5 %, N₂O 1l / min, O₂ 1l / min) inhalativ voranästhesiert und während der Operation in Inhalationsnarkose (FORENE® zu 0,2 %, N₂O 0,5l / min, O₂ 0,5l / min) gehalten. Zur

Operation wurden die Tiere in einem Stereotaxierahmen (STOELTING) fixiert. Nach Rasur der Haare im Bereich des Schädeldachs wurde ein sagitaler Hautschnitt durchgeführt und Sagitalnaht und Bregma dargestellt. Mit dem Bregma als Bezugspunkt wurden die Koordinaten für das Bohrloch drei Millimeter links des Bregmas festgelegt. Unter Kühlung mit Natriumchloridlösung 0,9%ig fand die Bohrung (PROXXON Minimot 40) durch die Kalotte statt.

Pro Tier wurden mindestens 5 µl Tumorzelllösung in einer Hamiltonspritze aufgezogen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Injektion wurde die Hamiltonspritze am Stereotaxierahmen fixiert und die Kanülenspitze genau 3 mm links des Bregmas und auf 6,5 mm Tiefe mit Bezug auf die Hirnhaut eingestellt. Die Koordinaten wurden anhand des Rattenhirnatlasses von PAXINOS & WATSON (1986) bestimmt (Abbildung 6). So konnte eine Injektion ohne Verletzung des linken Ventrikels garantiert werden.

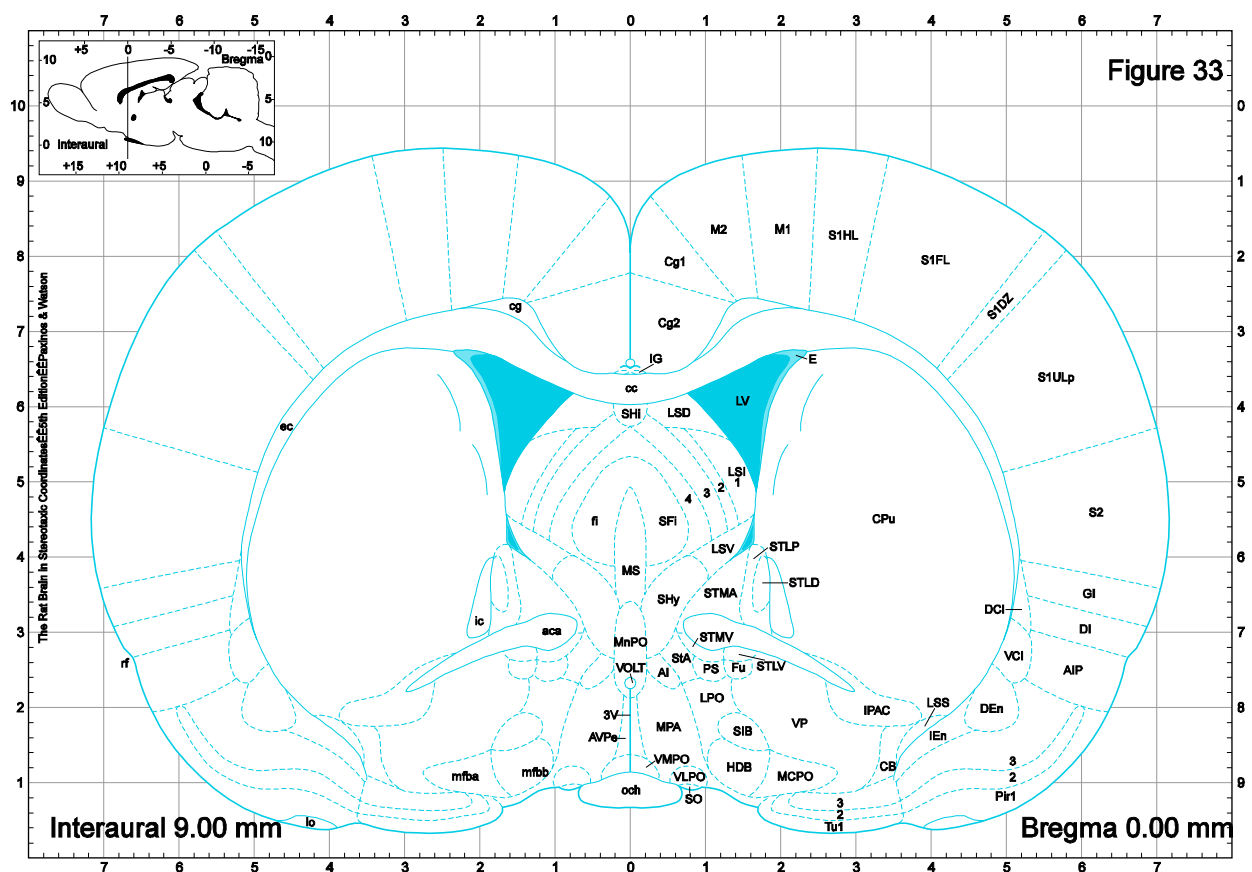


Abbildung 6 Rattenhirnquerschnitt nach Paxinos & Watson (2005). Dargestellt ist ein Querschnitt auf Höhe des Bregmas mit Erfassung der einzelnen Hirnareale in stereotaktischen Koordinaten. Die zur

Tumorimplantation gewählten Koordinaten liegen 3mm links des Bregmas in 6,5mm Tiefe im linken Nucleus caudatus. (CPu = caudate putamen (striatum)) (Paxinos und Watson 2005).

Genau 5 µl der Zelllösung wurden langsam in ca. 10 Sekunden in den linken *nucleus caudatus* injiziert. Nach Entfernen der Kanüle wurde die Schädeldecke mit Knochenwachs (ETHICON®) verschlossen und die Wunde mit einer fortlaufenden Naht versorgt.

2.4 MRT-Aufnahmen

Eine bildgebende Darstellung des Hirntumors erfolgte im Rahmen der Überlebensstudie am siebten Tag nach Tumorzellinjektion und nochmals 48 Stunden nach Zytokin- bzw. Vehikelinfusion mittels Magnetresonanztomographie-Aufnahmen. Die Pumpensysteme mussten zuvor operativ entfernt werden. Die MRT-Aufnahmen fanden in der radiologischen Abteilung des Virchow-Klinikums mit der freundlichen Unterstützung von Frau Güsja Warschewske an einem 1.5T MR-System (Gyrosan NT Intera, Philips, Niederlande) statt. Die Ratten wurden erneut in eine Isofluranmischnarkose gelegt und eine kleine zirkuläre Spule wurde auf dem Schädel platziert. Nach intravenöser Gabe von Kontrastmittel (Gadolinium) über die Rattenschwanzvene wurden T1 gewichtete Serien (TR 250, TE 14) aufgenommen.

2.5 Zytokininfusion

2.5.1 Pumpensysteme

Verwendet wurden osmotische Minipumpen (Microosmoticpump Model 1003D, alzet®), die mit einer Kanüle versehen und über einen 1,5 cm langen Katheterschlauch (beides Brain infusion Kit II, alzet®) mit 8 mm Pumpenköpfen (Brain infusion Cannulae, Bilaney Consultants GmbH) verbunden waren.

Die Minipumpen bestehen aus drei konzentrisch angeordneten Schichten. Im Inneren befindet sich das Reservoir für die einzufüllende Zytokin- bzw. Vehikellösung. Durch eine impermeable Membran abgetrennt, umgibt eine Hülle gefüllt mit der hochkonzentrierten Kochsalzlösung das Reservoir. Von der Umgebung ist die Pumpe durch eine semipermeable Membran abgegrenzt. Durch die Differenz des osmotischen

Druckes des Implantationsortes und der Kochsalzlösung gelangt Wasser entlang des osmotischen Gradienten aus der Umgebung durch die semipermeable Membran in die Hülle. Daraus resultiert die Kompression des flexiblen Reservoirs und die zuvor eingefüllte Zytokin- bzw. Vehikellösung wurde in einer konstanten Fließrate aus der Pumpe gedrückt. Die Pumpensysteme wurden mindestens 12 Stunden vor der Implantation angefertigt, sterilisiert, befüllt und bei 37 °C kultiviert. So konnte eine sofortige Infusion nach Implantation garantiert werden.

2.5.2 Pumpenfüllung

Pro Pumpe wurden 100 µl Lösung verwendet.

2.5.2.1 Vehikellösung

Die Vehikellösung bestand aus einem Gemisch von 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung und Albumin 20%ig (humane Albuminlösung 20 NDS N, DRK-Blutspendedienst, Springe) im Verhältnis 3:1.

2.5.2.2 rr IL-1β

rr IL-1β (recombinant rat, 501-RL, RD Systems, Minneapolis) und Vehikellösung wurden im Verhältnis 1:100 gemischt.

2.5.2.3 rr IFN-γ

rr IFN-γ (recombinant rat, 585-IF, RD Systems, Minneapolis) und Vehikellösung wurden im Verhältnis 1:100 gemischt.

2.5.3 Pumpenimplantation

Die Pumpenimplantation erfolgte bei den Tieren am achten Tag nach Tumorzellinjektion erneut in Inhalationsnarkose mit Isoflurangemisch im Stereotaxierahmen. Nach Auftrennung der alten Wundnaht wurden Bregma, Sagitalnaht und Bohrloch dargestellt. Die Minipumpe wurde in einer subkutanen Tasche zwischen den Schulterblättern platziert. Unter Fixation des Pumpenkopfes in einer Zange am Stereotaxierahmen wurde dessen Kanüle 3 mm links des Bregmas senkrecht im Gehirn implantiert. Die

Kanülenspitze endet 6,5 mm tief unter der Hirnhaut am Injektionsort der Tumorzellen. Der Pumpenkopf wurde mit Kleber (LOCTITE 454, Prism, Surface Insensitive Gel, Instant adhesive, Bilaney Consult. GmbH) am Schädelknochen fixiert. Anschließend wurde die Wunde vorsichtig mit einer fortlaufenden Naht versorgt.

2.5.4 Pumpenentnahme in der Überlebensstudie

Da in der Überlebensstudie nach der Infusion erneut MRT-Aufnahmen stattfanden, musste das metallhaltige Pumpensystem zuvor entfernt werden. Die Tiere wurden hierzu erneut narkotisiert, die Naht wurde eröffnet, die Pumpe behutsam entfernt und die Wunde wieder mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

2.6 Gehirnentnahme

Die Ratten der ersten Versuchsreihe wurden 48 Stunden nach Beginn der Zytokin- bzw. der Vehikelinfusion in Inhalationsanästhesie mit Isofluran getötet. Die Tiere der zweiten Versuchsreihe – der Überlebensstudie – wurden erst getötet, wenn ihr vitaler Zustand sich zusehends verschlechterte. Nach einem medianen Bauchschnitt wurde die Aorta aufgesucht und durchtrennt. So konnte eine Ausblutung erreicht werden. Nach Eintritt des Todes konnte die Narkosezufuhr gestoppt werden. Die Schädeldecke wurde entfernt und das Gehirn unter Abtrennung der Hirnnerven und des Rückenmarks vorsichtig entnommen. Nach Abtrennung des nicht benötigten Kleinhirns wurde das Gehirn sofort in – 20 °C kaltes Isopentan (Riedel-de Haen®) gegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Gehirne bei – 34 °C gelagert.

2.7 Gefrierschnitte

Die Gehirne wurden im Cryostat (Microm HM 500 OM, Heidelberg) in Tissue Freezing Medium™ (JUNG) eingebettet und bei – 20 °C Cryostattemperatur und – 15 °C Objekttemperatur geschnitten. Im Bereich des Stichkanals wurden Schnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt und auf Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel Gläser) gegeben. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und nach Fixation in Aceton für 5 Minuten bei – 80 °C bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

2.8 Immunhistologie

2.8.1 Primärantikörper

2.8.1.1 Maus-Anti-Ratte ED1 (ED1)

Bei dem Mausantikörper ED1 (MCA341R, Serotec) handelt es sich um gereinigte IgG1. Der Antikörper wurde von mit Rattenmilzzellen immunisierten BALB/c-Mäusen, die mit Zellen der SP2/0-Ag14 Mausmyelomzelllinie fusioniert wurden, gewonnen. ED1 erkennt ein Einzelketten-Glykoprotein von 90 – 100 kD, welches hauptsächlich auf der Lysosomenmembran myeloider Zellen und in geringer Form auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Das Antigen wird von der Mehrzahl der Gewebsmakrophagen und in geringerer Menge auch von peripheren Blutgranulozyten exprimiert (Abbildung 7) (Damoiseaux *et al.* 1994).

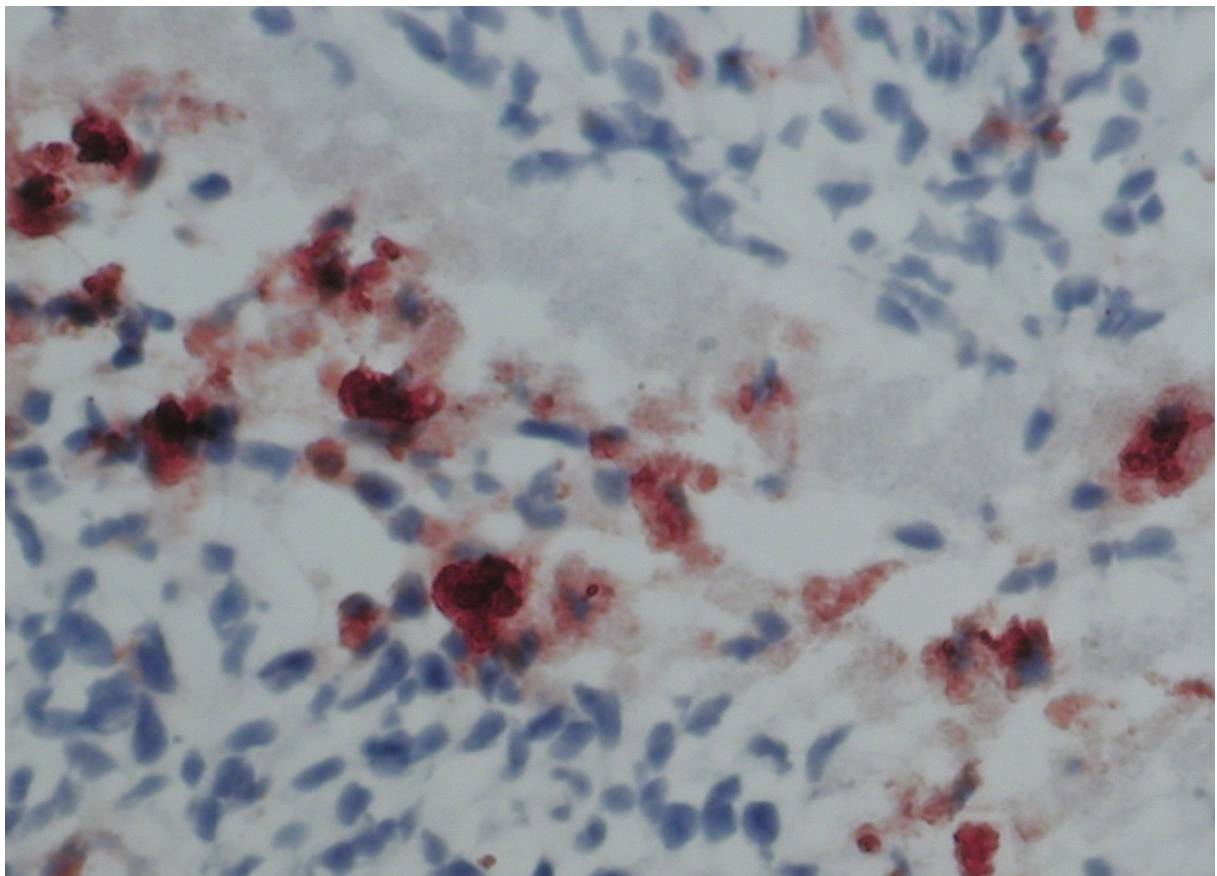


Abbildung 7 Färbebeispiel mit dem Antikörper ED1. Markierung von antigenpräsentierenden Zellen im Hirnparenchym (400fache Aufnahmevergrößerung).

2.8.1.2 Maus-Anti-Ratte Granulozyten und erythroide Zellen (HIS48)

HIS48 ist auch bekannt als 87.8C10 (MCA967, Serotec). Es handelt sich um IgM der Maus aus PVG Rattenmilzzelllösung, welches mit Granulozyten und erythroiden Zellen reagiert (Abbildung 8) (Kampinga *et al.* 1990).

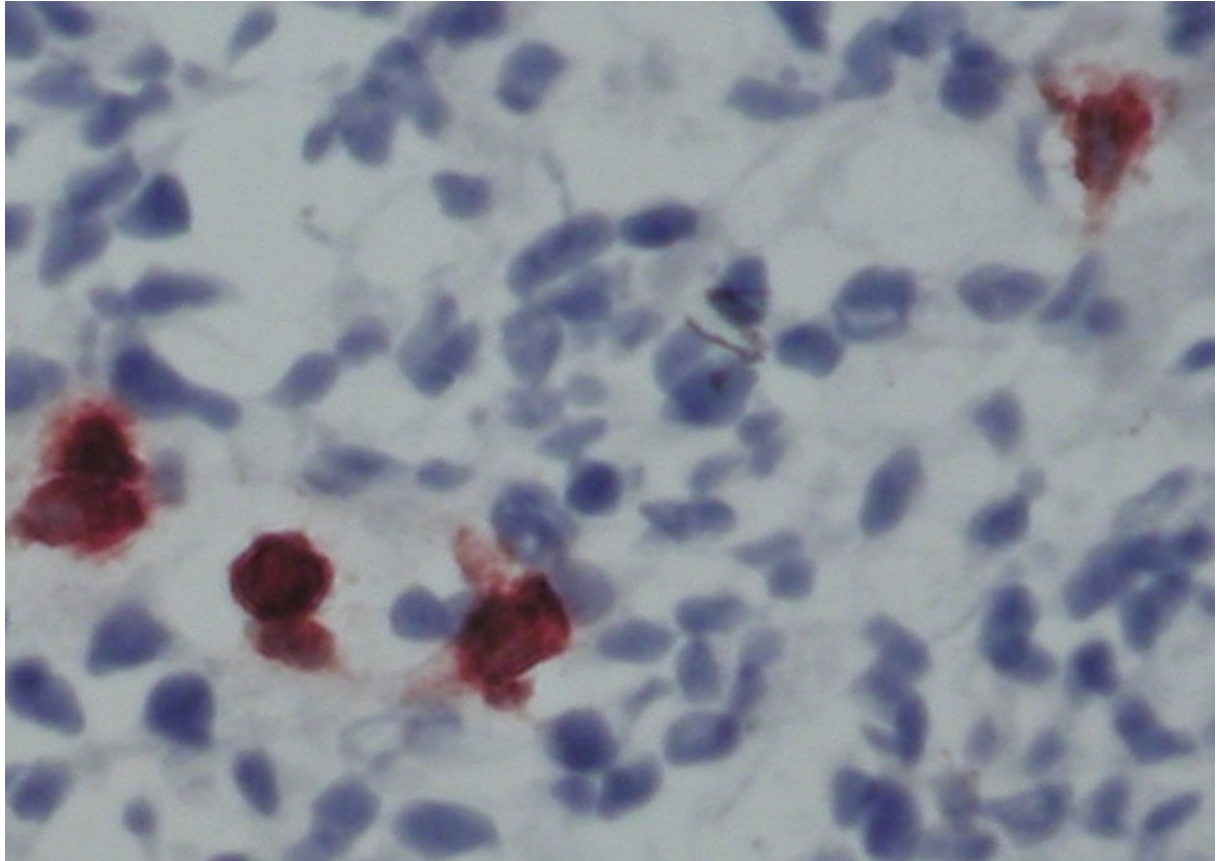


Abbildung 8 Färbebeispiel mit dem Antikörper HIS48. Markierung von antigenpräsentierenden Zellen im Hirnparenchym (400fache Aufnahmevergrößerung).

2.8.1.3 Maus-Anti-Ia (Maus/Ratte) (MRC OX-6)

Bei dem monoklonalen Antikörper MRC OX-6 (MCA46G, Serotec) handelt es sich um gereinigte IgG1. Der Antikörper wurde durch Fusion mit Milzzellen mit Glykoproteinen der Rattenthymozytenmembran von immunisierten BALB/c-Mäusen und Zellen der NS-1 Mausmyelomzelllinie gewonnen. Er reagiert mit einer monomorphen Determinante des Ratten-Ia Antigens, welches von B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und einigen Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen exprimiert wird (Abbildung 9). Das Ratten-Ia Antigen entspricht dem MHC-Klasse-II Antigen, welches einen Komplex mit fremden Proteinstrukturen auf der Zelloberfläche bildet. Dieses Antigen dient als Ligand für den T-Zell-Rezeptor, der nach der T-Zell-Aktivierung exprimiert wird. Es wird eine antigenspezifische Immunreaktion initiiert (McMaster *et al.* 1979).

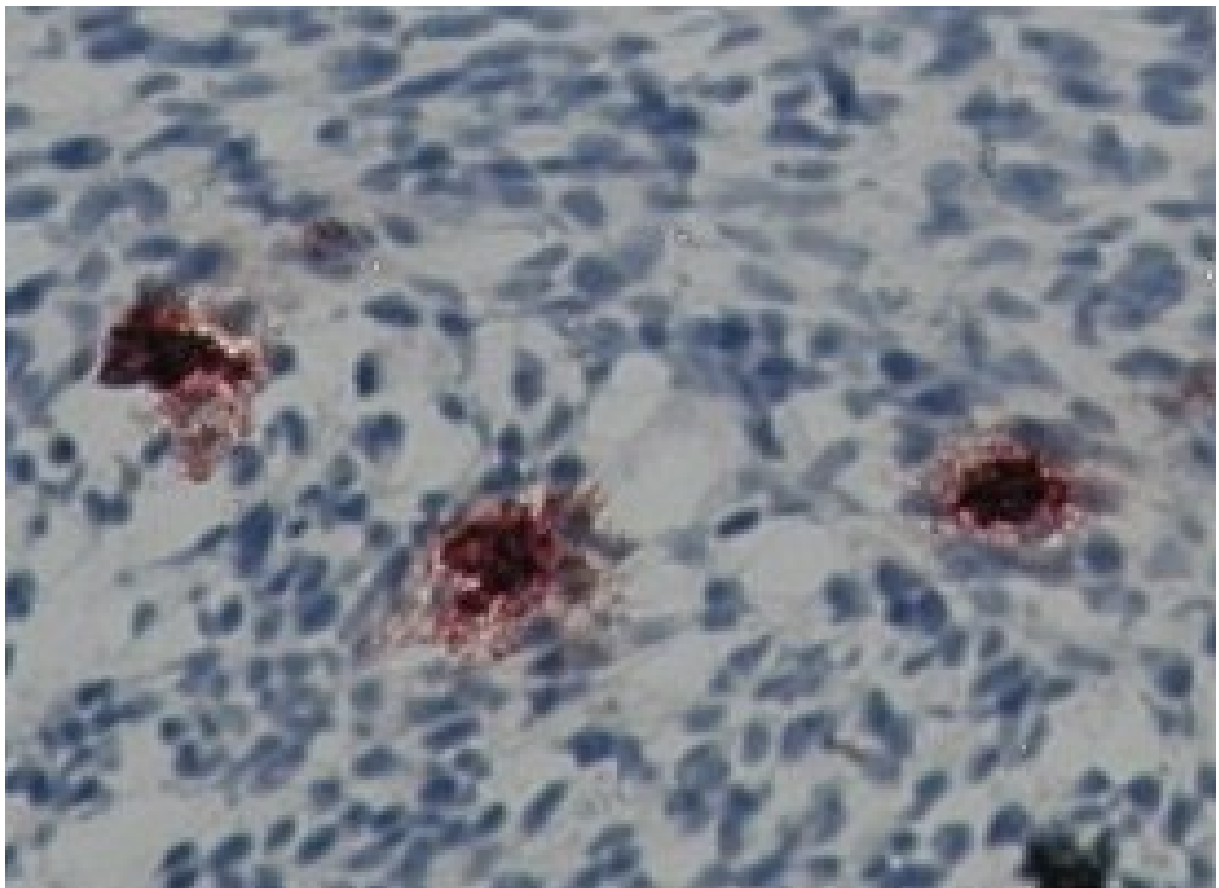


Abbildung 9 Färbebeispiel mit dem Antikörper OX-6. Markierung von antigenpräsentierenden Zellen im Hirnparenchym (200fache Aufnahmevergrößerung).

2.8.1.4 Maus-Anti-Ratte CD4 (IgG) (W3/25)

Bei dem Antikörper W3/25 (MCA55R, Serotec) handelt es sich um gereinigte IgG. Er wurde aus der Membran von Rattenthymozyten durch Fusion mit Milzzellen von immunisierten BALB/c-Mäusen, die mit Zellen der NS-1 Mausmyelomzelllinie fusioniert wurden, gewonnen. W3/25 bindet an das Ratten-CD4-Zelloberflächen-Glykoprotein, ein 55 kD-Molekül, welches von T-Helfer-Zellen, Thymozyten und Makrophagen exprimiert wird (Abbildung 10) (Whiteland *et al.* 1995).

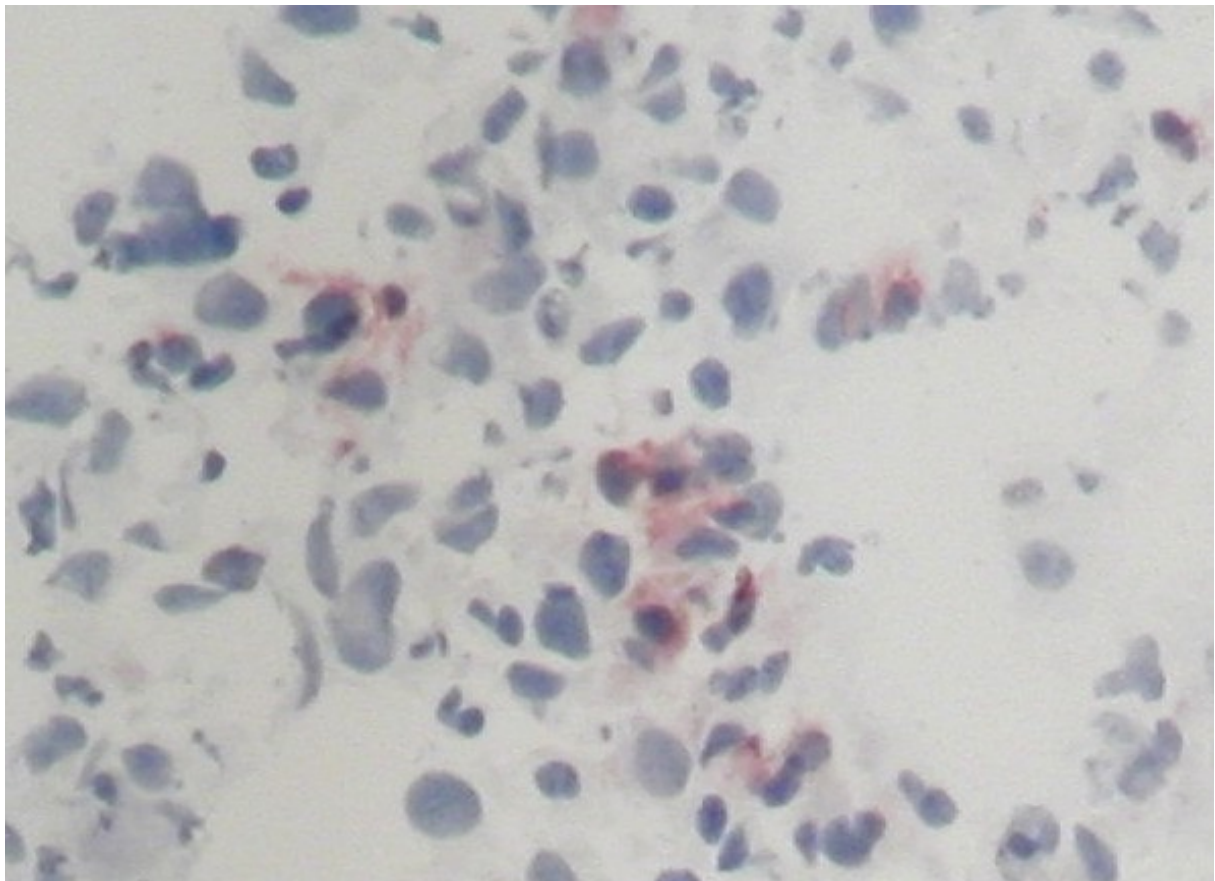


Abbildung 10 Färbebeispiel mit dem Antikörper W3/25. Markierung von antigenpräsentierenden Zellen im Hirnparenchym (200fache Aufnahmevergrößerung).

2.8.1.5 Maus-Anti-Ratte CD8 (MRC OX-8)

Bei MRC OX-8 (MCA48R, Serotec) handelt es sich um gereinigte IgG. Der Antikörper wurde durch Fusion von Glykoproteinen der Thymozytenmembran mit Milzzellen von immunisierten BALB/c-Mäusen, die mit Zellen der NS-1 Mausylomzelllinie fusioniert wurden, gewonnen. MRC OX-8 erkennt das Ratten-CD8-Zelloberflächenantigen, welches von T-Lymphozyten, den meisten Thymozyten und den meisten NK-Zellen exprimiert wird (Abbildung 11) (Whiteland *et al.* 1995).

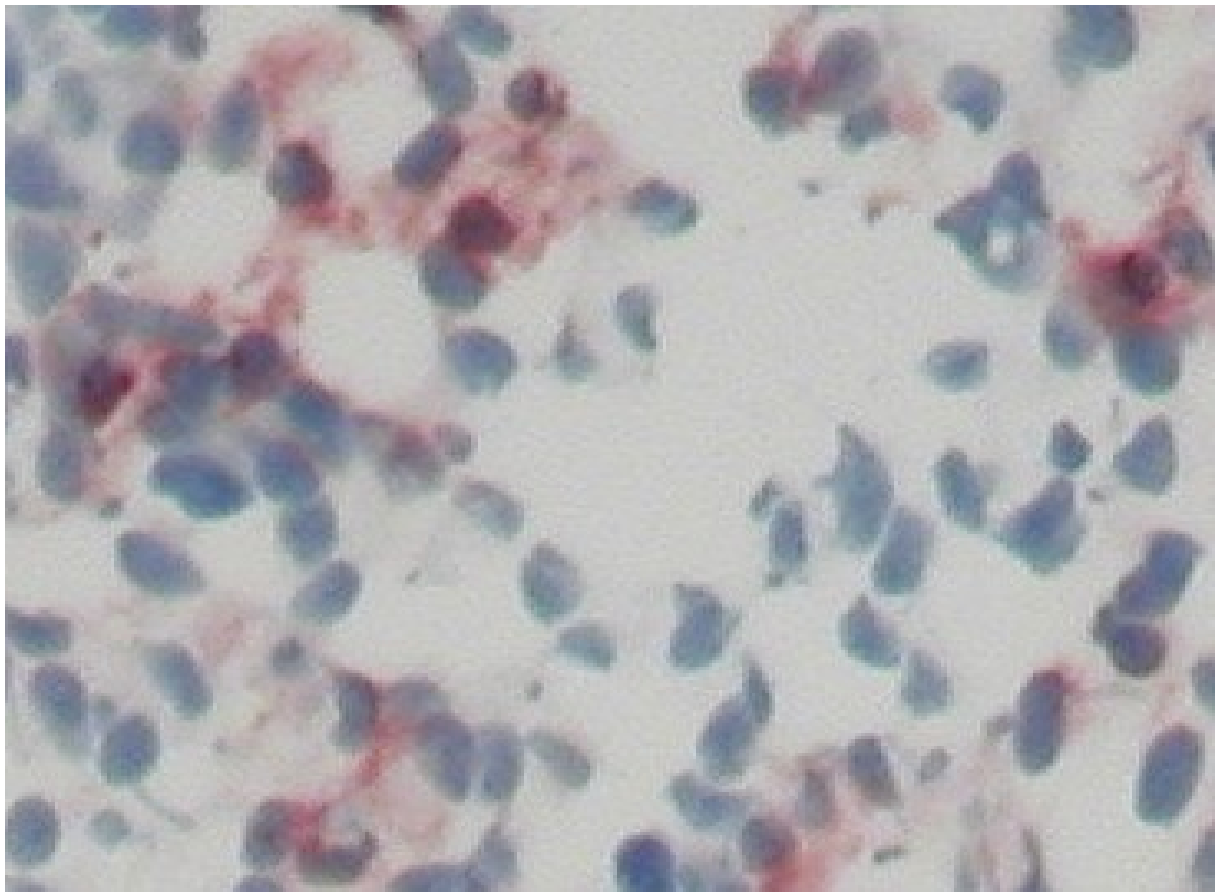


Abbildung 11 Färbebeispiel mit dem Antikörper OX-8. Markierung von antigenpräsentierenden Zellen im Hirnparenchym (200fache Aufnahmevergrößerung).

2.8.2 Sekundärantikörper (Vektor)

Als Sekundärantikörper diente ein affinitätsgereinigter biotinylierter Anti-Maus IgG vom Pferd (Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), BA-2001, Vector Laboratories, Linaris,

Wertheim). Zur Stabilisierung wird dem Antikörper zur Immunhistologie Rinderserum beigefügt. Dieser Brückenantikörper verbindet so den Maus-Primärantikörper mit dem Avidin der AB-Komplexe.

2.8.3 Blocklösung

Die Lösung dient zur Blockierung der unspezifischen Bindungen. Sie besteht aus TBS-Tween, 1 % hochgradig gereinigtem Rinderserumalbumin (Bovin Serum Albumin (BSA), SP-5050, Vector Laboratories, Linaris, Wertheim) und 5 % hitzebehandeltem Pferdeserum (Normal Horse Serum, S-2000, Vector Laboratories, Linaris, Wertheim).

2.8.4 Avidin-Biotin-Komplex (ABC)

Der AB-Komplex (ABComplex/HRP, K 0355, DAKO, Glostrup, Dänemark) besteht aus einer Reagenz A – Avidin, einem Glykoprotein aus Vogeleiern, das vier Biotinmoleküle mit hoher Affinität binden kann und somit an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet, sowie einer Reagenz B – biotinylierter Meerrettichperoxidase. Diese Peroxidase reagiert mit dem AEC-Substratsystem (AEC+ Large Volume High Sensitivity Substrate-Chromogen System, DAKO, Glostrup, Dänemark).

2.8.5 Stammlösungen und Puffer

2.8.5.1 Stammlösung 1

Diese ist ein 0,5-molarer Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6. Zur Herstellung wurden 60,55 g Trishydroxymethylaminomethan (8382, Merck, Darmstadt) in 900 ml H_2O_{dest} gelöst, mit ca. 60ml 25 %iger HCl (Salzsäure) auf einen pH von 7,6 eingestellt und auf 1,0 l mit H_2O_{dest} aufgefüllt.

2.8.5.2 Stammlösung 2

Diese ist eine 1,5-molare Kochsalzlösung. Zur Herstellung wurden 87,66 g Natriumchlorid mit H_2O_{dest} auf 1,0 l aufgefüllt und gelöst.

2.8.5.3 TBS

Diese ist eine 0,05-molare Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit einem pH-Wert von 7,6. Zur Herstellung wurden 100 ml Stammlösung 1 und 100 ml Stammlösung 2 mit H₂O_{dest} auf 1,0 l aufgefüllt und gemischt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.8.5.4 TBS-Tween

Diese ist 0,05-molare TBS mit 0,1 % Tween 20 (Merck, Darmstadt) mit einem pH-Wert von 7,6. Zur Herstellung wurde 1,0 l TBS mit 1,0 ml Tween 20 versetzt und gemischt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.8.5.5 Hämalaun

Zur Herstellung wurden 2,5 g Hämatoxylin (4302, Merck, Darmstadt), 500 mg NaIO₃ (6525, Merck, Darmstadt) und 125 g KAl(SO₄)₂·12H₂O in 2,5 l H₂O_{dest} gelöst. Dann wurden 125 g Chloralhydrat (Merck) und 2,5 g Citronensäure (244, Merck, Darmstadt) zugegeben und gut gelöst. Vor Gebrauch musste die Lösung mindestens vier Wochen bei Raumtemperatur reifen.

2.8.6 ABC-Färbung für monoklonale Antikörper mit Vektor-Sekundärantikörper

Die tiefgefrorenen Schnitte auf ihren Objektträgern wurden zunächst luftgetrocknet, dann fünf Minuten in kaltem Aceton fixiert und wieder luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Imedge-Pen (ImmEdge™Pen, Vector Laboratories, CA) umrahmt und zwei mal fünf Minuten in TBS-Tween gewaschen. Bei allen aufpipettierten Lösungen wurden pro Schnitt 150 µl verwendet. Alle Inkubationen fanden in einer feuchten Kammer statt. Es begann die einstündige Inkubation mit Blocklösung, der die 1,5-stündige Primärantikörperinkubation folgte. Nach Waschen in TBS-Tween für zwei mal fünf Minuten folgte die Sekundärantikörperinkubation für eine Stunde. Anschließend wurde fünf Minuten in TBS-Tween und fünf Minuten in TBS gewaschen und dann 20 Minuten mit H₂O₂-Block (Fertiglösung von DAKO) inkubiert. Wasserstoffperoxid blockiert die endogenen Peroxidasen, damit später spezifisch die Peroxidase des AB-Komplexes angefärbt wird. Weiter wurde zwei mal fünf Minuten in TBS gewaschen und

anschließend 30 Minuten mit AB-Komplex verdünnt mit TBS (für 50 Schnitte 5 ml TBS und je 1 Tropfen Reagenz A und B) inkubiert. Der Komplex musste bereits 30 Minuten vor Inkubation angesetzt werden. Es folgte zweimaliges Waschen mit TBS und die Färbung mit AEC-Fertiglösung (DAKO) für zwei Minuten. Das AEC-Substratsystem reagierte mit Peroxidase in einer ziegelroten Farbreaktion (Abbildung 12).

Anschließend wurde zweimal mit TBS gewaschen und innerhalb von ein bis zwei Minuten mit Hämalaun gegengefärbt (200 µl pro Schnitt). Danach wurde zweimal in TBS und zweimal in H_2O_{dest} gewaschen und schließlich die Schnitte in Aquatex (Merck, Darmstadt) eingebettet und mit Deckgläsern (Menzel) abgedeckt.

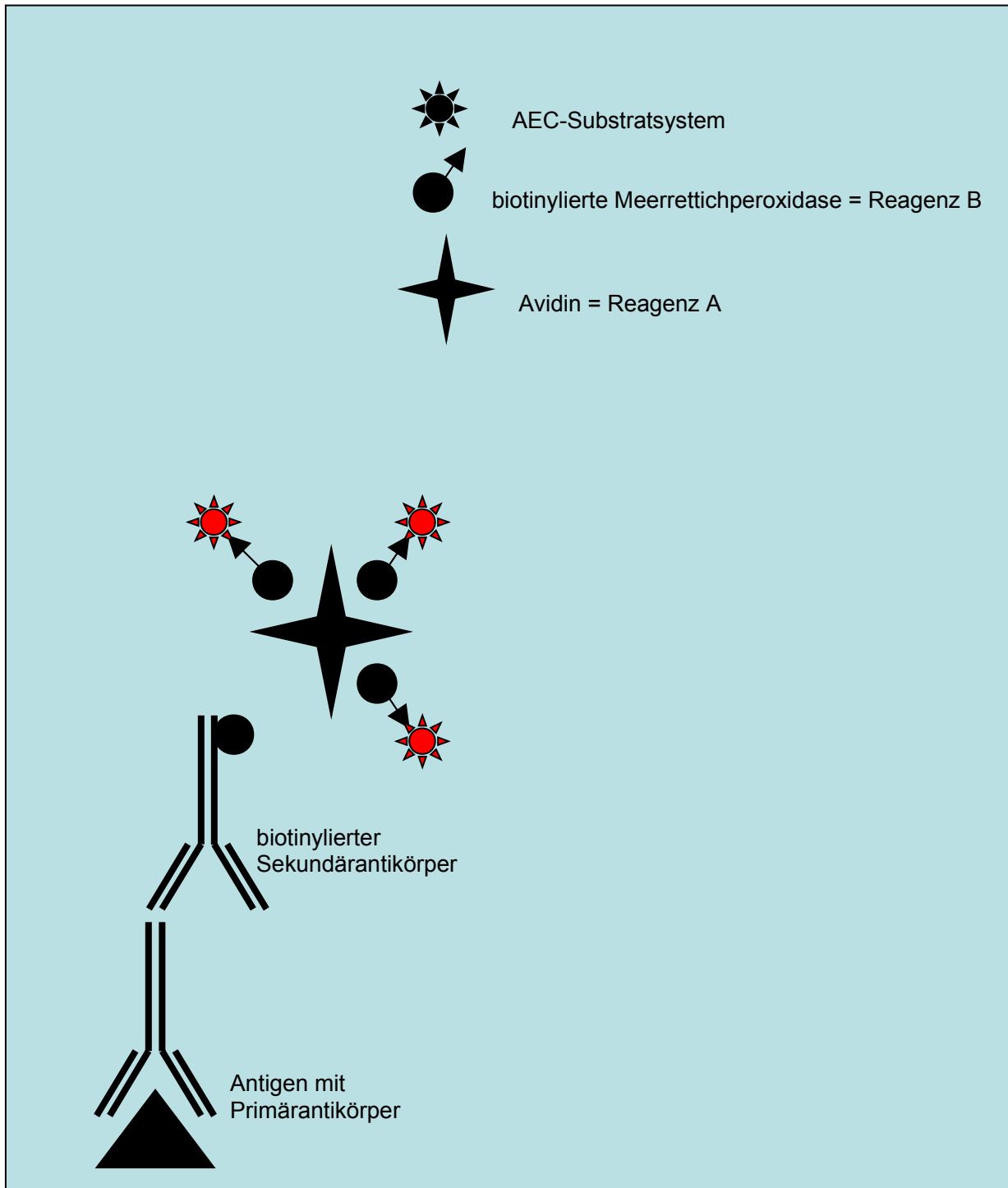


Abbildung 12 Schematische Darstellung des Färbekomplexes. Der Mausprimärantikörper bindet sich an das entsprechende Antigen der Zielzelle. Der anbindende Anti-Maus Sekundärantikörper verfügt über eine Biotinbindung, welche mit Reagenz A und B einen Komplex bildet. Die AEC-Lösung reagiert mit der Peroxidase (Reagenz B) in einer ziegelroten Färbung, welche die markierten Zellen gut sichtbar von anderen Zellen unterscheiden lässt.

2.9 Zählung der Immunzellen

Die Zählung der mit der Immunhistologie angefärbten Zellen erfolgte am Lichtmikroskop (Olympus BX40) mit 20-facher Vergrößerung (20x/0.40) mittels eines Zählrasters (10 x 10 Kästchen). Gezählt wurden die Zellen im Raster an sechs festgelegten Flächen innerhalb der Tumorfläche: im Tumorzentrum, bei vier, bei acht und bei zwölf Uhr, in der Mitte zwischen zwölf Uhr und Tumorzentrum und in der Mitte zwischen sechs Uhr und Tumorzentrum (Abbildung 13). Es wurde jeweils der größte Tumorschnitt, welcher sich im Bereich des Stichkanals befand, genutzt.

2.10 Flächenbestimmung

Die Fläche des Tumorschnittes im Stichkanal wurde am PC berechnet (Software: Jandel Scientific, Sigma Scan 3.0), nachdem die Schnitte am Lichtmikroskop mit einer speziell angebrachten Digitalkamera (Olympus) fotografiert worden waren. Die MRT-Aufnahmen wurden gescannt, um die Flächen zu bestimmen. Die größte Tumorschnittfläche je Gehirn diente hier als Vergleichsgröße.

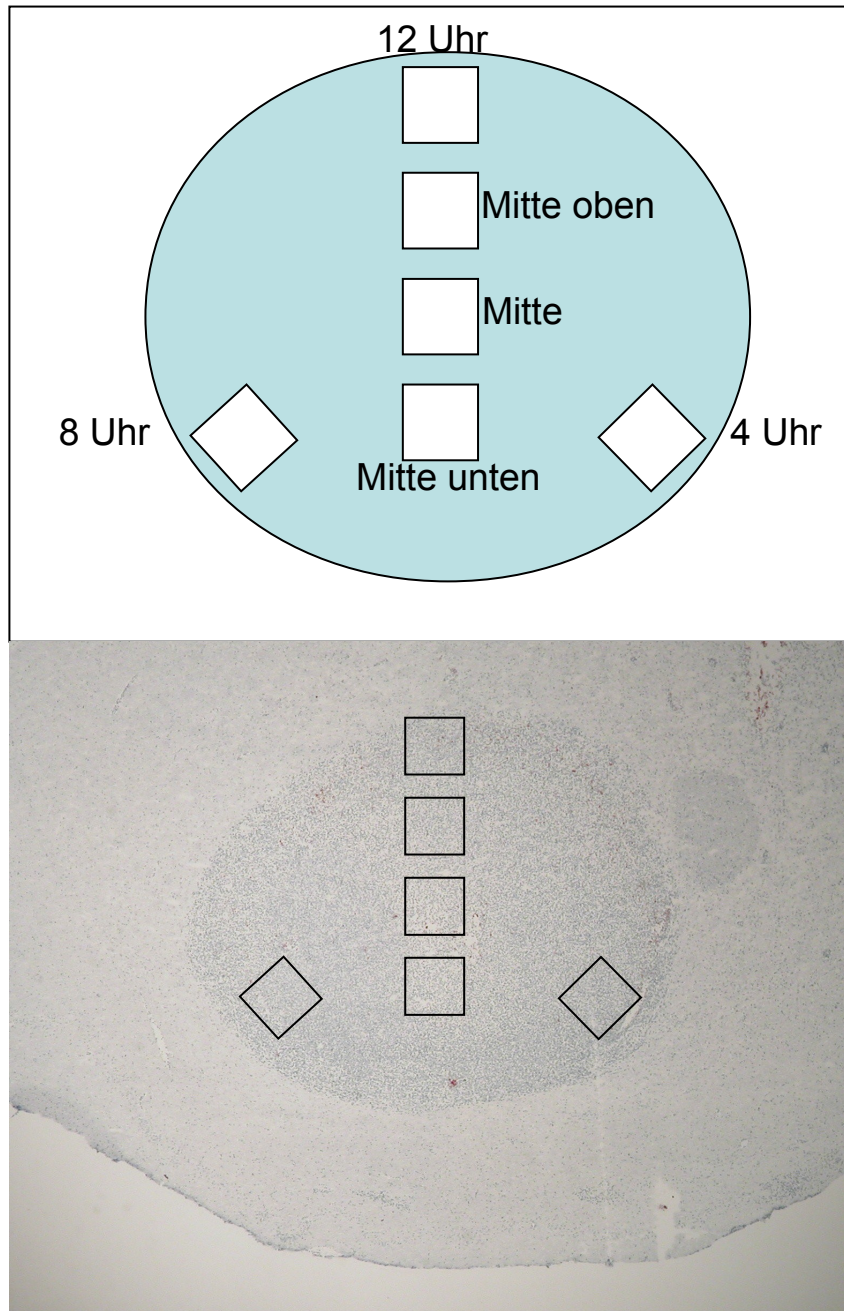


Abbildung 13 Darstellung der zur Immunzellzählung definierten Flächen. Innerhalb dieser vorgegebenen Flächen wurden die durch Färbung markierten Zellen mit Hilfe eines Zählrasters ausgezählt.

3 Ergebnisbeschreibung

3.1 Versuchsreihe I

Bei allen Tieren zeigte sich nach Tumorzellinjektion die Entwicklung eines Gehirntumors. Um eine exakte Auszählung der eingewanderten Immunzellen im Gehirnschnitt gewährleisten zu können, wurden nur Tiere mit einem gleichmässigen Tumorwachstum ohne extreme Tumorausläufer oder zu starker Nekrosenbildung etc. in die Studiauswertung aufgenommen. Die Tiere wurden nach 48stündiger Gabe von Vehikel- oder Zytokinlösung getötet. Bei der Schädelnahtöffnung wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Pumpenköpfe einwandfrei gehalten hatten, um eine kontinuierliche Infusion garantieren zu können. Tiere bei denen dies nicht der Fall war, wurden nicht in die Wertung aufgenommen. Ebenso konnten Tiere deren Vigilanz eine frühere Tötung verlangte, nicht in die Studie aufgenommen werden.

3.1.1 Immunzellverifizierung mittels immunhistochemischer Verfahren

Die eingewanderten Immunzellen wurden nach immunhistochemischer Färbung lichtmikroskopisch bestimmt und im Zählraster (10 x 10 Kästchen) bei 20facher Vergrößerung ausgezählt. Die jeweils sechs ausgezählten Zellzahlen wurden addiert und als Vergleichsgrößen mit den anderen Summen verglichen.

Sowohl bei mit Zytokin- als auch mit Vehikellösung behandelten Tieren fand sich in allen Gehirnsektionen eine bedeutende Anzahl von infiltrierten inflammatorischen Zellen im Bereich der Tumoren. Interessanterweise zeigte das Gehirnparenchym außerhalb der Tumorfläche keine Zellinfiltration (Abbildung 14).

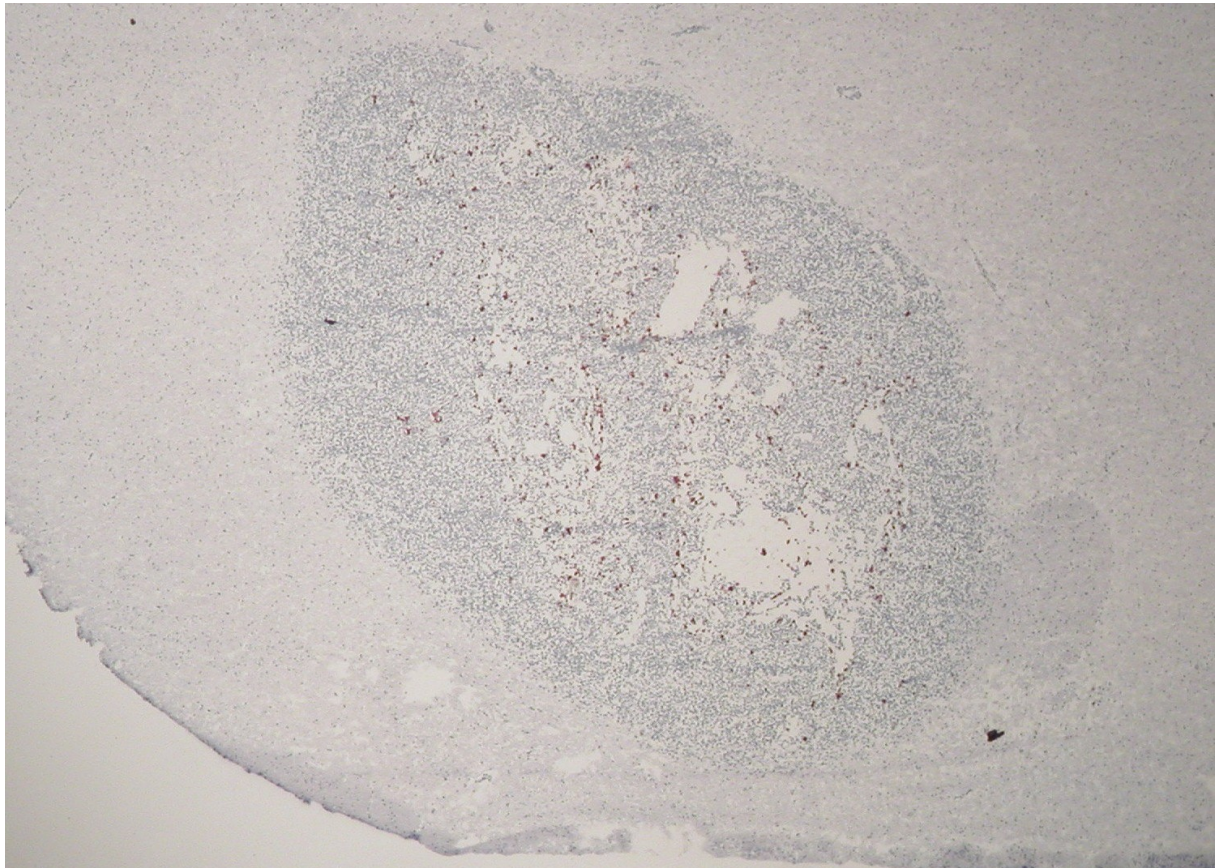


Abbildung 14 Der Rattenhirnschnitt zeigt zahlreiche durch Färbung markierte Immunzellen im Bereich der Tumorfläche. Im Gegensatz dazu wurden keine markierten Zellen im Gehirnparenchym außerhalb des Tumors dargestellt (40fache Aufnahmevergrößerung).

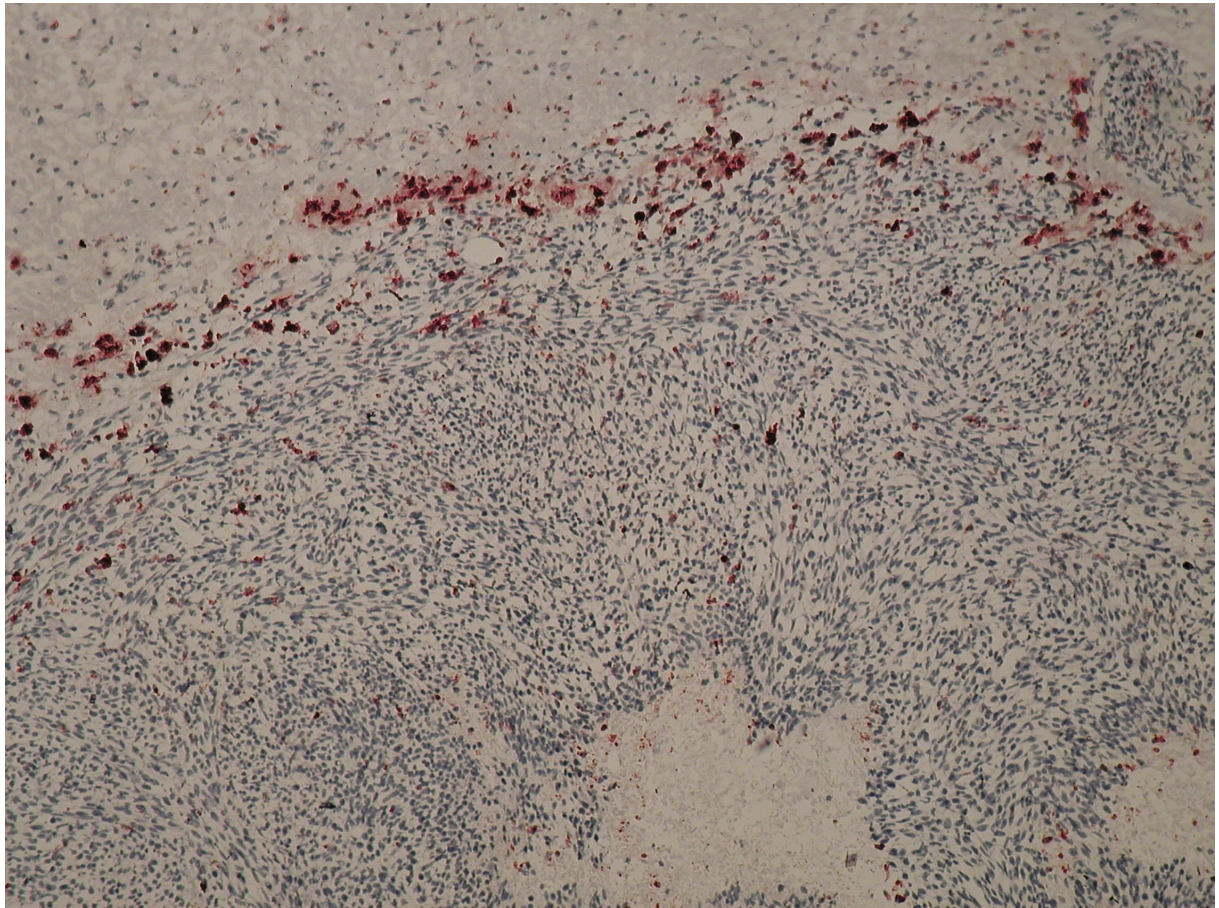


Abbildung 15 Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung der dargestellten markierten Immunzellen im Tumorrandbereich.

Betrachtete man die Zellverteilung innerhalb der Tumorfläche, zeigte sich in den Randzonen eine höhere Zelldichte als in zentralen Bereichen (Abbildung 15 und Abbildung 16).

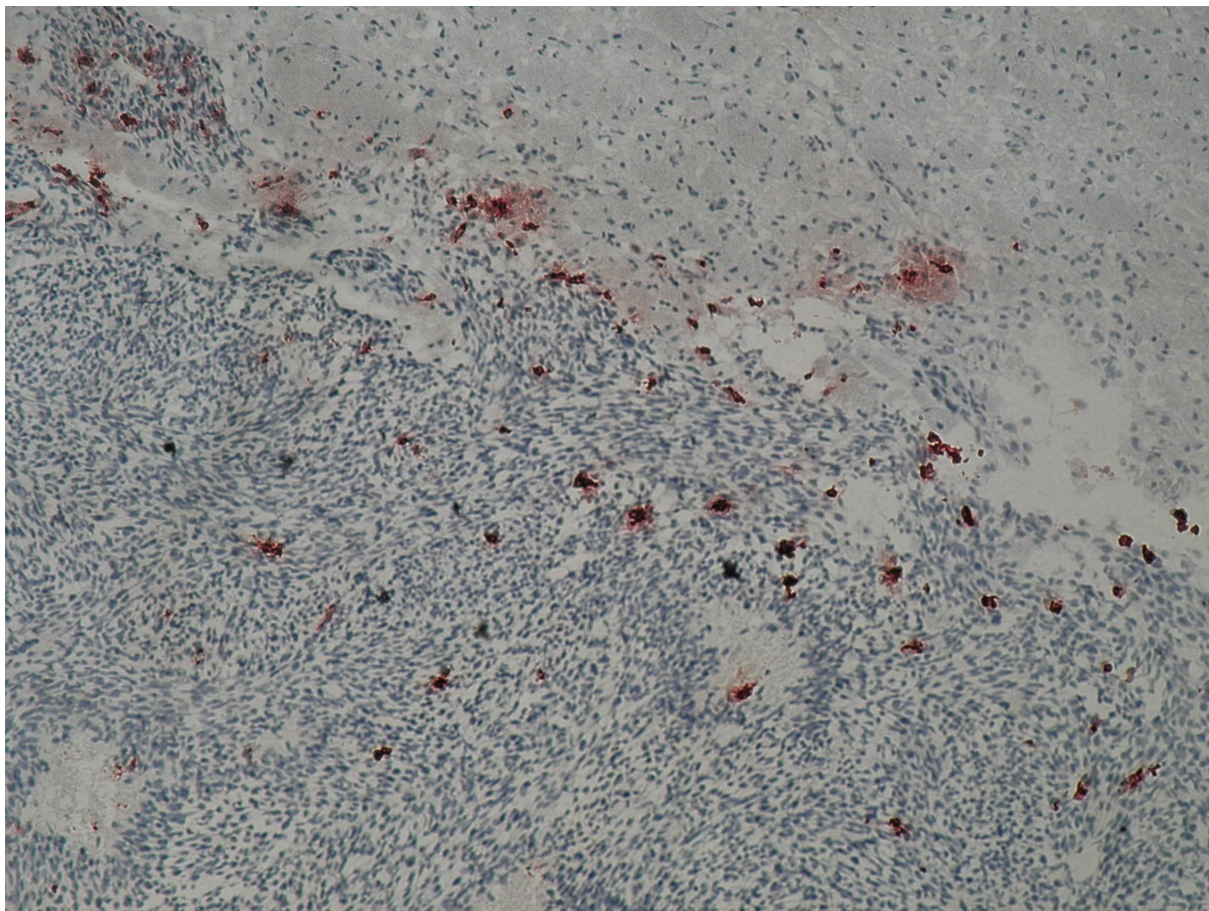


Abbildung 16 Markierte Zellen im Tumorrandbereich (100fache Aufnahmevergrößerung).

Die eingewanderten Immunzellen wurden durch die unterschiedlichen Färbungen mittels Antikörper differenziert (Abbildung 17). So konnten Unterschiede insbesondere in der Zahl von eingewanderten Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, sowie Granulozyten ermittelt werden. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test zur Differenzierung signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$).

Insgesamt führte die Gabe von den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β oder IFN- γ zu einer stärkeren Immunzellinfiltration als die alleinige Infusion von Vehikellösung. Die Menge der insgesamt eingewanderten Immunzellen bei Applikation von IL-1 β verglichen mit IFN- γ zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Antikörper	Antigenpräsentierende Zelle
ED1	Gewebsmakrophagen
HIS48	Granulozyten, erythroide Zellen
OX-6	B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen
W3/25	CD4+ T-Helferzellen, Monozyten
OX-8	CD8+ T-Lymphozyten, NK-Zellen

Abbildung 17 Gegenüberstellung der zur Färbung genutzten Primärantikörper mit den jeweiligen reagierenden Antigenpräsentierenden Zellen.

3.1.1.1 IL-1 β und IFN- γ induzierten starke Einwanderung von Makrophagen und B-Zellen

Sowohl in den immunhistochemischen Färbungen mit ED1-Antikörper, als auch mit OX-6-Antikörper zeigte sich eine hohe Anzahl von gefärbten Zellen innerhalb der Tumorfläche. ED1 – ein IgG1-Mausantikörper – erkennt ein Glykoprotein, das in der Mehrzahl von Makrophagen exprimiert wird (Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20).

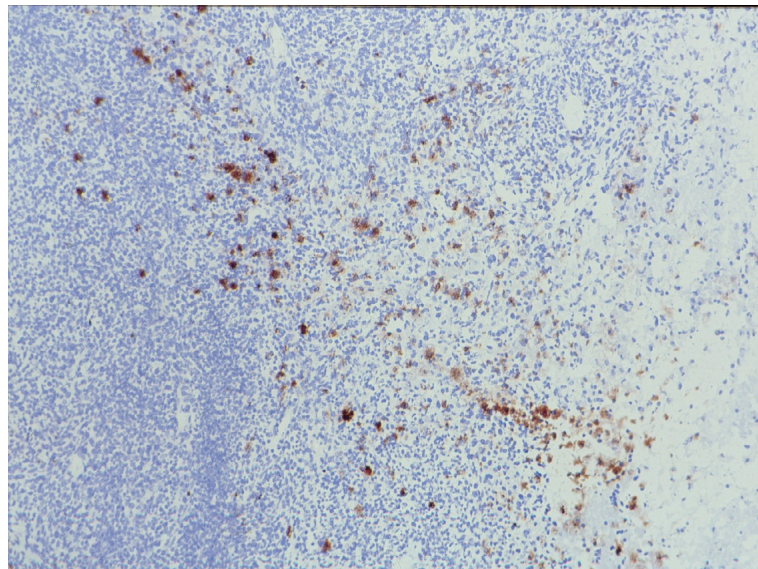


Abbildung 18 Immunzellmarkierung mittels ED1-Färbung. Im Tumorparenchym zeigen sich nach IL-1 β Gabe zahlreiche rotmarkierte Zellen (100fache Aufnahmevergrößerung).

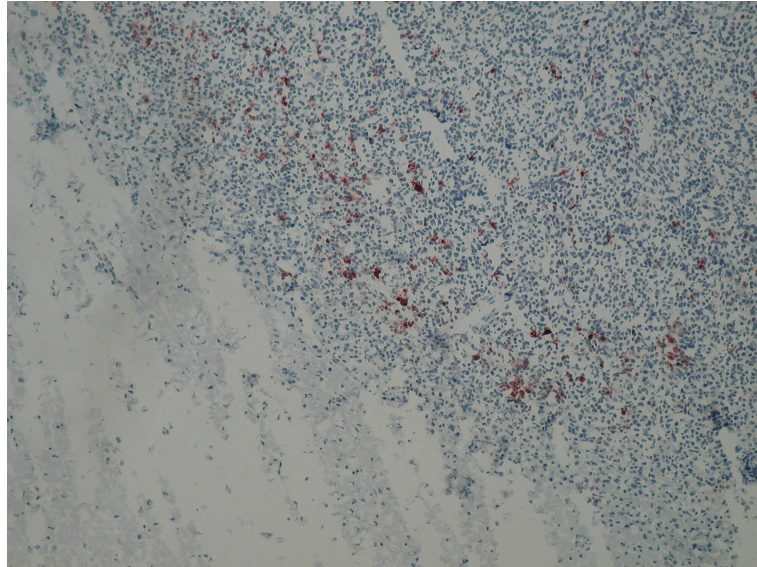


Abbildung 19 Immunzellmarkierung mittels ED1 nach INF- γ -Gabe. Zahlreiche Darstellung von rotgefärbten Zellen besonders im Tumorrandbereich (100fache Aufnahmevergrößerung).

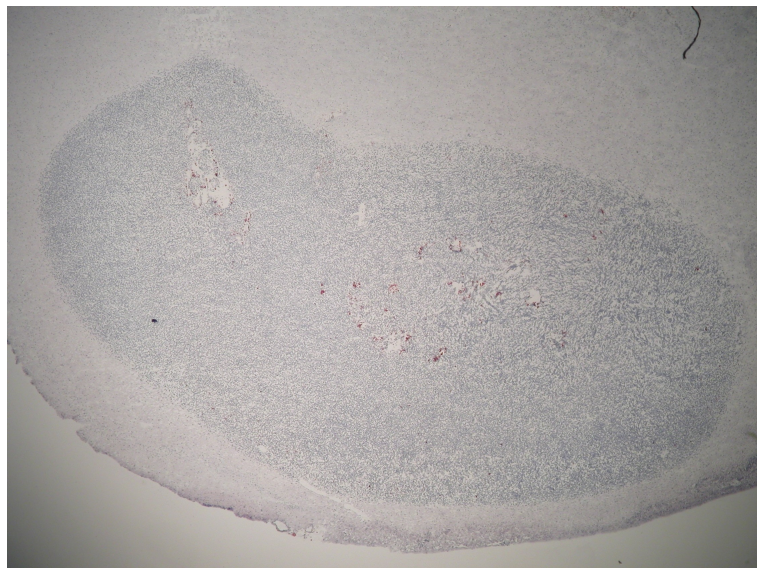


Abbildung 20 Nur wenige mit ED1 markierte Zellen im Tumorparenchym nach Gabe von Vehikellösung. Dargestellt sind Zellen insbesondere im Randbereich von Nekrosen und Gefäßen (40fache Aufnahmevergrößerung).

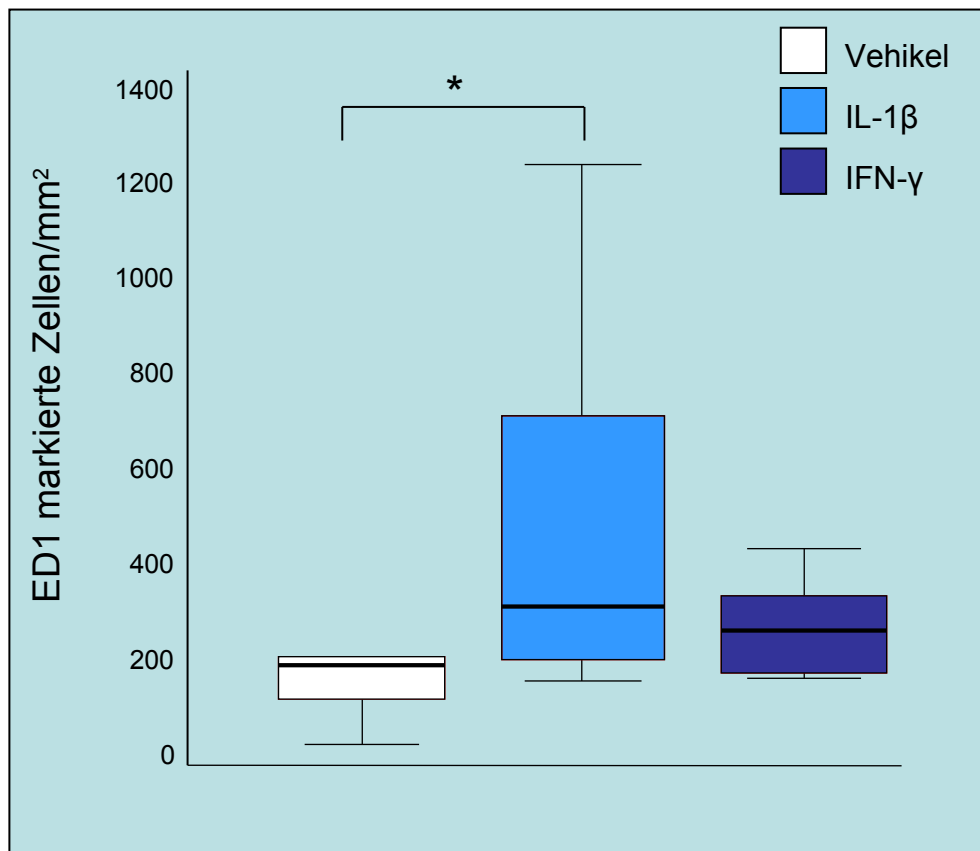


Abbildung 21 Schematisch dargestellt werden die mit ED1 markierten Zellen/mm² anhand ihrer Medianwerte, sowie dem 25. und 75. Percentil mit Maximum und Minimum als Box-Whisker-Plots. Statistisch signifikant als $*=p<0,05$ war der Unterschied zwischen der markierten Zellzahl nach Infusion von IL-1 β und Vehikellösung. Keine signifikanten Unterschiede gab es nach Gabe von IL-1 β und IFN- γ oder Vehikellösung und IFN- γ .

Auch der Mausantikörper OX-6 bindet sich neben B-Lymphozyten an Makrophagen/Monozyten, indem er mit dem von diesen Zellen exprimierten Antigen, entsprechend dem MHC-Klasse-II-Antigen, reagiert (Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24).

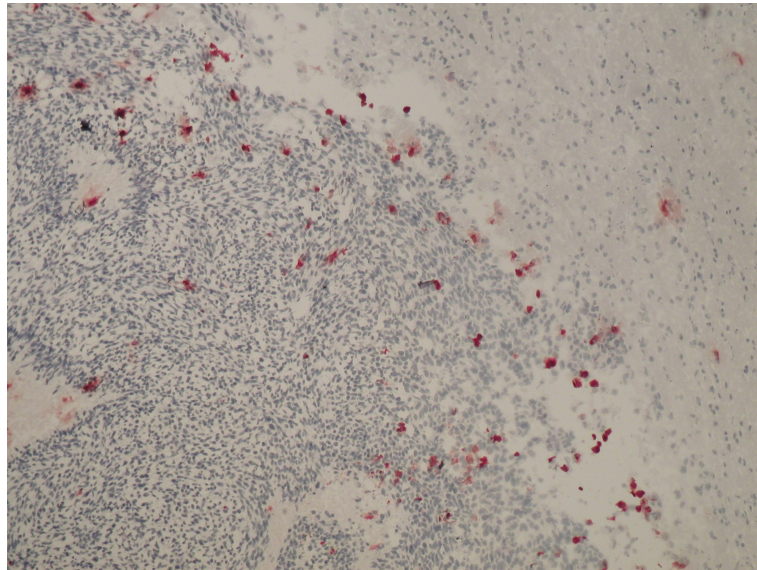


Abbildung 22 Immunzellfärbung mittels OX-6 nach IL-1 β Gabe (100fache Aufnahmevergrößerung).

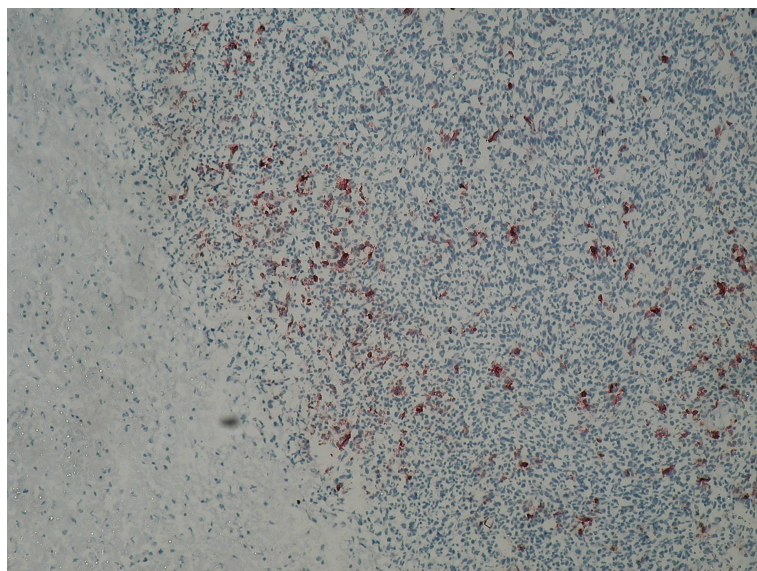


Abbildung 23 Typische Färbung der Immunzellen im Tumorparenchym mittels OX-6 nach IFN- γ -Gabe (100fache Aufnahmevergrößerung).

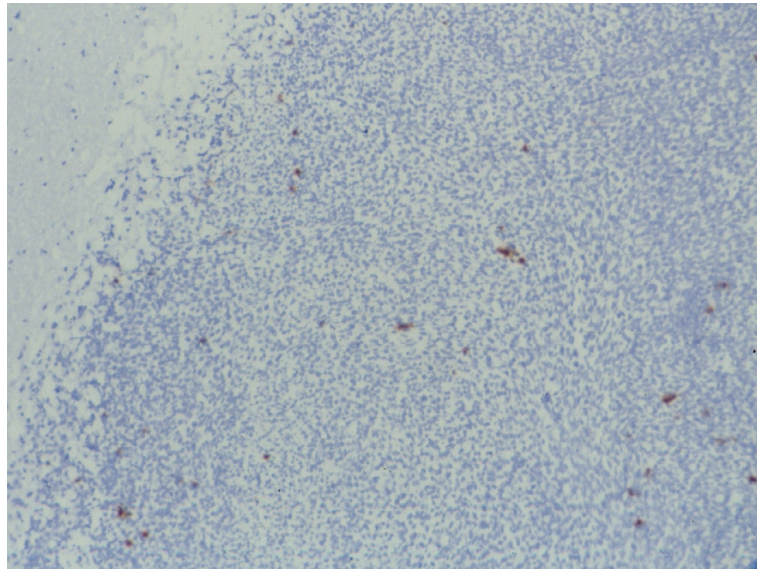


Abbildung 24 Dargestellt nur sehr wenige mit OX-6 markierte Zellen im Tumorparenchym nach Gabe von Vehikellösung (100fache Aufnahmevergrößerung).

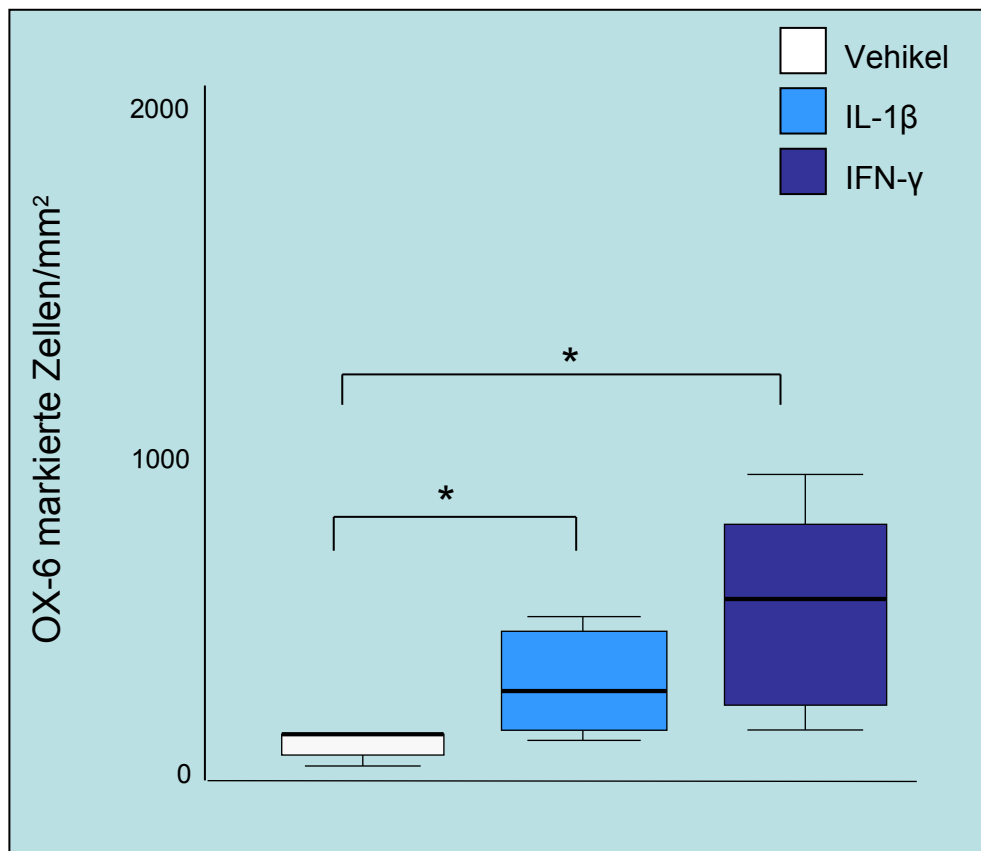


Abbildung 25 Schematisch dargestellt werden die mit OX-6 markierten Zellen/mm² anhand ihrer Medianwerte, sowie dem 25. und 75. Perzentil mit Maximum und Minimum als Box-Whisker-Plots. Statistisch signifikant als $*=p<0,05$ war sowohl der Unterschied zwischen der markierten Zellzahl nach Infusion von IL-1 β und Vehikellösung, als auch nach Infusion von IFN- γ und Vehikellösung. Keine signifikanten Unterschiede gab es nach Gabe von IL-1 β und IFN- γ .

Die Behandlung des Tumors mit kontinuierlicher intrakranieller Gabe von IL-1 β und IFN- γ führte zu einer statistisch signifikant höheren Anzahl von Makrophagen und B-Lymphozyten in der OX-6-Färbung, als bei Ratten nachgewiesen wurde, die nur Vehikellösung erhielten. Mittels der ED1-Markierung zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung gegenüber Vehikelapplikation nur nach Gabe von IL-1 β . Es wurden sowohl in der ED1-Färbung als auch in der OX-6-Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren festgestellt, die IL-1 β oder IFN- γ infundiert bekamen (Abbildung 21 und Abbildung 25).

3.1.1.2 IL-1 β und IFN- γ induzierten starke Einwanderung von T-Zellen

Mit der immunhistochemischen Färbung mit W3/25-Antikörper sowie mit OX-8-Antikörper, konnte ebenfalls eine beträchtliche Anzahl von Zellen markiert werden, wenn auch weit weniger Zellen positiv reagierten, als mittels ED1 und MRC OX-6. Bei W3/25 handelt es sich um einen IgG-Antikörper, der sich an das CD4-Zelloberflächen-Glykoprotein bindet, welches hauptsächlich von T-Helfer-Zellen exprimiert wird (Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28).

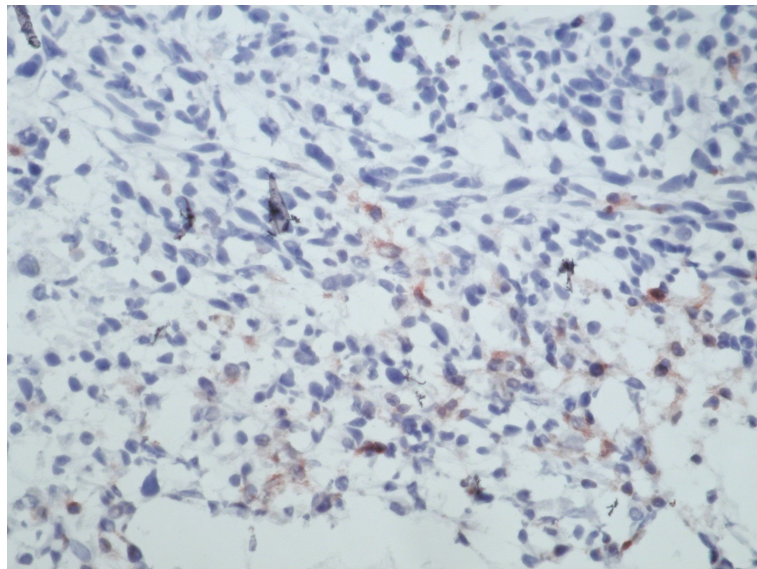


Abbildung 26 Immunzellfärbung mittels W3/25 Antikörper im Tumorparenchym nach Infusion von IL-1 β (400fache Aufnahmevergrößerung).

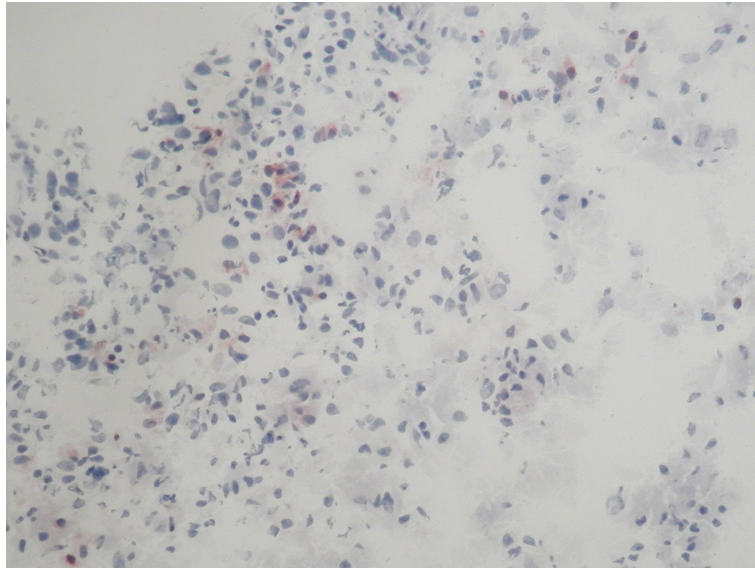


Abbildung 27 Typische Färbung Antigenpräsentierender Zellen im Tumorparenchym mit W3/25 nach IFN- γ -Gabe (200fache Aufnahmevergrößerung).

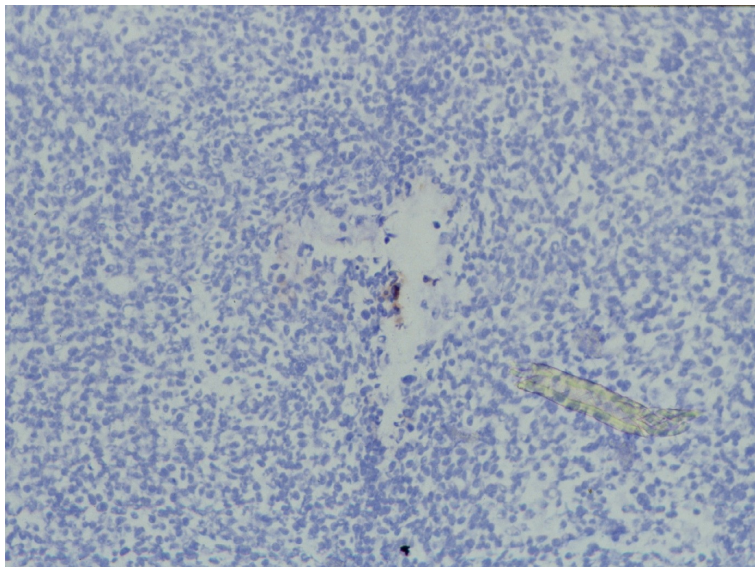


Abbildung 28 Einzelne gefärbte Zelle am Gefäßrand nach Markierung mit W3/25 nach Vehikelgabe (200fache Aufnahmevergrößerung).

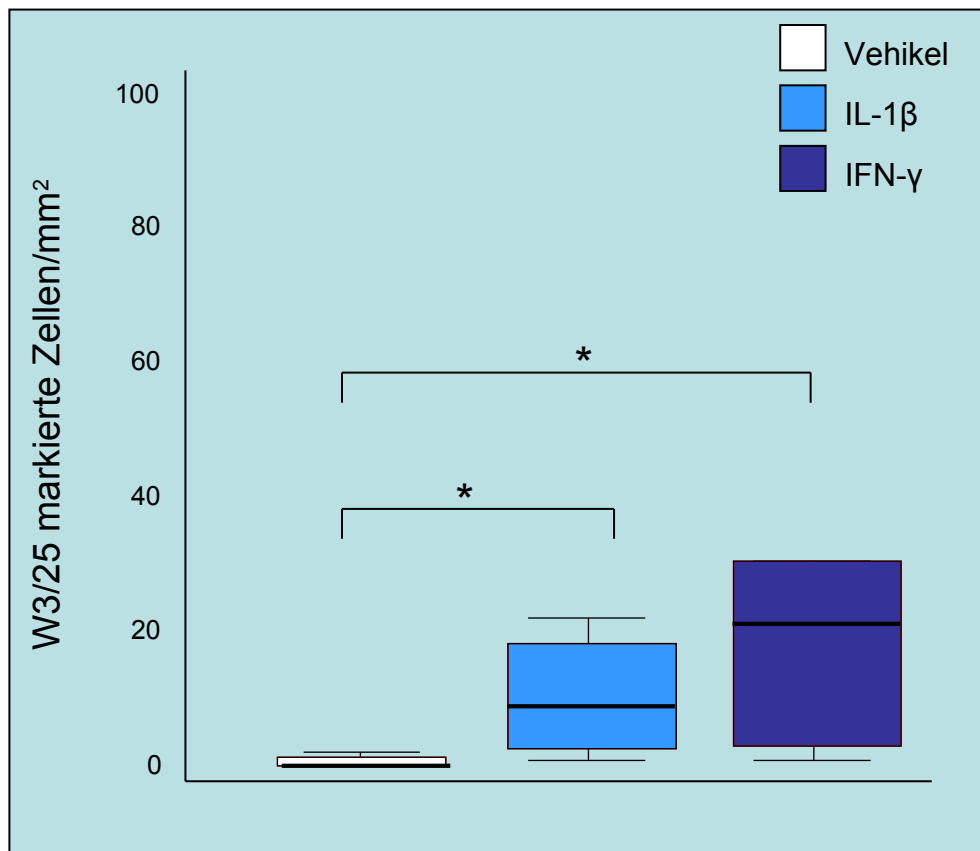


Abbildung 29 Schematisch dargestellt werden die mit W3/25 markierten Zellen/mm² anhand ihrer Medianwerte, sowie dem 25. und 75. Perzentil mit Maximum und Minimum als Box-Whisker-Plots. Statistisch signifikant als $*=p<0,05$ war sowohl der Unterschied zwischen der markierten Zellzahl nach Infusion von IL-1 β und Vehikellösung, als auch nach Infusion von IFN- γ und Vehikellösung. Keine signifikanten Unterschiede gab es nach Gabe von IL-1 β und IFN- γ .

OX-8 ist ein IgG-Antikörper, der das CD8-Zelloberflächenantigen erkennt, welches in der Mehrzahl von T-Lymphozyten (T-Suppressor/zytotoxische T-Zellen) und den meisten NK-Zellen exprimiert wird (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32).

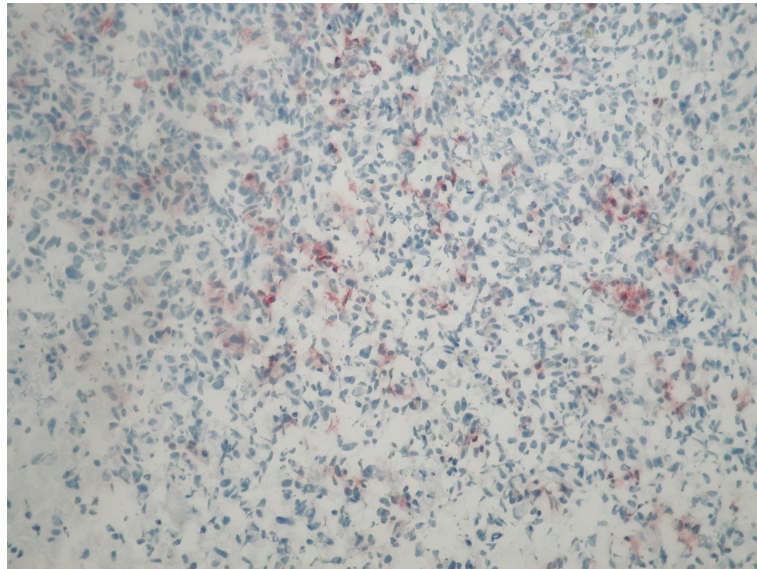


Abbildung 30 Zahlreich markierte Immunzellen nach Färbung mit OX-8 Antikörper nach IL-1 β -Gabe (200fache Aufnahmevergrößerung).

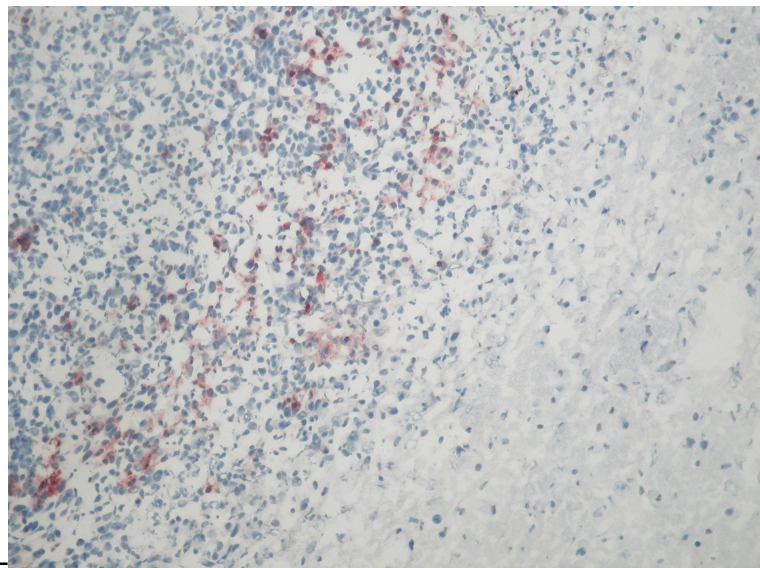


Abbildung 31 Immunzellfärbung mit OX-8 nach IFN- γ -Gabe. Besonders zahlreich sind die angefärbten Zellen im Tumorrandbereich (200fache Aufnahmevergrößerung).

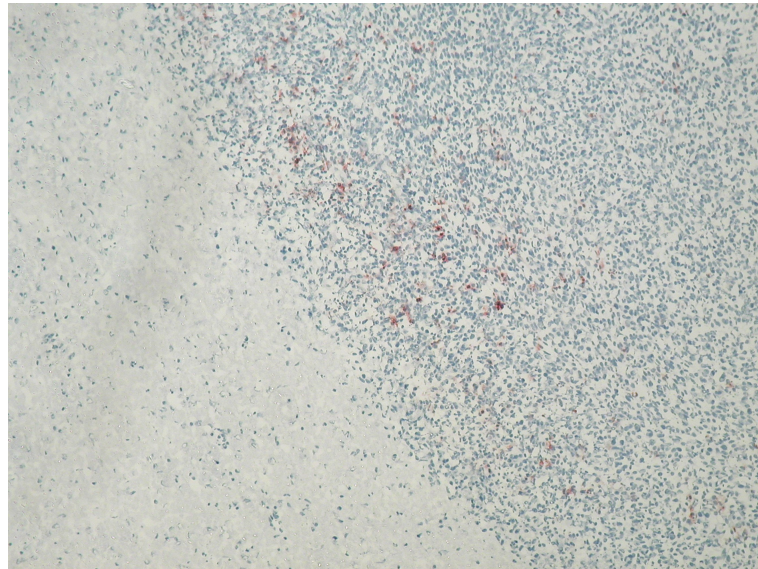


Abbildung 32 Einige markierte Zellen im Tumorrandbereich nach Färbung mit OX-8 nach Vehikelgabe (100fache Aufnahmevergrößerung).

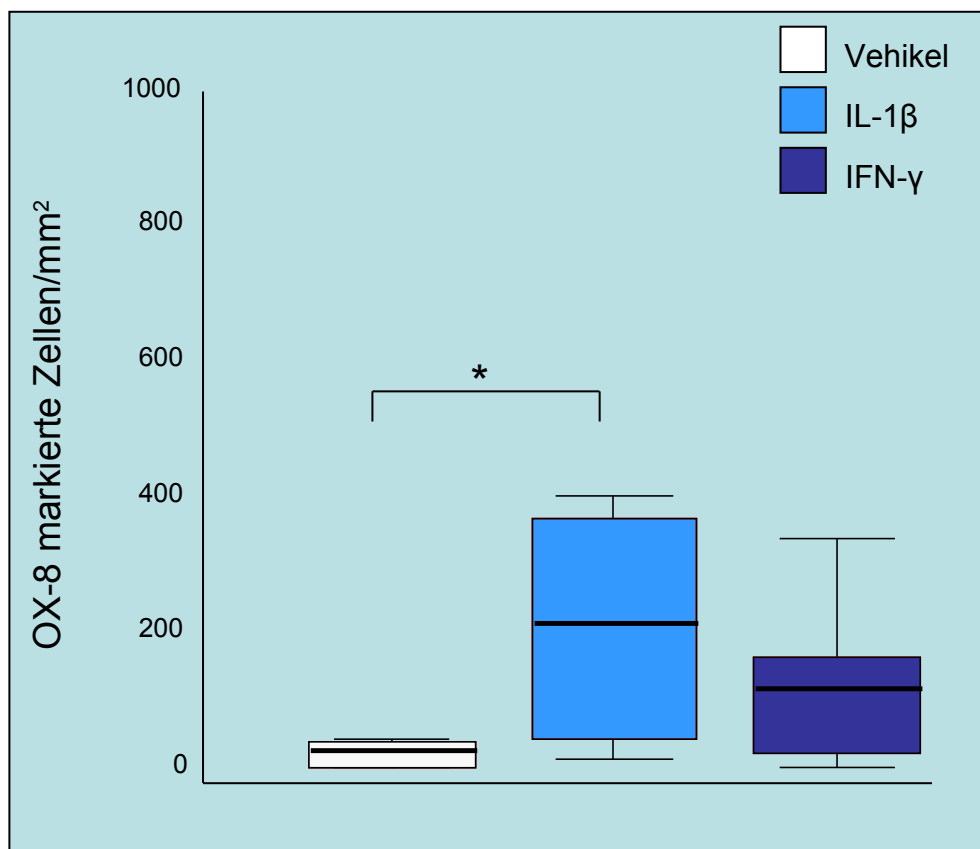


Abbildung 33 Schematisch dargestellt werden die mit OX-8 markierten Zellen/mm² anhand ihrer Medianwerte, sowie dem 25. und 75. Percentil mit Maximum und Minimum als Box-Whisker-Plots. Statistisch signifikant als $*=p<0,05$ war der Unterschied zwischen der markierten Zellzahl nach Infusion

von IL-1 β und Vehikellösung. Keine signifikanten Unterschiede gab es nach Gabe von IL-1 β und IFN- γ oder Vehikellösung und IFN- γ .

Die Anzahl der CD8-positiven Zellen war nur nach der Gabe von IL-1 β im Vergleich zu Vehikellösung statistisch signifikant erhöht, während die CD4-positiven Zellen bei beiden Behandlungen – sowohl IL-1 β als auch IFN- γ – gegenüber Vehikellösung statistisch signifikant erhöht waren. Wieder konnten sowohl nach Markierung mit OX-8, als auch mit W3/25 keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gabe von IL-1 β und IFN- γ ausgemacht werden (Abbildung 29 und Abbildung 33).

3.1.1.3 IL-1 β und IFN- γ induzierten starke Einwanderung von Granulozyten

Eine größere Anzahl von in das Tumorgewebe eingewanderten Zellen konnte nach der Gabe von IL-1 β und IFN- γ immunhistologisch mittels HIS48 farblich markiert werden. Bei HIS48 handelt es sich um einen IgM-Antikörper, der in der Mehrzahl mit Granulozyten reagiert (Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 36).

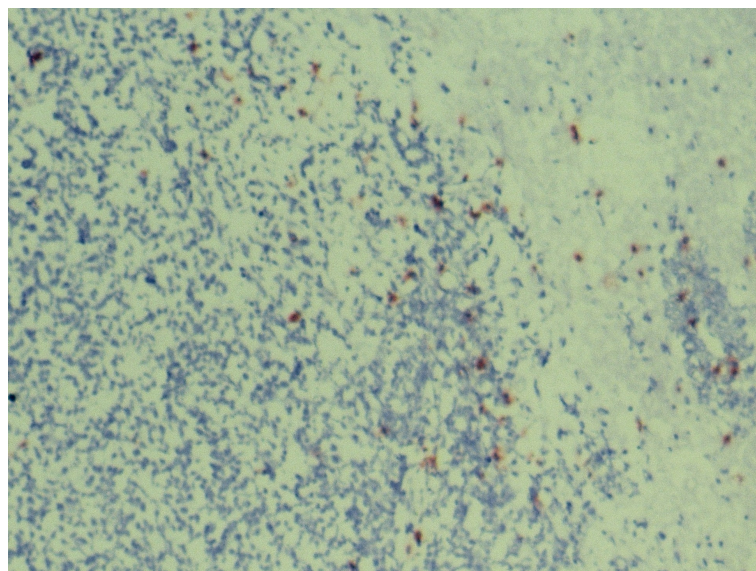


Abbildung 34 Einige mit HIS48 Antikörper markierte Immunzellen nach Gabe von IL-1 β (100fache Aufnahmevergrößerung).

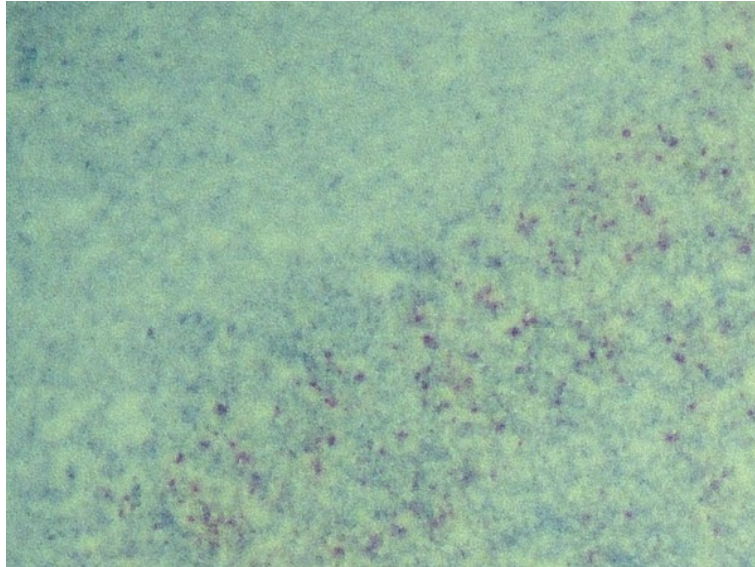


Abbildung 35 Besonders im Tumorrandbereich mit HIS48 Antikörper markierte Zellen nach IFN- γ -Gabe (100fache Aufnahmevergrößerung).

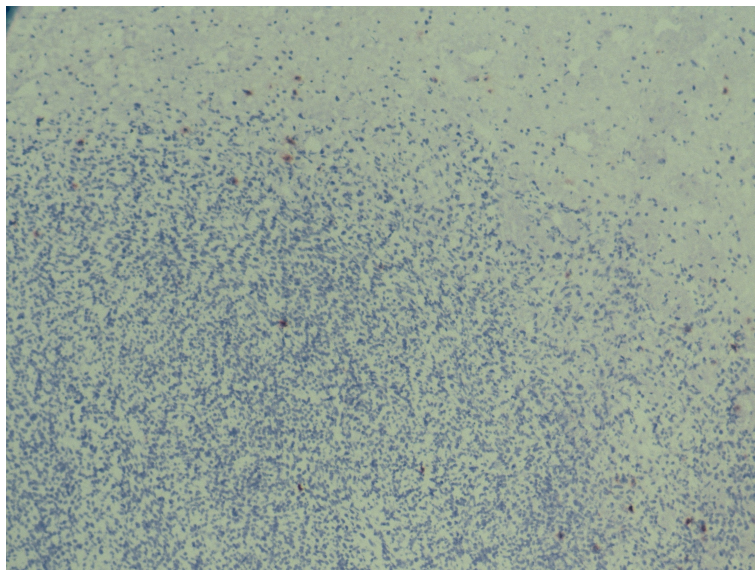


Abbildung 36 Wenige markierte Zellen nach HIS48 Färbung nach der Gabe von Vehikellösung (100fache Aufnahmevergrößerung).

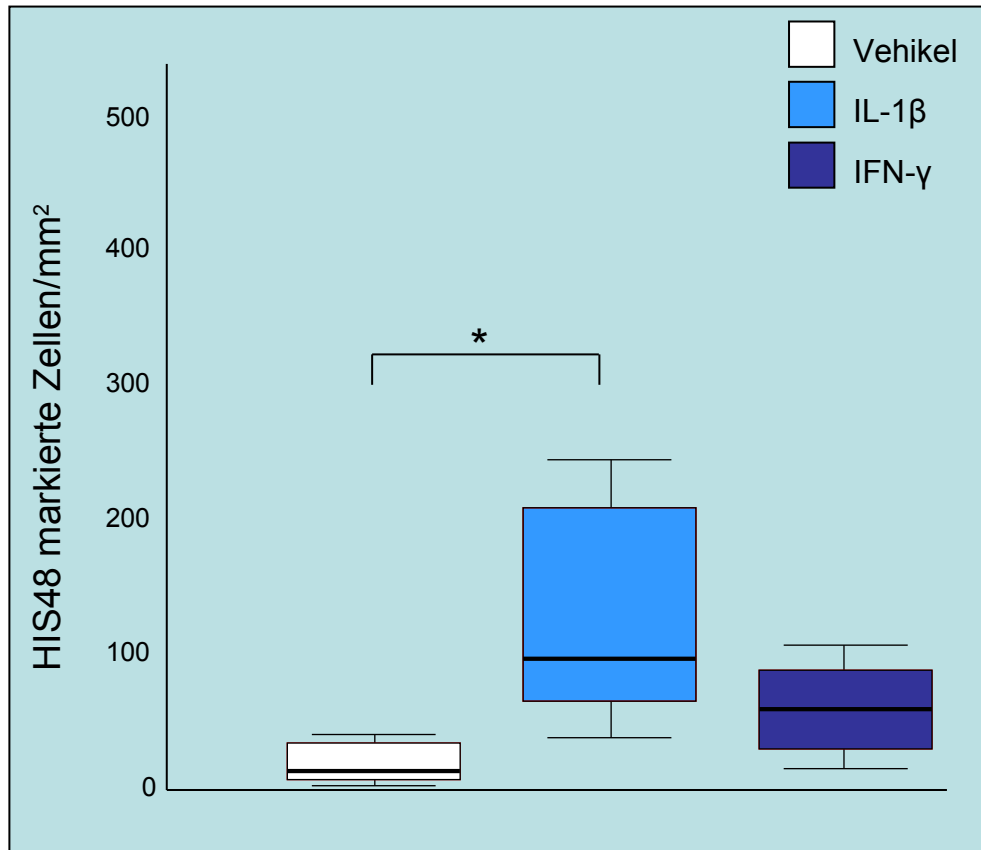


Abbildung 37 Schematisch dargestellt werden die mit HIS48 markierten Zellen/mm² anhand ihrer Medianwerte, sowie dem 25. und 75. Perzentil mit Maximum und Minimum als Box-Whisker-Plots. Statistisch signifikant als $*=p<0,05$ war der Unterschied zwischen der markierten Zellzahl nach Infusion von IL-1 β und Vehikellösung. Keine signifikanten Unterschiede gab es nach Gabe von IL-1 β und IFN- γ oder Vehikellösung und IFN- γ .

Die Anzahl der nach IL-1 β -Gabe eingewanderten Granulozyten war statistisch signifikant höher als nach der Infusion von Vehikellösung. Nach Gabe von IFN- γ zeigte sich keine statistisch signifikante Erhöhung. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gabe von IL-1 β und IFN- γ ausgemacht werden (Abbildung 37).

3.1.2 Einwirkung der Zytokininfusion auf die Tumorgröße

Die Tumorfläche wurde in den immunhistologischen Schnitten im Bereich des Stichkanals in mm^2 berechnet. Leider zeigte sich in keinem der Versuchsfälle eine vollständige Tumorregression nach Infusion von Zytokinlösung. Ebenso konnten keine statistisch signifikant kleineren Tumorflächen nach Gabe von IL-1 β oder IFN- γ im Vergleich zu reiner Vehikellösung festgestellt werden.

Interessanterweise zeigte aber ein Vergleich der Tumorgröße mit der Anzahl der jeweils eingewanderten Immunzellen eine negative Korrelation in der Korrelationsberechnung nach Pearson. Eine hohe Anzahl von eingewanderten Immunzellen ging also mit einem kleineren Tumor einher. Dies galt mit statistischer Signifikanz für mit ED1-, MRC OX6-, HIS48- und MRC OX-8-Antikörper positiv markierten Zellen. Die Anzahl der eingewanderten Makrophagen/Monozyten und B-Zellen, T-Suppressor/zytotoxischen T-Zellen und Granulozyten korrelierten also invers (Abbildung 38). Keine signifikante Korrelation wurde zwischen der Anzahl der CD4+ T-Helferzellen in Reaktion mit W3/25 und der Tumorgröße gefunden. Dass die hohe Anzahl der Immunzellen zu einer beginnenden Regression des Tumors führte, lässt sich vermuten.

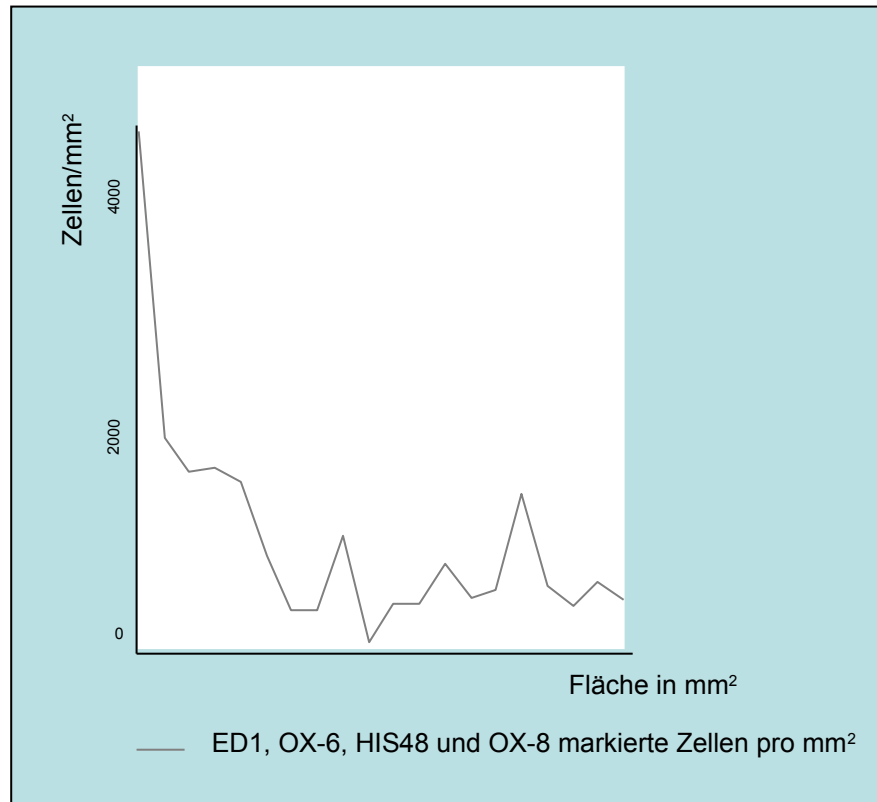


Abbildung 38 Schematische Darstellung der negativen Korrelation nach Pearson zwischen Tumorgröße und eingewanderten markierten Immunzellen.

3.2 Versuchsreihe II – Überlebensstudie

Bei den Tieren, die an der Überlebensstudie teilnahmen, wurden jeweils vor und nach der Infusion mit Vehikel- bzw. IL-1 β -Lösung MRT-Aufnahmen zur Bestimmung der Tumorgröße durchgeführt. Im Vergleich der jeweiligen Aufnahmereihen wurden die größten Tumorflächen als mittlere Vergleichsgrößen betrachtet. Vor der zweiten MRT-Aufnahme mussten die Pumpensysteme operativ entfernt werden. Auch hier wurde auf eine vorher gute Fixation der Pumpenköpfe geachtet und Tiere gegebenenfalls der Wertung entzogen. Tiere die aufgrund des schlechten Gesundheitszustandes vor Abschluss der MRT-Aufnahmen getötet werden mussten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Wie in der Versuchsreihe I konnte auch in der Auswertung der Überlebensstudie keine signifikante Verkleinerung der Gehirntumoren bei IL-1 β -Gabe gegenüber von Vehikelfusion nachgewiesen werden (Abbildung 39 und Abbildung 40).

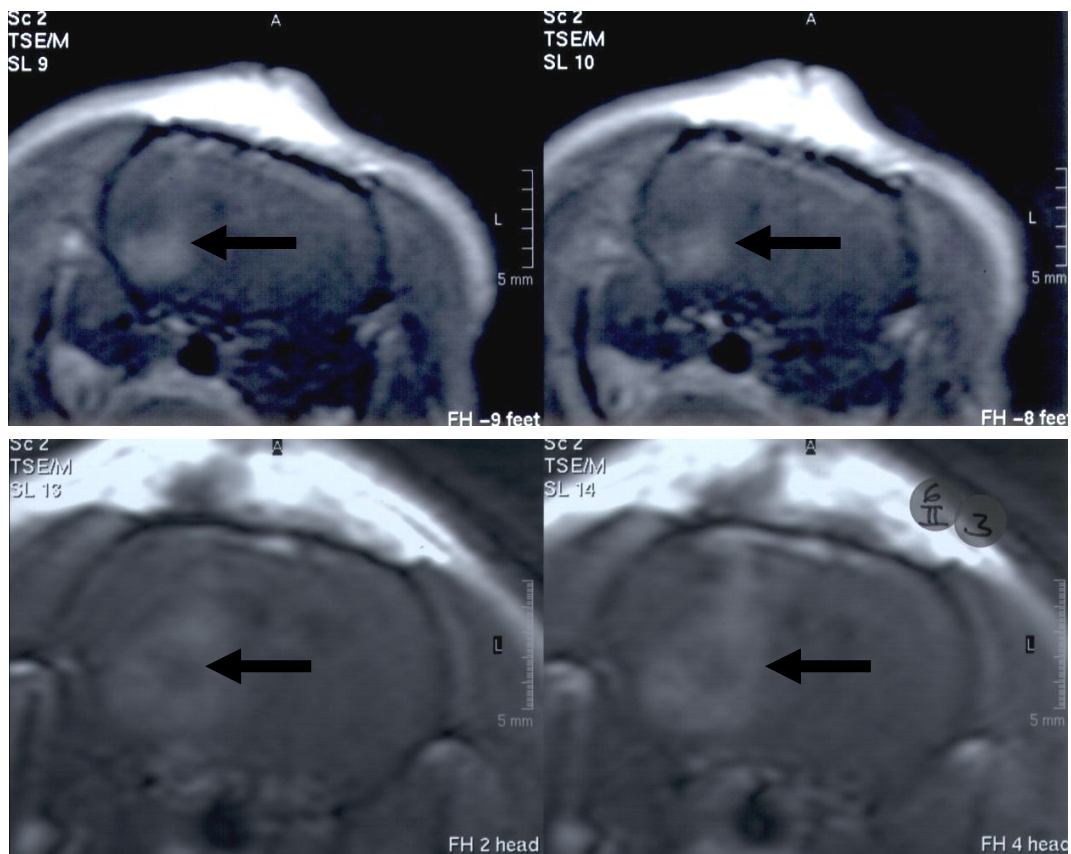


Abbildung 39 Darstellung des Rattenhirns mit Glioblastom in der linken Hemisphäre mittels MRT (T1-Wichtung) vor der Gabe von IL-1 β (oben) und nach der Gabe von IL-1 β (unten). Neben Beachtung des näheren Zooms unten, dennoch eher sichtbare Vergrößerung des Tumors und Zunahme des Ödems.

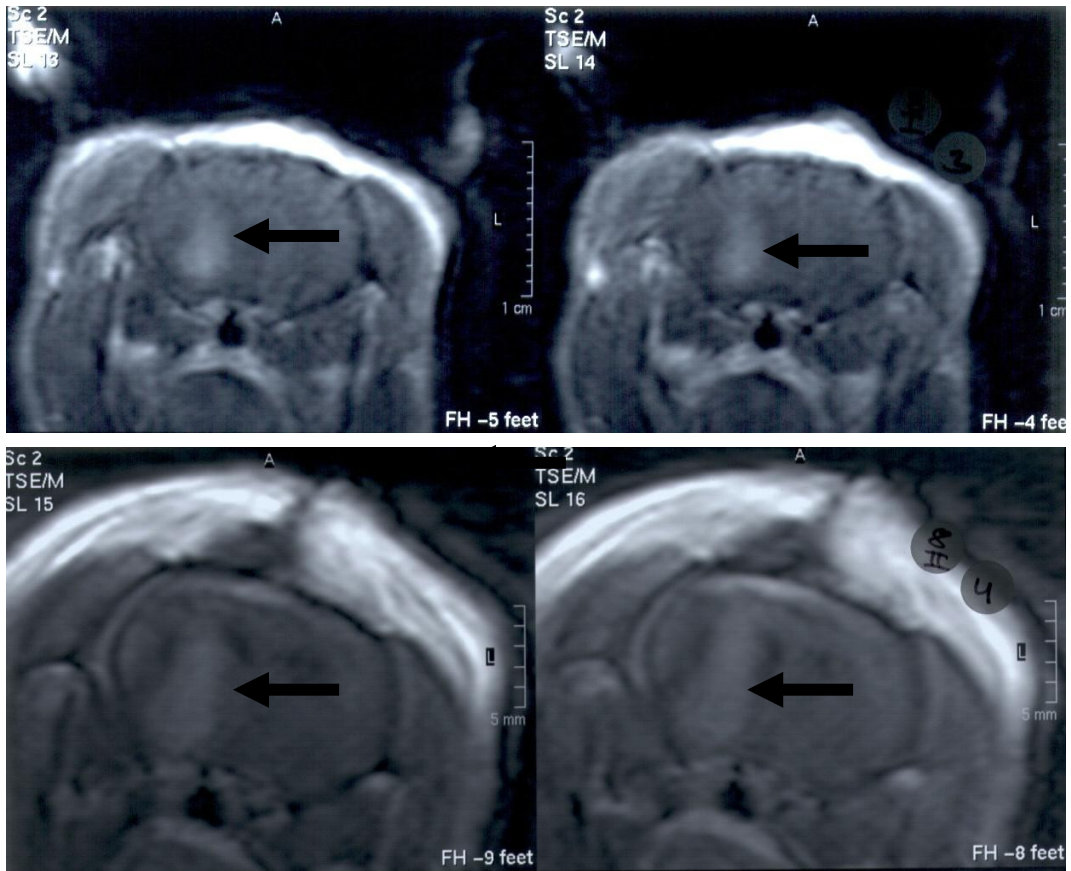


Abbildung 40 Darstellung des Rattenhirns mit Glioblastom in der linken Hemisphäre mittels MRT (T1-Wichtung) vor der Gabe von Vehikellösung (oben) und nach der Gabe von Vehikellösung (unten).

		Mittelwert	Median
Überlebenszeit in Tagen der mit Vehikel behandelten Tiere	7;7;4;2;6;8;8;2	5,5	6,5
Überlebenszeit in Tagen der mit IL-1 β behandelten Tiere	4;7;4;2;9;6;2;4;3	4,5	4

Abbildung 41 Die Tabelle zeigt die einzelnen Überlebenszeiten in Tagen nach Beginn der Behandlung der an der Überlebensstudie beteiligten Tiere, sowie den gebildeten arithmetischen Mittelwert und Median. Diese zeigen keine statistische Signifikanz im Vergleich.

Außerdem zeigten sich leider keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit und dem gesundheitlichem Zustand zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 41).

4 Diskussion

In den letzten Jahren wurden verschiedenartige Studien durchgeführt, um eine Immunantwort gegen Gliome mittels biologisch modifizierter Faktoren zu erreichen. Obwohl einige klinische Studien zur Immuntherapie vermuten ließen, dass Gliome resistent gegenüber antikörpergeführter oder zellulärer Immuntherapie sind (Barba *et al.* 1989; Weller *et al.* 1995), demonstrierten zahlreiche Studien die Infiltration von menschlichen oder experimentellen Gliomen mit inflammatorischen Zellen (Brooks *et al.* 1972; Morioka *et al.* 1992; Tjuvajev *et al.* 1995), was folgern lässt, dass Gliome empfindlich auf eine humorale oder zellvermittelte Immunantwort sind.

4.1 CED als Applikationsart

Unterschiedliche Varianten von Applikationsarten für Therapeutika, wie zum Beispiel die systemische Gabe, sowohl intravenös als auch intraarteriell und die lokale Darreichung von beispielsweise genetisch veränderten Zellen und Biopolymeren wurden untersucht (Dunn *et al.* 2003; Marras *et al.* 2003). Die systemische Gabe zeigte jedoch beträchtliche Toxizität und die lokale Applikation von genetisch veränderten Zellen zur Produktion von Zytokinen, bzw. Biopolymeren führte nur per Diffusion zu einer Zytokinverbreitung am Behandlungsort.

Ein wichtiger Faktor, der zur reduzierten Bildung einer Immunantwort im Gehirn beziehungsweise direkt in Glioblastomen beiträgt, ist die Blut-Hirn-Schranke, die das Eintreten von inflammatorischen Zellen und löslichen immunregulierenden Molekülen in das zentrale Nervensystem reguliert (Miller 1999). Über den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, welcher durch Hirntumoren und Traumen verursacht wird, können inflammatorische Zellen leichter in das Gehirn gelangen. Gezeigt wurde auch, dass aktivierte T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn wandern können (Marras *et al.* 2003).

Eine vielversprechende neue Technik zur Medikamentenapplikation, die die Blut-Hirn-Schranke umgeht und gleichzeitig die lokale Therapeutikakonzentration maximiert, ist

convection enhanced delivery, welche bereits in tierexperimentellen und klinischen Studien demonstriert werden konnte (Bruce *et al.* 2000; Kaiser *et al.* 2000; Laske *et al.* 2000). CED versucht die Einschränkungen der einfachen Diffusion mittels eines positiven Infusionsdrucks zu überwinden, indem Makromoleküle unter dem Druckgradienten verteilt werden (Bobo *et al.* 1994). Mittels CED ins Gehirn konnte eine bis zu zehntausendfach höhere Konzentration im Vergleich zur venösen Gabe erreicht werden (Groothuis *et al.* 1999). Vorhergehend konnte bereits gezeigt werden, dass die intrazerebroventrikuläre 48stündige Gabe von Oligodeoxynukleotiden mittels CED zu einer ausgeprägten Meningoenzephalitis mit Einwanderung von Immunzellen in das Gehirnparenchym im Rattenmodell führte. Die eingewanderten Immunzellen waren überwiegend Monozyten/Makrophagen und Granulozyten. Lymphozyten, die für eine zellvermittelte Immunantwort wichtig wären, konnten bisher nicht nachgewiesen werden (Elepfandt *et al.* 2002). Ebenfalls konnte im Rattenmodell nach 48stündiger Gabe von IL-1 β intrazerebroventrikulär mittels CED eine starke Zelleinwanderung beobachtet werden. Die Immunzellen ließen sich sowohl im Liquor, als auch im Hirnparenchym nachweisen. Auch hier wurden mehrheitlich Granulozyten und Monozyten gezeigt (Schöning *et al.* 2002).

4.2 Immunzelleinwanderung nach Zytokingabe

Es ist bereits eine Assoziation zwischen dem vermehrten Auftreten von Gliazellen durch IL-1 β und der Überlebenszeitverbesserung von Glioblastompatienten dokumentiert (Cuny *et al.* 2002). Weitere Zytokine, wie TNF- α , IL-2 und IFN- γ wurden gentechnisch genutzt, um eine Tumorregression hervorzurufen (Zeltzer *et al.* 1999).

In dieser Studie konnte nun erstmals erfolgreich nachgewiesen werden, dass mittels kontinuierlicher Infusion von IL-1 β und IFN- γ über 48 Stunden eine starke Einwanderung verschiedener Immunzellen erreicht wurde. Die Ergebnisse zeigten das zahlreiche, mittels Färbung nachgewiesene Vorhandensein von insbesondere Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten (Abbildung 17) sowohl nach Gabe von IL-1 β als auch nach Gabe von IFN- γ . Insgesamt führte die Behandlung mit IL-1 β und IFN- γ in der vorliegenden Studie zu recht ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Art und Anzahl der durch Färbung markierten Immunzellen.

Makrophagen/Monozyten konnten mittels ED-1-Antikörper- und OX-6-Antikörper-Markierung nach Zytokingabe nachgewiesen werden. Insbesondere nach IL-1 β -Infusion konnte eine signifikant höhere Anzahl von Makrophagen/Monozyten mittels ED-1-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 21). In der OX-6-Färbung zeigte sich insbesondere eine verstärkte Erhöhung der Zellzahl nach Infusion von IFN- γ (Abbildung 25), was darauf schließen ließe, dass hier in erhöhten Mengen neben Makrophagen/Monozyten auch unter anderem **B-Lymphozyten** nachgewiesen werden konnten. Nach Gabe von IL-1 β zeigten sich die mit OX-6 markierten Zellen in ihrer Anzahl ebenfalls signifikant erhöht.

Ähnlich fielen die Nachweise mittels W3/25-Antikörper-Markierung aus. Auch hier konnten nach IFN- γ -Infusion vermehrt **CD4+ Zellen**, also insbesondere **T-Helferzellen** und auch **Monozyten**, nachgewiesen werden. Eine signifikante Erhöhung der CD4+ Zellen zeigte sich ebenfalls nach IL-1 β -Gabe (Abbildung 29).

Besonders hervorzuheben ist der positive Nachweis von **CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten** und möglicherweise auch **NK-Zellen** mittels OX-8-Markierung nach IL-1 β -Gabe. Es zeigte sich eine deutliche, signifikante Zellzahlerhöhung gegenüber der Gabe von Vehikellösung (Abbildung 33). CD8+ zytotoxische T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Antitumorimmunität, da diese die Tumorzellen direkt erkennen und abtöten können.

Auch **Granulozyten** konnten mittels HIS48-Antikörper-Markierung nach IL-1 β -Infusion signifikant erhöht nachgewiesen werden (Abbildung 37).

Frühere immunhistochemische Studien am Rattengliommodell untersuchten die Einwanderung inflammatorischer Zellen. Es konnten ebenfalls Makrophagen und Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese gliederten sich in MHC-II präsentierende Blutmonozyten und Mikroglia, sowie unterschiedliche Populationen von CD4+ und CD8+ Lymphozyten. Wie auch in der vorliegenden Studie mit Zytokinbehandlung überwogen die CD8+ Lymphozyten (Morioka *et al.* 1992).

Nicht zuletzt sollte hervorgehoben werden, dass insbesondere das Vorhandensein von Lymphozyten im Gehirn auf Antigenerkennung und Antigenpräsentation hinweist.

Möglicherweise wurden Gliazellen und Blutmonozyten von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Aktivierte Lymphozyten, Makrophagen, Astrozyten und Gliazellen wiederum produzieren inflammatorisch wirkende Zytokine (unter anderem INF- γ und IL-1 β) und halten so die Immunreaktion am Laufen.

Interessanterweise weist die Tatsache, dass Immunzellen in höherer Anzahl am Tumorrand nachgewiesen wurden anstatt in der Tumormitte (Abbildung 15), auf eine Invasion von umliegender Mikroglia hin. Die Einwanderung von Zellen in Tumorgewebe wurde auch in früheren Studien beobachtet. Auch dort wurden inflammatorische Zellen insbesondere im Tumorgewebe und direkter Umgebung sowie um Blutgefäße gefunden (Saleh *et al.* 2000; Proescholdt *et al.* 2001).

4.2.1 Infusion von IL-1 β

Dies ist die erste Studie, die die Effekte der intratumoralen Gabe von IL-1 β analysiert, ein proinflammatorisches Schlüsselzytokin, welches die Produktion einer Reihe weiterer Zytokine initiiert. Es konnte beobachtet werden, dass diese Behandlung auch eine signifikante Immunzelleinwanderung in den Gehirntumor, verglichen mit Vehikellösung behandelten Tieren, hervorrief. Die infiltrierten Immunzellen waren durch ED1, beziehungsweise OX6 Markierung nachgewiesene Makrophagen/Monozyten (Abbildung 21, Abbildung 25), mit dem Antikörper HIS48 markierte Granulozyten (Abbildung 37) und durch Färbung mit OX6, W3/25 und OX8 nachgewiesene Lymphozyten (Abbildung 25, Abbildung 29, Abbildung 33). Insbesondere die Anzahl von infiltrierten zytotoxischen CD8 $^+$ T-Zellen zeigte sich in der OX-8-Färbung beeindruckend erhöht (Abbildung 33) (Abbildung 42).

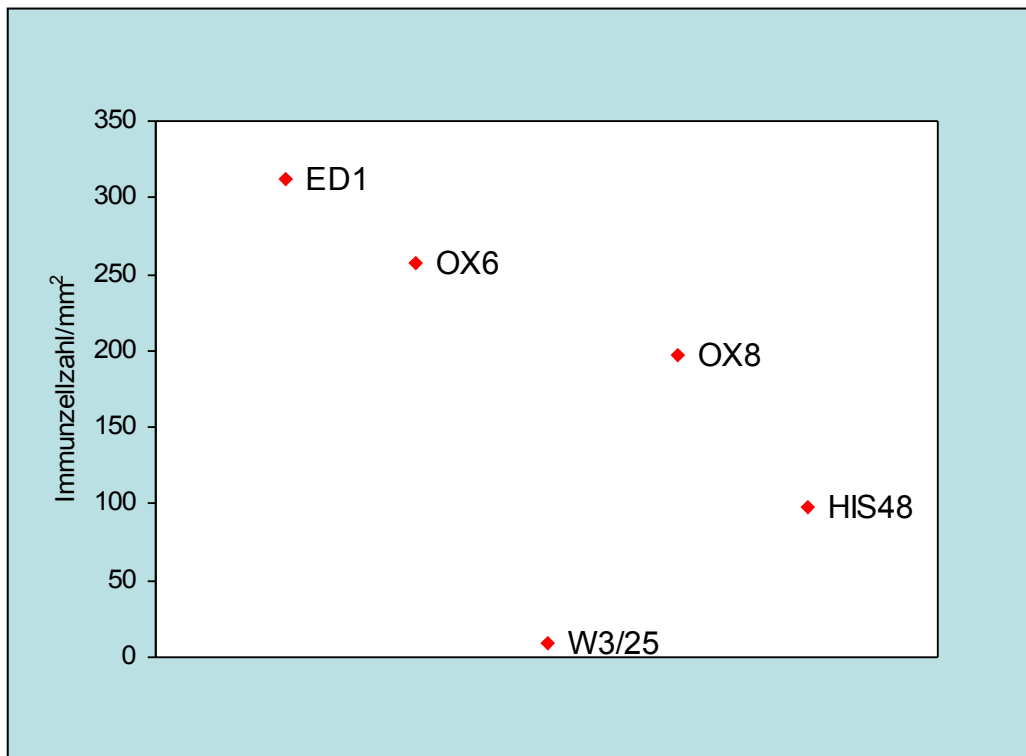


Abbildung 42 Dargestellt ist die Anzahl der nach IL-1 β Behandlung mittels Färbung markierten Immunzellen/mm² als Medianwerte. ED1 und OX6 markierten Makrophagen/Monozyten, OX6 außerdem auch B-Lymphozyten. W3/25 markierte B-Lymphozyten, OX8 T-Lymphozyten und HIS48 Granulozyten. Besonders beeindruckend sind der hohe Wert für T-Lymphozyten mittels OX8 Färbung und die hohen Nachweise von Makrophagen/Monozyten mittels OX6 und ED1 Färbung.

Es konnte bereits in einem Rattenglioblastommodell nach genetisch modifizierter IL-4 Freisetzung eine sehr starke Erhöhung von CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden, welche mit einer Tumorregression und einer Verlängerung der Überlebenszeit einherging (Benedetti *et al.* 1999).

In einer früheren Studie konnte bereits demonstriert werden, dass die Zahl der infiltrierenden Immunzellen ins Gehirn mit der damals in den Ventrikel infundierten IL-1 β -Konzentration korrelierte. Es wurde die Einwanderung von Immunzellen in das Rattenhirn nach lokaler IL-1 β -Infusion über 48 Stunden untersucht. Nachgewiesen wurden im Hirnparenchym Granulozyten und Monozyten mittels HIS48, ED-1 und OX-6 Markierung. 48 Stunden nach Infusion wurden die höchsten Vorkommen an Leukozyten gezählt, die ersten Granulozyten zeigten sich bereits vier bis acht Stunden nach Beginn der Infusion. Monozyten dagegen zeigten sich vermehrt erst nach 48 Stunden im

Hirnparenchym. Das Vorkommen von Lymphozyten wurde damals nicht nachgewiesen (Schöning *et al.* 2002). Wenige Jahre zuvor konnte bereits nach intrazerebraler Gabe von IL-1 β eine Meningoenzephalitis mit Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und Immunzellinflammation bei Ratten demonstriert werden (Woiciechowsky *et al.* 1999). Nachgewiesen werden konnten ebenfalls 4 Stunden nach Zytokingabe neutrophile Granulozyten (Anthony *et al.* 1997).

4.2.2 Infusion von IFN- γ

Interessanterweise wurde gezeigt, dass genetisch modifizierte Tumoren, die INF- γ freisetzen, fähig sind, die Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen der Mikrogliazellen zu erhöhen. Normalerweise verfügt das Gehirn über eine geringe Expression von MHC-I und –II Molekülen verglichen mit anderen Geweben (Lampson *et al.* 1995). Inflammatorische Zytokine scheinen ein Schlüsselregulator in dieser niedrigen Expression von MHC-I und –II Molekülen zu sein. Die Hochregulation der Expression von MHC-I und –II Molekülen durch IFN- γ wiederum führte zur T-Zell-Aktivierung, ein Schlüsselmechanismus in der zellvermittelten Anti-Tumor-Immunantwort (Fathallah-Shaykh *et al.* 1998; Xu *et al.* 1994; Haroun *et al.* 2000).

Fathallah-Shaykh *et al.* zeigten in einer Studie am Rattengliommodell, dass INF- γ zu einer Hochregulation der Expression von MHC-I und –II Molekülen von Mikroglia im gesamten Gehirn führte und somit eine Tumordinfiltration mit CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ Zellen sowie NK-Zellen hervorrief. Dies bestätigte auch eine Studie von Saleh *et al.* am Rattengliommodell. Durch IFN- γ wurde eine T-Zell vermittelte Antitumorantwort hervorgerufen. Es zeigte sich eine hohe Anzahl von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ Zellinfiltraten im Tumorgewebe (Saleh *et al.* 2000). Tjuvajev zeigte in seiner Studie mit einem genetisch modifizierten Rattentumor mit IFN- γ Expression, dass neben CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ Zellen auch eine hohe Anzahl eingewanderter Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen nachgewiesen werden konnte (Tjuvajev *et al.* 1995).

Insbesondere aktivierte Makrophagen sind in der Lage TNF- α zu bilden, welches über eine hochpotente Antitumoraktivität verfügt (Romanczuk *et al.* 1999; Mauceri *et al.* 2002), sowie selbständig Tumorzellen zu zerstören (Cox 2001).

In dem hier vorliegendem Model regulierte die kontinuierliche Gabe von IFN- γ besonders stark die Expression von MHC-II Molekülen hoch und induzierte so die Einwanderung von B-Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten, wie die Markierungen mit den Antikörpern OX-6 und W3/25 deutlich zeigte (Abbildung 25, Abbildung 29) (Abbildung 43).

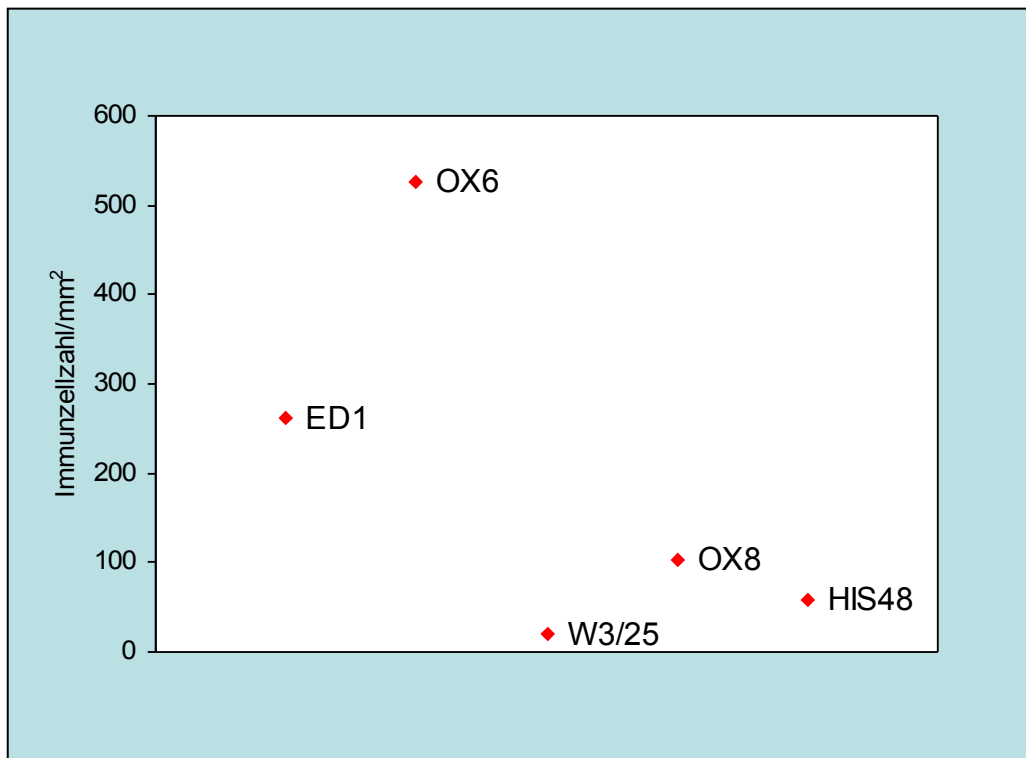


Abbildung 43 Dargestellt ist die Anzahl der nach IFN- γ Behandlung mittels Färbung markierten Immunzellen/mm² als Medianwerte. ED1 und OX6 markierten Makrophagen/Monozyten, OX6 außerdem auch B-Lymphozyten. W3/25 markierte B-Lymphozyten, OX8 T-Lymphozyten und HIS48 Granulozyten. Besonders hervorzuheben ist die hohe Anzahl der mit OX6 markierten Zellen.

4.3 Tumorregression

Leider war es nicht möglich eine erfolgreiche Tumorregression nach kontinuierlicher intratumoraler Zytokingabe zu zeigen. Hervorgehoben werden sollte jedoch, trotz nicht erreichter kompletter Tumorregression, dass zwischen gemessener Tumorgroße und der eingewanderten Immunzellzahl eine Beziehung im Sinne einer negativen Korrelation bestand. Es zeigte sich, dass eine hohe Zahl von eingewanderten Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten mit einem kleineren

Tumor einherging (Abbildung 38). Es ließe sich vermuten, dass die hohe Zahl der eingewanderten Immunzellen zu einer beginnenden Tumorregression geführt haben mag.

Normalerweise laufen bei einer funktionierenden, über T-Zellen vermittelten Antitumorantwort eine Reihe von ineinander greifenden Prozessen ab. Dies beginnt schon bei der Präsentation von Tumorantigenen über antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen oder Makrophagen. Diese agieren über den MHC-II Antigen-Komplex mit CD4⁺ T-Helfer-Zellen. Wichtig sind bei diesen Reaktionen zahlreiche weitere Faktoren, wie weitere Zelloberflächenproteine und auch Zytokine wie IL-1 β . Aktivierte T-Helfer-Zellen können CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aktivieren, um Tumorantigene in Assoziation mit dem MHC-I Molekül zu erkennen. Auch hier spielen eine Reihe von weiteren Aktivitäten und Reaktionen eine Rolle, wie die Ausschüttung von IL-2, TNF- α und IFN- γ . Über die zytotoxische T-Zell Immunantwort könnten die Tumorzellen schließlich erkannt und zerstört werden (Weller *et al.* 1995; Berke 1994). Bei der Immunantwort gegenüber Glioblastomen treten jedoch, wie schon erwähnt, zahlreiche Faktoren auf, die die beschriebene erfolgreiche Immunantwort behindern und verhindern.

In früheren Studien konnten die wachstumshemmenden Effekte von IFN- γ auf Glioblastome *in vitro* und *in vivo* erfolgreich demonstriert werden (Kominsky *et al.* 1998; Visse *et al.* 1999; Fathallah-Shaykh *et al.* 1998). Saleh konnte nach Behandlung mit IFN- γ im Rattengliommodell eine komplette Tumorregression dokumentieren. Am Ort der Tumorimplantation zeigten sich nach der Gabe von IFN- γ noch nekrotische Areale. Tumorzellen konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Einige Tiere jener Studie zeigten jedoch zunächst ebenfalls ein weiteres Tumorwachstum, wenn auch mit großen Nekrosen und Immunzellinfiltraten nach sieben Tagen Zytokinbehandlung. Erst nach Beendigung der Studienzeit nach insgesamt 85 Tagen zeigten sich alle Tumoren komplett zurückgebildet (Saleh *et al.* 2000).

Kominsky *et al.* untersuchte die direkten Effekte von IFN- γ auf die Glioblastomzelle. IFN- γ greift in den Tumorzellzyklus ein und hemmt so die unkontrollierte Zellteilung. Mit dem erhöhten Vorhandensein von IFN- γ konnte vermehrt ein Protein nachgewiesen

werden, welches den Zellzyklus verlangsamt, beziehungsweise stoppt (Kominsky *et al.* 1998).

Auch die antiproliferativen Effekte von IL-1 β auf Glioblastomzellen konnten schon früh *in vitro* nachgewiesen werden (Tanaka *et al.* 1994).

Die nicht signifikant nachzuweisende Tumorregression dieser Studie nach Gabe von IL-1 β beziehungsweise IFN- γ , mag auf das schnelle Tumorwachstum nach der Implantation der Tumorzellen zurückzuführen sein und auf die daraus zu folgernde Möglichkeit, dass der Tumor zum Zeitpunkt der Zytokininfusion bereits zu groß war, um sich in der bis zur Gehirnentnahme bestehenden Zeit zurückzubilden.

Ein anderer möglicher Grund für die nicht stattgefundene Regression des Tumors könnte die kurze Behandlungs- und Wirkungszeit der Zytokine sein. Aufgrund der Nebenwirkungen der proinflammatorisch wirkenden Zytokine mussten die Tiere schließlich getötet werden. Die Gabe von IL-1 β ist bekannt für das Hervorrufen von Fieber, Gehirnödemen und Verschlechterung des Allgemeinzustands (Woiciechowsky *et al.* 1999). IFN- γ scheint ebenso toxisch auf das zentrale Nervensystem zu wirken, was daran liegt, dass die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen wird und ein vasogenes Gehirnödem hervorgerufen wird. Im Vergleich zu einer Behandlung mit IL-2 zeigten sich nach Freisetzung von IFN- γ weitaus stärkere Nebenwirkungen im Sinne einer Hirnschwellung und Mittellinienverlagerung (Tjuvajev 1995).

In dieser Studie zeigte sich nach Tumorimplantation und Infusion von Zytokin- bzw. von Vehikellösung eine Verschlechterung des Allgemeinzustands bei allen Tieren, auch bei denen, die nur Vehikellösung erhalten hatten. Diese Verschlechterung des Allgemeinzustands fiel ohne Bezug auf die Art der Infusionsgabe unterschiedlich stark aus und variierte von räumlichem und sozialem Rückzug der Tiere, struppigem Fell, Appetitlosigkeit und Gleichgewichtsstörungen bis hin zur Vigilanzminderung. Eine zeitliche Verlängerung der Episode zwischen Infusionsgabe und Tötung wäre so kaum möglich gewesen.

Es gilt zu überdenken, ob eine kleinere Menge an Tumorzellen zur Tumorimplantation, beziehungsweise eine geringere Dosierung der Zytokintherapie andere Möglichkeiten offeriert hätte.

Möglicherweise greifen auch die bereits bekannten und schon vorab beschriebenen Ausweichmechanismen von Tumoren vor dem Immunsystem in die in dieser Studie erwarteten Immunreaktionen ein und verhindern so eine für eine Tumorregression ausreichende Immunantwort. Die Produktion von TGF- β , IL-10 und Prostaglandin E₂ werden für eine mangelnde Immunantwort verantwortlich gemacht. Eine niedrigere Antigenpräsentation über MHC-I und -II durch TGF- β ist bekannt und auch in früheren Studien wurden immuntherapeutische Maßnahmen durch TGF- β , welches von Glioblastomzellen vermehrt gebildet wird, verhindert. (Platten *et al.* 2001; Roth *et al.* 1999).

Auch wenn nach der intratumoralen Gabe von Zytokinen ausreichend Immunzellen angelockt und aktiviert wurden, könnte das Nichterkennen der Tumorzellen bei inadäquater Antigenpräsentation oder inadäquater MHC-I Bildung insbesondere die zytotoxische Immunantwort unterdrückt haben. Hiermit erklärt wurde auch der Misserfolg bisheriger klinischer Studien, in denen sich Glioblastome resistent auf die humorale oder zelluläre Immuntherapie verhielten (Proescholdt *et al.* 2002; Barba *et al.* 1989; Weller *et al.* 1995).

Schon Astrozyten zeigten sich zwar in der Lage Antigene an CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren, waren jedoch nicht fähig eine T-Zell-Aktivierung auszulösen (Weber *et al.* 1994).

CD8⁺ NK-Zellen, die nicht auf das Vorhandensein von MHC-I Molekülen angewiesen sind, um Tumorzellen ähnlich wie zytotoxische T-Zellen zu lysieren, zeigten sich nicht in der Lage Glioblastomzellen erfolgreich zu bekämpfen. *In vitro* reagierten menschliche Glioblastomzellen resistent auf NK-Zellen, bessere Ergebnisse zeigten sich nach Gabe von TNF- α . INF- γ wiederum bewirkte eine erhöhte Ausschüttung von TNF- α und könnte die Immunantwort gegenüber Glioblastomen mittels NK-Zellen stärken. Jedoch ist auch hier ein weiterer Ausweichmechanismus von Glioblastomen gegenüber dem Immunsystem über TGF- β bekannt, da TGF- β die Ausschüttung von INF- γ hemmt und

somit die NK-Aktivität wieder reduzieren konnte (Wallick *et al.* 1990; Myers *et al.* 1992; Kondo *et al.* 1994; Weller *et al.* 1995).

Obwohl in mehreren tierexperimentellen Studien am Rattengliommodell, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, eine hohe Infiltration mit CD4+ und CD8+ Lymphozyten demonstriert wurde, blieb die zu erwartende Immunreaktion, die den Tumor bekämpfen sollte, aus (Proescholdt *et al.* 2002; Morioka *et al.* 1992).

Weitere Studien zeigten die Wichtigkeit von kostimulierenden Faktoren für die mit MHC-I und -II verknüpfte Antigenpräsentation. Insbesondere wurde die Expression von B7-1 untersucht, welches in Glioblastomen vermindert ist, wodurch schließlich eine T-Zell-Apoptose hervorrufen wurde. B7-1 ist ein kostimulatorisches Molekül, das sich normalerweise an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen befindet und wichtig für die T-Zell-Aktivierung ist. Erfolgreiche Immunantworten konnten auch in diesen experimentellen Untersuchungen nicht demonstriert werden (Proescholdt *et al.* 2002; Joki *et al.* 1999; Komata *et al.* 1997). Die Wichtigkeit von kostimulierenden Signalen untersuchte auch Visse *et al.* in einem Rattengliommodell mittels mehrfacher Immunisation mit IFN- γ und B7-1 transfizierter Tumorzellen. Interessanterweise wurden in jener Studie auch Unterschiede zwischen der stattgefundenen Tumorregression in männlichen *versus* weiblichen Tieren gezeigt. Tumore weiblicher Tiere zeigten eine wesentlich stärkere Tumorrückbildung und längere Überlebenszeit nach erfolgter Behandlung (Visse *et al.* 1999). In der hier vorliegenden Studie wurden ausschließlich männliche Tiere genutzt. Über ein positiveres Ergebnis bei weiblichen Tieren kann spekuliert werden.

4.4 Überlebenszeit

In der Überlebensstudie, die zwischen Tieren mit Behandlung von IL-1 β und der Gabe von Vehikellösung differenzieren sollte, betrug die Überlebenszeit der Ratten nach der Zytokinbehandlung zwischen zwei und neun Tagen und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gabe von IL-1 β und Vehikellösung festgestellt werden (Abbildung 41).

In anderen Studienberichten konnte gezeigt werden, dass Tumore durchschnittlich 28 Tage wuchsen, bevor sie unter Zytokinbehandlung zurückgingen (Jean *et al.* 1998). In einer weiteren Studie mit IFN- γ wurde mit nur maximal 2000 Tumorzellen gearbeitet und die Kontrolltiere lebten durchschnittlich 21 Tage. Tiere mit Behandlung von IFN- γ zeigten sogar eine deutliche Erhöhung der Überlebenszeit auf durchschnittlich 40 Tage (Fathallah-Shaykh *et al.* 1998). Wie bereits erwähnt konnte nach der Behandlung mit IFN- γ mittels retroviralem Gentransfer in einem Rattengliommodel eine Überlebenszeit von bis zu 92 Tagen erreicht werden. Eine Tumorregression konnte damals bei allen Tieren beobachtet werden und die Rattengehirne zeigten sich morphologisch normal. Zeitlich früher untersuchte Tiere zeigten nach einer Behandlungszeit von nur sieben Tagen noch wachsende Tumoren, wenn auch beginnend nekrotisch und mit Zellinfiltraten (Saleh *et al.* 2000). In der hier vorliegenden Studie erreichten nur einige Tiere eine entsprechende Überlebenszeit von sieben Tagen. Bei diesen Tieren wurden ebenfalls noch Tumoren ohne Regression und teilweise mit Nekrosen nachgewiesen. Eine höhere Überlebenszeit als neun Tage konnte aufgrund des schlechten Allgemeinzustands der Tiere nicht erreicht werden.

Ebenfalls mittels Gentransfer konnte Ehtesham *et al.* in einer Studie am Mausgliommodel eine Verlängerung der Überlebenszeit nach IFN- γ Freisetzung erreichen. Nach signifikanter Erhöhung von MHC-I Expression und Nachweis einer erhöhten Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen konnte neben einer Verlängerung der Lebenszeit auch eine Verkleinerung der Tumormasse nachgewiesen werden (Ehtesham *et al.* 2002).

Die Auswirkungen von IL-1 β auf eine Verlängerung der Lebenszeit wurden bisher nicht so ausführlich erforscht und dokumentiert wie die von IFN- γ . Es konnte jedoch eine signifikante positive Verbindung zwischen dem Vorhandensein von IL-1 β und der Überlebenszeit von Glioblastompatienten nachgewiesen werden (Cuny *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Studie zunächst nachgewiesene hohe Zahl inflammatorischer Zellen nach IL-1 β -Infusion ließ zunächst auf ein erfolgreicherer Ergebnis hoffen.

Insgesamt untermauern diese Daten die These, dass die Überlebenszeit in unserem Model nicht lang genug andauerte, um eine Tumorregression nach Zytokinbehandlung

zu erreichen. Nach IFN- γ -Gabe waren auch in früheren Studien die Nebenwirkungen zu stark, um eine Verlängerung der Überlebenszeit zu erreichen (Tjuvajev *et al.* 1995).

Denkbar wäre eine Verlängerung der Behandlungszeit über die Implantation einer geringeren Menge an Tumorzellen, ebenfalls möglich wäre die Reduktion der zu applizierenden Zytokinmenge. Am ehesten ist jedoch der Ansatz in der Reduktion der Tumormasse zu sehen – entweder zu Beginn bei Implantation der Glioblastomzellen oder später, indem ein früherer Beginn der Zytokinbehandlung gewählt würde, um bereits eine Immunreaktion auf den Tumor in einem früherem Wachstumsstadium zu erreichen. Eine früher begonnene Tumorbehandlung im Rattengliommodell mit TNF- α und Lymphotoxin zeigte bessere Effekte als ein späterer Ansatz (Liu *et al.* 1991).

Allein die Nebenwirkungen der Zytokinbehandlung können nicht Ursache des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere sein, da auch die mit Vehikellösung behandelten Tiere eine deutliche Verschlechterung ihres Zustandes unter dem Tumorwachstum zeigten. Es wäre wichtig das Tumorwachstum zu Beginn der Behandlungsphase entsprechend einzudämmen bis die Immunantwort stark genug ist, um alle Tumorzellen zu bekämpfen. Vielleicht ließe sich unter solchen Bedingungen eine Verlängerung der Überlebenszeit und womöglich eine Tumorregression nach IL-1 β Gabe erreichen.

5 Zusammenfassung

Die erfolgreiche Behandlung maligner Hirntumoren, insbesondere des Glioblastoma multiforme, ist nach wie vor nicht gegeben. Trotz chirurgischer Entfernung, Radio- und Chemotherapie kommt es zu Rezidiven und die Überlebenszeit ist mit bis zu zwölf Monaten kurz. Somit ist die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen wichtig und insbesondere die Immuntherapie zeigt sich aufgrund ihrer Spezifität nur die Tumorzellen anzugreifen als besonders versprechend. Verschiedene Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine fähig sind eine effiziente Antitumor Immunantwort sowohl in Tiergliommodellen als auch bei Glioblastompatienten hervorzurufen.

In dieser Studie wurden die proinflammatorischen Effekte von IL-1 β und IFN- γ im Rattengliommodell untersucht. Glioblastomtumorzellen wurden in den linken *nucleus caudatus* des Rattenhirns implantiert. Nach beginnendem Tumorwachstum erfolgte die Behandlung mit IL-1 β und IFN- γ im Vergleich zu Vehikellösung mittels *convection enhanced delivery* (CED). Eine kontinuierliche Infusion und ausreichende Zytokinkonzentration im Tumorgewebe war so gewährleistet.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass mittels intratumoraler IL-1 β Gabe eine starke Immunzelleinwanderung in den Tumor ausgelöst wurde. Nach Infusion von IL-1 β , beziehungsweise IFN- γ konnte zahlreich Makrophagen/Monozyten, B- und T-Lymphozyten und Granulozyten nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist das Vorhandensein von CD8 $^+$ Zellen, wie T-Lymphozyten oder NK-Zellen, als Voraussetzung für eine spezifische zytotoxische Immunzellantwort, nach IL-1 β Gabe.

Die eingewanderten Immunzellen ließen sich ausschließlich innerhalb des Tumorgewebes nachweisen, eine Tatsache, die die Spezifität der Behandlung herausstellt. Interessanterweise fanden sich die Immunzellen innerhalb des Tumors in erhöhter Zahl am Tumorrand, was auf eine Invasion von umliegenden Mikrogliazellen hindeutet.

Weitere Analysen sollten über Tumorwachstum im Rahmen der Zytokinbehandlung und Überlebenszeit Auskunft geben. Das Tumorwachstum wurde mittels MRT dokumentiert und mit der Tumorfläche *post mortem* verglichen. Leider zeigte sich in dem zeitlichen Rahmen keine Tumorregression. Jedoch konnte zwischen der gemessenen Tumorgröße und der eingewanderten Immunzellzahl eine Beziehung im Sinne einer negativen Korrelation demonstriert werden. Eine große Anzahl von eingewanderten Immunzellen ging also mit einem kleineren Tumor einher. Es ließe sich somit über eine beginnende Tumorregression spekulieren.

Ebenso wie leider keine Tumorregression nachgewiesen werden konnte, zeigte die Überlebenszeit nach Behandlung mit IL-1 β verglichen mit Vehikellösung keine signifikanten Unterschiede.

Weiterführende Studien könnten hier ansetzen und eventuell an einer kleineren implantierten Tumormasse oder im Rahmen einer früher beginnenden Zytokinbehandlung erfolgreichere Ergebnisse im Sinne einer stattfindenden Tumorregression und Verlängerung der Überlebenszeit demonstrieren.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Model zum ersten Mal, dass die intratumorale Gabe von IL-1 β und IFN- γ mittels CED zu einer starken Immunzelleinwanderung in den Tumor führte, annähernd einer tumorspezifischen Immunantwort entsprechend. Es fanden sich keine Immunzellen in anderen Gehirnregionen. Deshalb kann eine unspezifische Immunzelleinwanderung ausgeschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbas A, Lichtman A:

Cellular and Molecular Immunology, chapter 17, 5th edition (2003), Elsevier Science – USA

Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry VH:

Age-related effects of interleukin-1 β on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats.

Brain 120 (1997), 435-444

Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T:

Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses.

Annu Rev Biochem 59 (1990), 783-836

Barba D, Saris SC, Holder C, Rosenberg SA, Oldfield EH:

Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy in human gliomas.

Neurosurg. 70(2) (1989), 175-82

Benedetti S, Bruzzone MG, Pollo B, DiMeco F, Magrassi L, Pirola B, Cirenei N, Colombo MP, Finocchiaro G:

Eradication of rat malignant gliomas by retroviral-mediated, in vivo delivery of the interleukin 4 gene.

Cancer Res 59 (1999), 645-652

Berke G:

The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes. Molecular and cellular aspects.

Annu. Rev. Immunol. 12 (1994), 735-773

Berlit P:

Klinische Neurologie, Kapitel 31 (630-642), 2. Auflage (2006), Springer Medizin Verlag
Heidelberg

Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH:

Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 2076-80

Brooks WH, Horwitz DA, Netsky MG:

Evidence for tumor-specific immune response in patients with primary brain tumors.

Surg Forum. 23(0) (1972), 430-432

Bruce JN, Falavigna A, Johnson JP, Hall JS, Birch BD, Yoon JT, Wu EX, Fine RL,

Parsa AT:

Intracerebral clysis in a rat glioma model.

Neurosurgery 46 (2000), 683-691

Burnet FM:

The concept of immunological surveillance.

Progress in Experimental Tumor Research 13 (1970), 1-27

Carter P:

Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies.

Nat Rev Cancer 1(2) (2001), 118-29

Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jiminez-Dalmaroni MJ, Yuan X, Bigliari

A, Williams JC, Hu J, Lowenstein PR:

Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors.

Pharmacol. Ther. 98 (2003), 71-108

Cox GW:

Assay for macrophage-mediated anti-tumor cytotoxicity.

Curr Protoc Immunol. (2001), Chap14 U14.7

Cuny E, Loiseau H, Penchet G, Ellie E, Arsaut J, Vital A, Vincendeau P, Demotes-Mainard J :

Association of elevated glial expression of interleukin-1beta with improved survival in patients with glioblastomas multiforme.

J Neurosurg. 96 (2002), 294-301

Damoiseaux JG, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD:

Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognised by monoclonal antibody ED1.

Immunol. 83 (1994), 140-147

Davis FG, McCarthy B, Jukich P:

The descriptive epidemiology of brain tumors.

Neuroimaging Clin N Am 9 (1999), 581-594

Dinarello CA:

Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.

Blood 77(8) (1991), 1627-52

Druckrey H, Ivankovic S, Preussmann R, Landschutz C, Stekar J, Brunner U, Schlagen B:

Transplacental induction of neurogenic malignomas by 1,2-diethyl-hydrazine, azo- and azoxy-ethane in rats.

Experientia 24 (1968), 561-562

Dunn IF, Black PM:

The neurosurgeon as local oncologist: cellular and molecular neurosurgery in malignant glioma therapy.

Neurosurgery 52 (2003), 1411-1422

Ehrlich P:

Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.

Ned. Tijdschr. Geneeskd. 5 (1909); 273-290

Ehtesham M, Samoto K, Kabos P, Acosta FL, Gutierrez MAR, Black KL, Yu JS:

Treatment of intracranial glioma with in situ interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha gene transfer.

Cancer Gene Therapy 9 (2002), 925-934

Elepfandt P, Rupprecht S, Schöning-Burkhardt B, Volk HD, Woiciechowsky C:

Oligodeoxynucleotides induce brain inflammation in rats when infused intracerebroventricularly.

Neuroscience Letters 322 (2002), 107-110

Van den Eynde BJ, Boon T:

Tumor antigens recognized by T lymphocytes.

Int J Clin Lab Res. 27(2) (1997), 81-6

Fathallah-Shaykh HM, Gao W, Cho M, Herrera MA:

Priming in the brain, an immunologically privileged organ, elicits anti-tumor immunity.

Int. J. Cancer 75 (1998), 266-276

Fine HA:

Novel biologic therapies for malignant gliomas. Antiangiogenesis, immunotherapy, and gene therapy

Neurol Clin. 13(4) (1995), 827-46

Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R:

Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts).

Clin Ter. 157 (2006), 377-86

di Giovine FS, Duff GW:

Interleukin 1: the first interleukin.

Immunol Today 11 (1990), 13-20

Gleixner C, Müller M, Wirth S:

Neurologie und Psychiatrie, 3. Auflage (2002), Breisach: Med. Verl. und Informationsdienste

Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J:

Immunology, chapter 22, 5th edition (2003), WH Freeman and Company

Groothuis DR, Ward S, Itskovich AC:

Comparison of ¹⁴C-sucrose delivery to the brain by intravenous, intraventricular and convection-enhanced intracerebral infusion.

J Neurosurg. 90 (1999), 321-331

Haroun RI, Brem H:

Local drug delivery.

Curr. Opin. Oncol. 12 (2000), 187-193

Heberman RB:

Cancer immunotherapy with natural killer cells.

Semin Oncol. 29 (2002), 27-30

Huber CH, Wölfel T:

Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practise.

J Cancer Res Clin Oncol. 130(7) (2004), 367-74

Ibelgaufts H:

Lexikon Zytokine (1992), Medikon Verlag, München

Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG:

Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expression an NK inhibitory receptor.

Immunity 6(2) (1997), 199-208

Jäger D, Jäger E, Knuth A:

Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer.

J Clin Pathol. 54(9) (2001), 669-74

Janeway, Travers, Walport, Shlomchik:

Immunobiology – the immunsystem in health and disease, chapter 14, 6th edition (2005), Garland Science Publishing

Jean WC, Spellman SR, Wallenfriedman MA, Hall WA, Low WC:

Interleukin-12-based immunotherapy against rat 9L glioma.

Neurosurg. 42(4) (1998), 850-7

Jiang HJ, Ren XB, Li H, Yu JP, Wei F, Ma MQ:

The anti-tumor activity of GM-CSF-modified lung cancer cell vaccine and its synergism in combination with chemotherapy.

Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 29(11) (2007), 808-12

Joki T, Kikuchi T, Akasaki Y:

Induction of effective antitumor immunity in a mouse brain model using B7-1 (CD80) and intercellular adhesive molecule 1 (ICAM-1; CD54) transfection and recombinant interleukin 12.

Int J Cancer 82 (1999), 714-720

Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, Hall JS, Chakrabarti I, Bruce JN:

Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model.

Neurosurgery 47 (2000), 1391-99

Kampinga J:

Thymocyte differentiation and thymic microenvironment development in the foetal rat thymus: an immunohistological approach.

Thymus Update 3. The role of the thymus in tolerance induction. Eds. M.D. Kendall and M.A. Ritter. Harwood academic Publishers GmbH, Switzerland.

Kawakami M, Kawakami K, Puri RK:

Interleukin-4-Pseudomonas exotoxin chimeric fusion protein for malignant glioma therapy.

J Neurooncol. 65(1) (2003), 15-25

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW:

The new WHO classification of brain tumours,
Brain Pathology 3 (1993) 255-68

Klingelhöfer J, Spranger M:

Klinikleitfaden Neurologie-Psychiatrie, 2. Auflage (2001), Urban und Fischer Verlag,
München – Jena

Koestner A, Swenberg JA, Wechsler W:

Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats.

Am J Pathol 63 (1971), 37-56

Komata T, Tanaka R, Yamamoto K:

B7-1 (CD80)-transfected human glioma cells and interleukin-12 directly stimulate allogeneic CD8+ T cells.

J Immunother 20 (1997), 256-264

Kominsky S, Johnson HM, Bryan G, Tanabe T, Hobeika AC, Subramaniam PS, Torres B:

IFN- γ inhibition of cell growth in glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}

Oncogene 17 (1998), 973-979

Kondo S, Yin D, Takeuchi J, Morimura T, Miyatake SI, Nakatsu S, Oda Y, Kikuchi H:
Tumour necrosis factor- α induces an increase in susceptibility of human glioblastoma U87-MG cells to natural killer cell-mediated lysis.

Br J Cancer 69 (1994), 627-632

Lampson LA:

Interpreting MHC class I expression and class I/ class II reciprocity in the CNS:
reconciling divergent findings.

Microsc Res Tech. 32(4) (1995), 267-85

Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH:

Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors.

Nat Med 3 (2000), 1362-68

Liu SK, Jakowatz JG, Pollack RB, Ceraldi C, Yamamoto R, Dett C, Lopez F, Camacho C, Carson WE, Sentovich SM:

Effects of intracarotid and intravenous infusion of human TNF and LT on established intracerebral rat gliomas.

Lymphokine Cytokine Res. 10(3) (1991), 189-94

Marras C, Mendola C, Legnani FG, DiMeco F:

Immunotherapy and biological modifiers for the treatment of malignant brain tumors

Curr Opinion Oncol. 15 (2003), 204-208

Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, Lee JY, Gupta VK, Gately S, Stack MS, Brown CK, Swedberg K, Kufe DW, Weichselbaum RR:

Tumor production of angiostatin is enhanced after exposure to TNF-alpha.

Int J Cancer 97(4) (2002), 410-5

McMaster WR, Williams AF:

Identification of Ig glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen.

Eur J Immunol. 9 (1979), 426-433

Miller DW:

Immunobiology of the blood-brain barrier.

J Neurovirol 5(6) (1999), 570-8

Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ:

Immunophenotypic analysis of infiltrating leukocytes and microglia in an experimental rat glioma.

Acta Neuropathol (Berl). 83(6) (1992), 590-7

Myers RL, Whisler RL, Stephens RE, Sponseller CA, Livingston K, Spring PM, Yates AJ:

Sensitivity of human glioma and brain cells to natural killer cell lysis.

J Neurosurg 76 (1992), 986-990

Nohria A, Rubin RH:

Cytokines as potential vaccine adjuvants.

Biotherapy 7(3-4) (1994), 261-9

Ochsenbein AF:

Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy.

Cancer Gene Ther. 9(12) (2002), 1043-55

Ochsenbein AF:

Immunological ignorance of solid tumors.

Springer Semin Immunopathol. 27(1) (2005), 19-35

Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, Matsuda K, Nakamori M, Ueda K, Naka T, Katsuda M, Miyazawa M, Yamaue H:

Benefits of gene transduction of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in cancer vaccine using genetically modified dendritic cells.

Int J Oncol. 31(4) (2007), 931-9

Pardoll DM:

Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy.

Annu Rev Immunol. 13 (1995), 399-415

Paxinos G, Watson C:

The rat brain in stereotaxic coordinates.

CD ROM, 5th edition, (2005), Elsevier Academic Press

Perussia B:

Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines.

Curr Opin Immunol. 3(1) (1991), 49-55

Platten M, Wick W, Weller M:

Malignant glioma biology: role for TGF- β in growth motility, angiogenesis and immune escape.

Microsc. Res. Tech. 52 (2001), 401-410

Proescholdt MA, Merrill MJ, Ikejiri B, Walbridge S, Akbasak A, Jacobson S, Oldfield EH:
Site-specific immune response to implanted gliomas.

J Neurosurg. 95(6) (2001), 1012-9

Puri RK:

Development of a recombinant interleukin-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma.

Toxicol. Pathol. 27(1) (1999), 53-7

Rodrigues EG, Garofalo AS, Travassos LR:

Endogenous accumulation of IFN-gamma-R(-/-) mice increases resistance to B16F10-Nex2 murine melanoma: a model for direct IFN-gamma anti-tumor cytotoxicity in vitro and in vivo.

Cytokines Cell Mol Ther. 7(3) (2002), 107-16

Roitt IM, Brostoff J, Male DK:

Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Kapitel 17, 3. Auflage (1995), Thieme Verlag

Romanczuk H, Graler CE, Zabner J, Barsomian G, Wadsworth SC, O'Riordan CR:

Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice

Hum Gene Ther. 10 (1999), 2615-2626

Roth W, Weller M:

Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives.

Cell Mol Life Sci 56 (1999), 481-506

Saleh M, Jonas NK, Wiegmans A, Stylli SS:

The treatment of established intracranial tumors by in situ retroviral IFN- γ transfer

Gene Therapy 7 (2000), 715-724

Sawamura Y, De Tribolet N:

Immunotherapy of brain tumors

J Neurosurg Sci 34(3-4) (1990), 265-78

Schmiddek HH, Nielsen SL, Schiller AL, Messer J:

Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea.

J Neurosurg 34 (1971), 335-340

Schöning B, Elepfandt P, Lanksch WR, Volk HD, Woiciechowsky C:

Continuous infusion of proinflammatory cytokines into the brain to study brain cytokine induced local and systemic immune effects.

Brain Research Protocols 4 (1999), 217-222

Schöning B, Elepfandt P, Daberkow N, Rupprecht S, Stockhammer F, Stoltenburg G, Volk HD, Woiciechowsky C:

Differences in immune cell invasion into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma during cerebral infusion of interleukin-1 β

Neurol Sci 23 (2002), 211-218

Tanaka S, Nagashima T, Manaka S:

Growth suppression and astrocytic differentiation of glioma cells by interleukin-1.

J Neurosurg 81 (1994), 402-410

Terres G, Coffman RL:

The role of IL-4 and IL-10 cytokines in controlling an anti-tumor response in vivo.

Int Immunol. 10(6) (1998), 823-32

Tjuvajev J, Gansbacher B, Desai R, Beattie B, Kaplitt M, Matei C, Koutcher J, Gilboa E, Blasberg R:

RG-2 glioma growth attenuation and severe brain edema caused by local production of interleukin-2 and interferon- γ

Cancer Res. 55 (1995), 902-910

Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA:

A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance.

Proc Natl Acad Sci U S A. 87(4) (1990), 1486-90

Trotta PP:

Cytokines: an overview.

Am J Reprod Immunol. 25(3) (1991), 137-41

Vilcek J et al.:

Interferon-gamma: a lymphokine for all seasons.

Lymphokines 11 (1985), 1-32

Visse E, Siesjö P, Widegren B, Sjögren HO:

Regression of intracerebral rat glioma isografts by therapeutic subcutaneous immunization with interferon- γ , interleukin-7, or B7-1-transfected tumor cells

Cancer Gene Therapy 6(1) (1999), 37-44

Wallick SC, Figari IS, Morris RE, Levinson AD, Palladino MA:

Immunoregulatory role of transforming growth factor β (TGF- β) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF- β .

J Exp Med 172 (1990), 1777-84

Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Kuriyama H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M,

Urushizaki I:

Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice.

Cancer Res. 48(8) (1988), 2179-83

Weber F, Meinl E, Aloisi F, Nevinny-Stickel C, Albert E, Wekerle H, Hohlfeld R:

Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis.

Brain 117 (1994), 59-69

Weller M, Fontana A:

The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain.

Brain Res Rev. 21(2) (1995), 128-51

White CA, Weaver RL, Grillo-López AJ:

Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy.

Annu Rev Med. 52 (2001), 125-45

Whiteland JL, Nicholls SM, Shimeld C, Easty DL, Williams NA, Hill TJ:

Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leucocytes in paraffin wax embedded rat and mouse tissues using monoclonal antibodies.

J Histochem. Cytochem. 43 (1995), 313-320

Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche K, Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD:

Brain-IL-1beta induces local inflammation but systemic anti-inflammatory response through stimulation of both hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system.

Brain Res. 816(2) (1999), 563-71

Xu J, Ling EA:

Up-regulation and induction of major-histocompatibility-complex-class-I and -class-II antigens on microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of recombinant interferon-gamma.

Neuroscience 60 (1994), 959-967

Yang JC, Rosenberg SA:

An ongoing prospective randomized comparison of interleukin-2 regimens for the treatment of metastatic renal cell cancer.

Cancer J Sci Am. (1997), 79-84

Yang SH, Oh TK, Kim ST:

Increased anti-tumor effect by a combination of HSV thymidine kinase suicide gene therapy and interferon-gamma/GM-CSF cytokine gene therapy in CT26 tumor model. J Korean Med Sci. 20(6) (2005), 932-7

Zeltzer PM, Moilanen B, Yu JS, Black KL:

Immunotherapy of malignant brain tumors in children and adults: from theoretical principles to clinical application.

Childs Nerv. Syst. 15 (1999), 514-528

Zeng G:

MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells: new strategies for cancer vaccine design.

J Immunother. 24(3) (2001) 195-204

Publikation

Frewert S, Stockhammer F, Warschewske G, Zenclussen A, Rupprecht S, Volk H, Woiciechowsky C:

Intratumoral infusion of IL-1 beta and INF- γ induces tumor invasion with macrophages and lymphocytes in a rat glioma model.

Neuroscience Letters (07/2004)

Erklärung

„Ich, Sandra Amelunxen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Intratumorale Gabe von Interleukin-1 β und Interferon- γ im Rattengliommodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Zürich, den 01.01.2012

Sandra Amelunxen

Lebenslauf

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