

1 Zusammenfassung

Die Schwachstelle aller Gentherapieansätze ist immer noch das Gentransferverfahren. Optimal zur klinischen Anwendung wäre eine Transfektionsmethode, durch die bei geringem Aufwand und ohne Sicherheitsrisiko eine effiziente Transfektion nur der gewünschten Zellen in ausreichender Anzahl erreicht werden könnte. Dabei sollte die Zelle ausschließlich in der erforderlichen Art und Weise verändert werden, ohne daß andere, ihr eigene Merkmale modifiziert werden.

Die Methode des ballistomagnetischen Gentransfers stellt einen Ansatz zur Lösung dieses Problems dar (134). Sie ist jedoch dadurch limitiert, daß nur adhärente Zellen effektiv transfiziert werden können. Es muß also vor der Transfektion aus dem vom Patienten exzidierten Tumorgewebe eine adhärente Zellkultur hergestellt werden. Bei den von uns am Centrum Somatische Gentherapie, Berlin durchgeführten Gentherapiestudien stellt dies eine beträchtliche Einschränkung dar, da es bei der Kultivierung der aus Tumormaterial gewonnenen Zellen zu einer Selektion der adhärenierenden Zellklone kommt und demzufolge alle nichtadhärenten Tumorzellen verworfen werden. Hierdurch wird der Tumorzellpool, aus dem später die genterapeutischen Vakzine hergestellt werden, eingeschränkt. Mit zunehmender Kultivierungsdauer nimmt darüberhinaus der Anteil der schnellwachsenden Tumorzellen gegenüber den langsam wachsenden in der Kultur zu. Zum Zeitpunkt der Transfektion repräsentieren die zur Herstellung der Vakzine verwendeten Tumorzellen den Tumor, aus dem sie gewonnen wurden, also nur noch teilweise. Die längerfristige Kultivierung der operativ entnommenen Tumorzellen ist auf etwa 30% der operierten Patienten begrenzt, da nur bei diesem Anteil der Patienten die Zellen erfolgreich in Kultur gehalten werden können.

Im Rahmen meiner Arbeit wurde der ballistomagnetische Gentransfer für die Anwendung in klinischen Gentherapiestudien modifiziert. Der Arbeitsablauf wurde optimiert und seine Effektivität gesteigert. Um Zellen unabhängig von ihren Adhärenzeigenschaften transfizieren zu können, werden die Zellen nun auf Petrischaleneinsätze, die mit einer mikroporösen Polycarbonatmembran bespannt sind, kurzzeitig in Form einer Monolayer aufgebracht. Diese Methode wird im folgenden MIP-Methode (Mikroporöse-Polycarbonatmembran-Methode) genannt. Durch Kombination des ballistomagnetischen Gentransfers mit der MIP-Methode ist

es jetzt prinzipiell möglich, die autolog gewonnenen Tumorzellen aller Patienten ohne vorherige Kultivierung direkt zu transfizieren. Dies erlaubt die Herstellung von gentherapeutischen Vakzinen aus Tumorzellen mit immunologisch unveränderter Zelloberfläche und damit erhöhter Wahrscheinlichkeit, die für die Immunisierung relevanten Strukturen wie z.B. Tumorantigene, dem Immunsystem des Patienten zu präsentieren.

Zellen, die unter Anwendung der MIP-Methode ausgesät wurden, konnten zu 89% im Durchschnitt der verwendeten Zelllinien nach ballistischem Gentransfer von der Polycarbonatmembran geerntet werden. Bei Anwendung der Vergleichsmethode nach Burkholder et al. (123) konnten 58% der Zellen zurückgewonnen werden. Auch die magnetische Separation war effizienter, wenn die Zellen vorher mit der MIP-Methode ausgesät wurden. So erhielt man nach dem Gentransfer im Mittel über die verwendeten Zelllinien 1.7 mal mehr Zellen und nach magnetischer Separation insgesamt 3.7 mal mehr Zellen als mit der Vergleichsmethode.

Die Transfektionsraten, die sich nach durchflußzytometrischer Auswertung für beide Methoden ergaben, unterschieden sich nicht signifikant. Betrachtet man jedoch die absolute Zahl der transfizierten Zellen, so ist die Anwendung der MIP-Methode eindeutig vorteilhafter, da hierbei mehr Zellen nach dem ballistischen Gentransfer für die magnetische Separation zur Verfügung stehen und die magnetische Anreicherung effizienter ist.

Mit einer Computersimulation wurden die optimalen Bedingungen für den ballistischen Gentransfer ermittelt. Aufgrund der erhaltenen Daten konnten konkrete Vorschläge für eine praktische Umsetzung im Labor gemacht werden. Diese Erkenntnisse können direkt genutzt werden, um die Herstellung von Gentherapeutischen Vakzinen für zukünftige Studien und klinische Anwendungen noch effektiver zu gestalten.