

Ekkehard Kunze
Dr.med.

Kombinierte Expression von humanem Interleukin-2 und Cytosindeaminase in der transfizierten Glioblastomzelllinie T 1115

Geboren am 13.02.65 in Erlangen
Reifeprüfung am 10.06.86 in Neckargemünd
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1988 bis SS 1995
Physikum am 27.08.1990 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg Ruprecht- Karls- Universität
Praktisches Jahr an der Ruprecht- Karls- Universität in Heidelberg
Staatsexamen am 29.05.95 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurochirurgie
Doktorvater: Frau Prof. Dr. med G. Schackert

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste primäre maligne Hirntumor. Trotz enormer Fortschritte in der Diagnostik und ständiger Verbesserung in der mikroinvasiven neurochirurgischen Therapie hat sich die Prognose in den letzten 25 Jahren kaum verbessert.

Die mediane Überlebenszeit beträgt trotz multimodaler Therapie durch Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie weniger als 15 Monate.

Das Glioblastom ist ein sehr heterogener Tumor. Er ist durch Expression von immunsuppressiven Substanzen in der Lage, die zelluläre Abwehr von Gliompatienten zu schwächen.

Das Gehirn wird aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (BHS), eines fehlenden lymphatischen Systems und der eingeschränkten Abstoßung von Transplantaten als immunologisch partiell privilegiertes Organ bezeichnet, in dem eine effektive zelluläre Immunantwort erschwert ist. Neben diesen lokalen Effekten wird eine systemische zelluläre Immunsuppression beschrieben.

Bisher sind verschiedene immuntherapeutische Ansätze an Patienten angewandt worden, aber weder eine lokale Therapie mit Zytokinen noch der adoptive Immuntransfer von LAK- oder TIL-Zellen konnten erfolgreiche Resultate vorweisen. Auch neuere Therapiestrategien mittels aktivierter Makrophagen/ Monozyten, die nach ex-vivo Aktivierung und adoptivem Immuntransfer eingesetzt wurden, zeigten im wesentlichen nur in vitro einen Erfolg.

Wir konnten, wie auch andere Autoren, zeigen, daß IL-2 produzierende Tumorzellen eine effektive Immunantwort gegen sich selbst auslösen. Menschliches Interleukin-2, daß nach stabiler Transfektion des Gens von den Tumorzellen exprimiert wird, aktiviert mononukleäre Zellen gegen den Tumor und löst eine spezifische Immunantwort aus.

Aber auch auf dem adjuvanten Gebiet der Chemotherapie ergab sich in den letzten Jahren eher eine Zurückhaltung gegenüber dieser Therapieform, da einigen große Studien keinerlei Zunahme der medianen Überlebenszeiten darlegten. Lediglich für einige Subtypen der malignen Gliome scheint die Chemotherapie eine ansprechende Therapieform darzustellen.

Einen weiteren Ansatzpunkt stellt die Gentherapie bei malignen Gliomen in Form der in situ Chemotherapie oder Suizidgentherapie dar. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß durch Transfer des Gens für Herpes simplex – Thymidinkinase in Hirntumoren und die anschließende Gabe der Prodrug Ganciclovir eine effektive in situ Chemotherapie von Hirntumoren möglich ist. Wir haben ein Suizidsystem auf der Basis der Cytosindeaminase eingesetzt. Cytosindeaminase, ein in Bakterien und Pilzen, nicht jedoch in eukaryotischen Zellen vorkommendes Enzym, katalysiert die hydrolytische Deaminierung des Antimykotikums 5-Fluorcytosin in das hochtoxische 5-Fluoruracil.

Basierend auf den ausgeführten Erkenntnissen war es Ziel dieser Arbeit, einen Plasmidvektor zu konstruieren und in vitro auszutesten, der eine kombinierte Expression von hIL-2 und CD aufweist. Die cDNAs für das CD- bzw. hIL-2 Gen wurden in den Vektor pUHD 10.1 kloniert, woraus pUHD 10.1-hIL-2-CD resultierte. In diesem Vektor wird die Transkription des CD-Gens von dem Zytomegalievirus Promotor (CMV) und die Transkription des humanen IL-2 Gens von Rous Sarkoma Virus Promotor getrieben. Dafür wurde die menschliche Glioblastomzelllinie T 1115 mittels Lipofektin mit pUHD 10.1-IL-2 CD und pSV 2 neo stabil kotransfiziert. Es resultierten 33 selektionierte Klone, welche bezüglich ihrer qualitativen und quantitativen hIL-2 und CD Expression mittels hochspezifischer ELISA (hIL-2) nachgewiesen wurden. Qualitativ verwendeten wir einen MTT-Assay, mit dem die zytotoxische Wirkung von 5-FU auf T 1115 Zellen gemessen wurde und den mononukleären Zytotoxizitätsassay zum Nachweis der Zytotoxizität von hIL-2 stimulierten Monozyten Zellen gegen Tumorzellen.

Zehn der 33 Klone produzierten sowohl hIL-2 als auch das CD-Gen in unterschiedlichen Mengen. Im MTT-Assay wiesen die 10 Klone ein unterschiedliches Ansprechverhalten auf die Gabe von 5-FC über einen Zeitraum von 10 Tagen auf. Während sich bei einzelnen Klonen schon bei einer minimalen 5-FC Konzentration eine hohe Zytotoxizität ergab, war bei anderen Klonen die Sensitivität sehr gering ausgeprägt (80 % Zytotoxizität bei 20mM 5-FC Konzentration).

Alle 10 Klone wurden im mononukleären Zytotoxizitätsassay (MZA) getestet und vermittelten entsprechend ihrer hIL-2 Produktion eine Zytotoxizität zwischen 25-85%.

Ferner wurde in dieser Arbeit der sogenannte Bystandereffekt nachgewiesen. Es konnte aufgezeigt werden, daß nicht transfizierte Tumorzellen bei Kokultivierung mit transfizierten abgetötet werden. Dabei scheinen die sogenannten gap-junctions zwischen den einzelnen Zellen oder Diffusion für die Einschleusung der toxischen Metabolite in die nicht transfizierte Zelle zuständig zu sein.

Der Bystandereffekt von T 1115 Zellen, die hIL-2 produzieren auf kokultivierte T 1115, die das Gen nicht exprimieren, ergab im MTT-Assay bei Kokultivierungsverhältnissen von 1:1, 1:3, 1:7 und 1:30 Zytotoxizitätsraten von 77%, 62%, 48%, 28%.

Ebenso konnten wir einen deutlichen Bystandereffekt für das CD-Gen aufzeigen (siehe Ergebnisse). Dabei konnte bei einem Mischungsverhältnis von 50% Zellen der Mutterlinie und 50% Zellen der transfizierten Linie eine Zytotoxizität über 80 % bei den verschiedenen Klonen nachgewiesen werden.

Das beschriebene System stellt jedoch auch ein Suizidgensystem dar, welches als Sicherheitsfaktor für eine kombinierte Chemo- und Immuntherapie dienen kann. Gerät die

hIL-2 Expression außer Kontrolle, kann durch die Gabe von 5-FC die Tumorzelle, die beide Geninformationen trägt, irreversibel abgeschaltet werden.

Diese erfolgversprechenden *in vitro* Ergebnisse können selbstverständlich keine *in vivo* Verhältnisse wiedergeben, aber sie zeigen durchaus, daß berechtigte Hoffnungen für eine *in vivo* Therapie bestehen, die von einigen Gruppen derzeit durchgeführt werden.