

Anton Musial
Dr. med.

Transfektion von Interleukin-2-cDNS in murine parentale Nierentumorzellen (RENCA).
Genotypisierung der stabilen Transfektanden. Überprüfen der biologischen Wirksamkeit als
Tumorvakzine

Geboren am 07.09.1967 in Heydebreck, Polen
Reifeprüfung am 03.06.1986 in Kattowitz, Polen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1986 bis SS 1995
Vorklinisches Studium an der Medizinischen Akademie Kattowitz
Klinisches Studium an der Universität Heidelberg
Praktisches Jahr in den Universitätskliniken Heidelberg
Staatsexamen am 15.11.1995

Promotionsfach: Urologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. S. Pomer

Das metastasierende Nierenzellkarzinom ist strahlen- und chmotherapieresistent. Als Alternative bietet sich die Immuntherapie an (z.B. systemische Interleukin-2 und Interferon- α Gabe), die sich jedoch bislang nicht als Standardtherapie durchsetzen konnte, u.a. weil sie mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen behaftet ist und eine Ansprechrate von unter 30% aufweist.

Auf der Suche nach neuen Behandlungsmethoden wurde das Konzept der Tumor-Vakzinierung aufgegriffen. Als eine neue vielversprechende, zur Zeit noch experimentelle, Behandlungsstrategie gilt die Generierung von Zytokin- (z.B. Interleukin- oder/und Interferon-) –sezernierenden Tumorzellen, die im Sinne einer Vakzine appliziert werden können.

Das Ziel dieser Arbeit war eine stabile Transfektion von Interleukin-2-cDNA in die parentalen RENCA-(murine Nierenzellkarzinom)-Zellen. Dabei sollten die effizientesten Transfektionsvektoren ermittelt, und wirksamsten Transfektionsmethoden erarbeitet werden. Außerdem sollte die biologische Wirksamkeit der Transfektanden als Zytokin-sezernierende Tumorvakzine untersucht werden. Die Möglichkeit einer Überprüfung ihrer antitumorösen Wirkung bot das murine RENCA (renal cancer)-Modell in immunkompetenten BALB/c-Mäusern.

Als erster Schritt wurden die Transfektionsvektoren PzipNeo/Il-2 und RcCMV/Il-2 präpariert. Die Transfizierbarkeit der Zellen wurde im Luciferase-Assay überprüft. Zum Transfer der Plasmidvektore in die Tumorzellen wurden drei Transfektionsmethoden eingesetzt: die Elektroporation, die Calcium-Phosphat-Kopräzipitation und Lipofektion. Die besten Ergebnisse zeigte die Kombination: RcCMV/Il-2 mit Elektroporation; es konnten 15 Klone erzeugt werden.

Nach dem Hochzüchten der Klone, wurde mittels einer Southern Blot-Analyse der Nachweis vom Einbau des Il-2-Inserts in die genomische DNA durchgeführt. Die Il-2-Produktion im Medium wurde mittels ELISA überwacht. Da vor dem Einsatz als Vakzine *in vivo* die Transfektanten proliferationsunfähig gemacht werden müssen, wurde die Il-2-Sekretion auch nach Bestrahlung mit 200 Gy über 10 Tage kontrolliert. Für weitere Experimente wurde der Klon mit der höchsten Sekretionsleistung (bis 370ng/10⁶ /24h) ausgewählt.

Nach Inokkulation von 10⁵ parental RENCA-Zellen unter die linke Nierenkapsel der BALB/c-Mäuse erfolgte in getrennten Gruppen am 7. postoperativen Tag (lokalisiertes Stadium) und am 21 postop. Tag (metastasierendes Stadium) die intraperitoneale Applikation von jeweils 1,5x10⁶ strahlungsinaktivierten RENCA/IL-2 Transfektanten. In einer dritten Gruppe von Tieren im Stadium der Metastasen wurden zusätzlich 50.000 I.E. Interferon-a-2b intraperitoneal gespritzt.

Als Ergebnis konnten in der Gruppe der nicht behandelten Tiere (N=10) schon am 21 Tag sichtbare Nierentumore und palpable Lymphknotenmetastasen beobachtet werden. Nach 33 Tagen lebten nur noch 30% der Mäuse, alle mit großen Tumoren und Lymphknoten- sowie Fernmetastasen. Dagegen konnte bei den im lokalisiertem Stadium behandelten Tieren (N=10) (7. Tag nach Tumorinokkulation) eine signifikante ($p < 0,005$) Abstoßung der perentalen Tumoren festgestellt werden. Am 33 Tag lebten alle Mäuse, lediglich 30% wiesen sichtbare Tumoren auf und 17% zeigten Fernmetastasen. Bei den erst im metastasierenden Stadium vakzinierten Tieren (N=10) zeigten sich keine signifikanten Therapieerfolge. Auch die Interferon-Gabe in diesem Stadium brachte hier keinen therapeutischen Effekt.