

Aus der Fakultät Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie
und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Ernst Wagner

vorgelegt über den Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Vorstand Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)

**Nichtvirale Gentransfersysteme zur Tumorthherapie in verschiedenen
Mausmodellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Silke van der Piepen

aus

Pretoria

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Referent: Uni.-Prof. Dr. H. Ammer

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Gentherapie in der Krebsforschung	4
1.2	Gentransfersysteme <i>in vivo</i>	5
1.2.1	Virale Gentransfersysteme	5
1.2.2	Nichtviraler Gentransfer	6
1.3	Strategien und Methoden	8
1.3.1	Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer	8
1.3.2	Elektroporation	11
1.3.3	Tumor-Gentherapie mit dem TNF α -Gen	13
1.3.4	Enzym-Prodrug-Therapie mit P450-Gen und CPA	15
1.4	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien und Reagenzien	17
2.2	Plasmide	18
2.3	Herstellung von Polyplexen	18
2.4	Messungen von Partikelgröße und Zeta-Potential	19
2.5	Reinigung der Polyplexe durch Größenausschluß-Chromatographie	20
2.6	Zellkultur	21
2.7	Versuchtiere	21
2.8	Experimentelle Tumormodelle	22
2.9	Systemische Applikation von Polyplexen	23
2.10	Luziferase-Reporter-Gen-Expressions-Assay	23
2.11	Elektroporation <i>in vivo</i>	24
2.12	Intraperitoneale Applikation	25
2.13	Epifluoreszenz-Mikroskopie	25
2.14	Histologie	26
2.15	Erythrozyten-Aggregation	26
2.16	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28

3.1	Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer	28
3.1.1	PEI22lin-Polyplexe in verschiedenen Mausstämmen	28
3.1.2	Gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe	29
3.1.3	Transferrin-konjugierte PEI-Polyplexe mit und ohne Melittin	37
3.1.4	Histologie nach systemischem Gentransfer	40
3.2	Elektroporation für den lokalen Gentransfer von DNS	43
3.2.1	Etablierung des CT26-Tumormodells	43
3.2.2	Etablierung der Elektroporation	47
3.2.3	Histologischer Nachweis von GFP nach Elektroporation	55
3.3	Tumor-Gentherapie mit dem TNF α -Gen	56
3.3.1	Etablierung des B16F10-Tumormodells in der C57BL/6-Maus	57
3.3.2	Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne Doxil [®] im B16F10-Tumormodell	61
3.3.3	Doxil [®] -Titration in der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumormodell	65
3.3.4	Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne Doxil [®] im Neuro2A-Tumormodell	67
3.3.5	Lokale TNF α -Gentherapie mittels Elektroporation	69
3.3.6	Kombination von systemischer TNF α -Gentherapie und Elektroporation mit dem IFN α -Gen	71
3.4	Enzym-Prodrug-Therapie mit P450 und CPA	72
3.4.1	CPA-Titration im Huh7-Tumormodell in der SCID-Maus	72
3.4.2	Elektroporation mit P450-Gen in Kombination mit CPA im Huh7-Tumormodell	74
3.4.3	Lokaler und systemischer Gentransfer mit P450-Gen in Kombination mit CPA im Neuro2A-Tumormodell	78
4	Diskussion	81
4.1	Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer	81
4.2	Etablierung der Elektroporation	84
4.3	Tumor-Gentherapie mit TNF α -Gen	87
4.4	Anwendung des GDEPT-Konzepts	90
5	Zusammenfassung	93
6	Summary	95
7	Referenzen	97

8	Abkürzungsverzeichnis	106
9	Danksagung	110
10	Lebenslauf	111

1 Einleitung

1.1 Gentherapie in der Krebsforschung

Das Einschleusen therapeutischer Gene in humane somatische Zellen zur Heilung einer bestimmten Krankheit ist Grundlage der somatischen Gentherapie. Die eingeschleusten Fremdgene sind inaktiv, bis sie innerhalb der Zielzellen durch die zelluläre Transkriptions/Translations-Maschinerie in ein therapeutisches Protein umgewandelt werden. Gentherapie wird für folgende Indikation in klinischen Studien wie monogenetische Krankheiten (Hämophilie A and B, Zystische Fibrose) sowie infektiöse und vaskuläre Krankheiten angewendet. Weitere Anwendungsgebiete sind DNS Vakzination (1), metabolische Krankheiten und zerebrale Krankheiten sind erst kürzlich in das Blickfeld der Forschung gerückt. Das Hauptaugenmerk gilt derzeit aber der Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden bei Krebserkrankungen. Krebs ist ein Krankheitskomplex mit vielen verschiedenen Ausprägungen, die durch eine Vielzahl von unterschiedlichen genetischen Abnormalitäten im Zellgenom, wie z. B. mutationsbedingte Veränderungen oder dem Fehlen von bestimmten Genen, verursacht wird. Krebsleiden werden in zunehmendem Maße diagnostiziert und sind nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Standardbehandlung bei Krebs ist die chirurgische Entfernung des Tumors mit nachfolgender Strahlen- und/oder Chemotherapie. Diese Strategie ist jedoch nicht immer erfolgreich, entweder weil der Tumor nur teilweise entfernt werden kann, bereits metastasiert ist oder resistent ist. Strahlen- und/oder Chemotherapie haben oft auch erhebliche Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen. Daher werden dringend Behandlungsmethoden benötigt, die den Tumor und dessen Metastasen selektiv eliminieren, dabei aber gesundes Gewebe möglichst nicht angreifen und somit Nebenwirkungen reduzieren oder sogar völlig vermeiden. Die Gentherapie bietet die Möglichkeit, solche Krankheiten durch Gensubstitution zu heilen, die auf einem einzigen genetischen Defekt beruhen. Durch das Einbringen eines gesunden Gens können mutierte DNS-Abschnitte, die für nicht funktionierende oder „kranke“ Proteine in einer Krebszelle kodieren (wie z.

B. das Protein p53 als wichtiger Mediator für Apoptose), ersetzt oder wieder hergestellt werden. Außerdem könnte durch Gentherapie gezielt das Immunsystem aktiviert werden, das dann Tumorzellen selektiv erkennen und eliminieren kann. Andere therapeutische Konzepte zielen auf das direkte Abtöten von Tumorzellen durch das Einbringen Zelltod-induzierender Gene (Tumor-Nekrose-Faktor alpha) und das Verhindern von Tumorneogenese (2).

Derzeit sind ca. zwei Drittel der klinischen Gentherapie-Studien gegen Krebs gerichtet (3). Die größte Herausforderung dabei ist die Entwicklung von effektiven Vektoren für den Transport der Gene in die Zielzelle. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen viralen und nichtviralen Systemen. Dabei stellt der systemische Gentransfer über den Blutstrom derzeit noch eine große Barriere dar, da die Vektoren oft durch Blutkomponenten wie Plasmaproteine, das Komplementsystem, Gerinnungsfaktoren- und/oder durch Zellen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) eliminiert werden. Bei zellspezifischen Vektoren kann der Erfolg durch die begrenzte Diffusion der Partikel im Zielgewebe limitiert sein. Andere physikalische Gentransfermethoden werden lokal angewendet. Sie sind zum Teil wirkungsvoller, was den Gentransfer betrifft, haben aber auch den Nachteil, dass sie durch den lokalen Einsatz nur auf einen begrenzten Tumorbereich angewendet werden können. Eine Strategie, um diesen Nachteil zu umgehen ist, das Immunsystem durch Gentherapie soweit zu aktivieren, dass es den Tumor und dessen Metastasen selbst erkennen und selektiv eliminieren kann.

1.2 Gentransfersysteme *in vivo*

1.2.1 Virale Gentransfersysteme

Viren haben effektive Mechanismen entwickelt, ihr Genom in die Säugetierzelle zu transportieren und waren daher auch die ersten Vektoren, die für gentherapeutische Ansätze eingesetzt wurden. Theoretisch kann ein einziges Virus die Expression des gewünschten Gens in der Zielzelle bewirken.

Zunächst wurden in Studien Retroviren für den Gentransfer in Säugetierzellen *ex vivo* eingesetzt (4), in Einzelfällen bereits mit therapeutischen Erfolg (5). Retrovirale Vektoren bergen jedoch das Risiko, unspezifisch in das Wirtzellgenom zu integrieren,

was unter Umständen zu einer Aktivierung von Onkogenen führt. In einer kürzlich durchgeführten Gentherapiestudie mit Retroviren beim Menschen kam es aufgrund dieses Vorgangs zum Ausbruch einer Leukämie (6).

Im Gegensatz zu den retroviralen Vektoren eröffnen adenovirale Genfähren die Möglichkeit, sowohl teilende als auch nicht-teilende Zellen zu infizieren. Aufgrund des natürlichen Tropismus der Adenoviren und ihrer immunogenen Eigenschaften ist eine wiederholte Anwendung über den Blutstrom allerdings nicht möglich. Deshalb wird versucht, durch Veränderung der Oberflächenstruktur, die immunogenen Eigenschaften der Adenoviren zu reduzieren. Dies erfolgte sowohl durch genetische Modifikation der Kapsid-Proteine (7;8), als auch durch chemische Modifikation der Kapsid-Oberfläche durch hydrophile Polymere und Rezeptorliganden (9).

Adeno-assoziierte Viren (AAV) repräsentieren eine Gruppe von nicht-pathogenen Viren, die auch für die Tumor-Gentherapie eingesetzt werden können (10). Zwar kann dieses virale Vehikel nur relativ kurze Sequenzen an genetischem Material transportieren, dafür vermittelt es aber eine langandauernde Expression des Transgens *in vivo*. Das Risiko einer unspezifischen Integration in das Wirtszellgenom bleibt allerdings auch dabei erhalten (11).

1.2.2 Nichtviraler Gentransfer

Beim nichtviralen Gentransfer werden physikalische Methoden wie Elektroporation (12;13), Gene Gun (14), Magnetofektion (15) und Infrarot-Lasertechnik (16), die lokal eingesetzt, oder partikuläre Vehikelsysteme, wie Polyplexe, Lipoplexe oder Lipopolyplexe (17) appliziert, die auch systemisch angewendet werden können. Nichtvirale Gentransfersysteme bieten einige Vorteile im Vergleich zu den viralen Vektoren. Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNS oder siRNS) und die Transportpartikel, soweit man diese benötigt, können in großen Mengen mit relativ niedrigen Kosten produziert werden. Außerdem besitzen sie keine oder nur geringe immunogene Potenz. Jedoch sind auch mit diesen Methoden einige Barrieren zu überwinden: Bei den systemisch über den Blutstrom eingebrachten Genfähren addieren sich Probleme wie Partikelgröße der Vektoren, unspezifische Interaktionen mit Blutbestandteilen und der extrazellulären Matrix, sowie dem Nachteil einer nicht zielgerichteten und unspezifischen Bindung an diverse Zelltypen (18). Obwohl einige

Vektoren zu Verfügung stehen, die effektive Transfektionsraten in Zellkultur zeigen, ist ein effizienter und zielgerichteter spezifischer Gentransfer *in vivo* noch eine große Herausforderung. Zum Beispiel müssen beim systemischen Einschleusen von DNS-Partikeln die transfizierenden Komplexe klein genug sein, um physiologische Barrieren zu passieren und sich spezifisch an die Zielzelle zu binden. Sie sollten außerdem resistent gegen enzymatischen Abbau im Blut und anderen Körperflüssigkeiten sein und dürfen nicht mit Zellen des unerwünschten, unspezifischen Gewebes, wie zum Beispiel der Lunge oder dem Retikulo-Endothelialen-System (RES) interagieren. Wenn die Genfähren von den Zielzellen durch Adsorption oder durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen worden sind, so ist der limitierende Faktor die endosomale Freisetzung der DNS in das Zytoplasma und ihr Transport zum Zellkern der Zelle. Ein großer Vorteil nichtviraler DNS-Komplexe liegt darin, dass die Größe der darin integrierten therapeutischen Gene nicht limitiert ist wie bei den viralen Vektoren. Des Weiteren erlaubt das synthetische Design eine hohe Flexibilität und kann relativ einfach durch unterschiedliche chemische und physikalische Modifikationen geändert werden. Polykationische Trägermoleküle können zu dem als eine Art Baustein genutzt werden, an den verschiedene biologische Moleküle mit unterschiedlichen Funktionen angehängt werden. Ein gut charakterisiertes und in den letzten Jahren viel verwendetes Trägermoleküle ist das Polykation Polyethylenimin (PEI), mit dessen Hilfe man einige physiologischen Barrieren (wie Verhinderung des Abbaus der Genfähren durch das RES) der nichtviralen Gentherapie überwinden konnte (19).

Ein großer Vorteil physikalischer Gentransfermethoden wie z. B. der Elektroporation ist, dass sie einfacher zu handhaben sind, meistens sogar unverpackte DNS in beliebiger Menge eingesetzt werden kann, und die Zellmembranbarriere bei den physikalischen Methoden leicht zu überwinden ist. Der große Nachteil dieser Methoden ist, dass sie nur lokal angewendet werden können. Bei der Therapie von Metastasen stellt dies nach wie vor ein Problem dar. Dabei ist die Herausforderung in der Tumorbehandlung nicht die durch die physikalische Methode erreichbare Genexpression, sondern die richtige Zusammenstellung von therapeutischen Genen mit und ohne Kombination mit anderen Medikamenten.

1.3 Strategien und Methoden

1.3.1 Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer

Polyethylenimin (PEI), ein organisches Makromolekül mit einer hohen Dichte protonierbarer Aminengruppen, eignet sich optimal für die Kondensation und Komplexierung von DNS. Die positiven Ladungen der Stickstoffatome im PEI-Molekül können mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS interagieren und somit kann die DNS in kompakte kleine Komplexe kondensiert werden (20-22). Die so komplexierte DNS wird effektiv vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Zudem kann es zu einer verstärkten zellulären Aufnahme dieser Partikel durch adsorptive Endozytose oder Makropinozytose kommen. Das Ausmaß der DNS-Kondensierung hängt vom Verhältnis der positiv geladenen Stickstoffgruppen im Polykation zu den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS ab und wird im Falle eines einfachen Polyplexes (bestehend aus PEI und DNS) als N/P-Verhältnis angegeben. Der Vorteil von PEI gegenüber anderen Polyaminen wie den Polylysinen besteht darin, dass bei physiologischem pH nur ein Teil der potentiell protonierbaren Aminogruppen tatsächlich protoniert ist. Deshalb kann PEI in saurem Milieu (wie z. B. nach der Internalisierung in Endosomen) weitere Protonen aufnehmen und dadurch den pH-Wert abpuffern, was zu einer erhöhten Freisetzung aus dem endosomalen Kompartiment führt. Diese Protonierungskapazität von PEI hat sich als sehr wichtig für die Transfektionseffizienz erwiesen, da PEI zur guten DNS-Kondensation zugleich eine (intrinsische) endosomolytische Aktivität besitzt und dadurch die Endosomenmembran aufgelöst und die DNS intrazellulär freigesetzt werden kann (18).

Wird für die DNS-Komplexierung wenig Polykation (also ein niedriges N/P-Verhältnis) benutzt, werden die Komplexe zwar elektroneutral, formen dafür aber große Aggregate, die für die systemische *in vivo* Applikation nicht geeignet sind. Bei einem hohen N/P-Verhältnis dagegen sind die Komplexe klein und löslich, aber positiv geladen. Diese Komplexe können unspezifisch direkt mit der Zelloberfläche von vielen Zelltypen interagieren und von diesen aufgenommen werden (23). Allerdings vermitteln die positiven Ladungen auch die Aggregation von Erythrozyten. Neben der

Erythrozyten-Aggregation kann eine Aktivierung des Komplement-Systems die Folge von systemisch verabreichten Komplexen sein (24).

Mit PEI-Polyplexen sind hohe Transfektionraten *in vitro* und auch in einigen Applikationen *in vivo* erzielt worden (25-27). Relativ hohe Reporter-Gen-Expression nach lokaler und systemischer Applikation wurde mit linearen PEI₂₂-Komplexen (Molekulargewicht 22 kDa) gefunden, wobei das Lungengewebe die höchste Expression zeigte (28), während eine spezifische, gezielte Genexpression im Tumor oder Organen nicht erreicht wurde. Trotzdem wurden in dieser Arbeit, um eine Ausgangsbasis für den systemischen Gentransfer zu haben, zuerst einfache PEI₂₂lin/DNS-Komplexe in drei verschiedene Mausstämme injiziert und somit eine Ausgangsbasis etabliert.

Bei dem für *in vitro* und *in vivo* Transfektionen optimierten N/P-Verhältnis von 6 ist bis zu 80% des PEI nicht mit der DNS komplexiert, sondern frei in Lösung (29;30). Da ungebundenes PEI auf zellulärer (Erythrozyten, Lungenendothel) und systemischer (Aktivierung des Komplementsystems) Ebene toxisch wirkt (31;32), ist es wünschenswert, freies PEI von den Komplexen abzutrennen, was in unserer Gruppe durch Größenausschlusschromatographie (SEC) erreicht wurde (33). Da freies PEI wesentlich kleiner ist als der DNS-Komplex, kann es mit den Poren des Säulenmaterials besser interagieren, wird also im Vergleich zum Komplex auf der Chromatographiesäule retardiert und kann so abgetrennt werden. Die gefiltrierten Partikel zeigten *in vitro* zwar eine leicht reduzierte Transfektionseffizienz, dafür aber eine erheblich verringerte Toxizität. Deswegen sollte als nächster Schritt im Rahmen dieser Arbeit die Anwendung der gereinigten Vehikel *in vivo* untersucht werden.

Wie oben erwähnt, führt die systemische Applikation einfacher PEI/DNS-Transfektionskomplexe vor allem zu einer hohen Transgen-Expression in der Lunge. Außerdem bewirkt die positive Oberflächenladung der Komplexe unspezifische Interaktionen mit Blutkomponenten oder gesundem Gewebe, was den zielgerichteten Gentransfer zu einem weit entfernt wachsenden Tumor erschwert. Es mussten deshalb Liganden gefunden werden, die an das Polykation konjugiert werden können und zielgerichtet an bestimmte Oberflächenstrukturen der gewünschten Zielzellen binden. Zugleich sollte dadurch die positive Oberflächenladung der Komplexe

abgeschirmt werden (34). Dies wurde z. B. durch das integrieren von Transferrin-Liganden in die Komplexe in entsprechend hoher Dichte erreicht. Transferrin ist ein Glykoprotein, das mit hoher Affinität an den Transferrin-Rezeptor bindet. Letztere sind auf stark proliferierenden Tumorzellen in erhöhtem Maße zu finden. Mit Transferrin abgeschirmte Komplexe können so erstens selektiv im Tumorgewebe akkumulieren und zeigen zweitens durch die resultierende elektroneutrale Außenladung keine Erythrozyten-Aggregation mehr. Dadurch kann der Komplex länger in der Blutzirkulation bleiben und somit auch entferntes Tumorgewebe erreichen. In früheren *in vivo* Versuchen wurden mit Transferrin abgeschirmte Transfektionskomplexe bereits erfolgreich von R. Kircheis und Kollegen eingesetzt (35). Diese Komplexe sollten nun auch hier etabliert und an 3 verschiedenen Mausstämmen mit den dazugehörigen Tumormodellen *in vivo* getestet werden.

Da die Partikel über Endozytose in die Zelle gelangen, musste ein Weg gefunden werden, die Komplexe aus den Endosomen in das Zytoplasma freizusetzen, bevor lysosomale Enzyme die DNS-Partikel abbauen. Dazu wurde das membranaktive Peptid Melittin direkt an das Polykation gekoppelt. Melittin ist eine Komponente des Bienengiftes und kann synthetisch hergestellt werden (36). Durch seine Eigenschaft Membranen zu destabilisieren und zu lysieren, bewirkt Melittin eine verbesserte Freisetzung von DNS-Komplexen aus Endosomen in das Zytosol. Die Transfektionseffektivität von Melittin alleine und in Kombination mit PEI wurde ausführlich *in vitro* getestet und konnte weiter verbessert werden (37). Die Wirksamkeit von Melittin-Komplexen sollte in dieser Arbeit nun auch *in vivo* getestet werden.

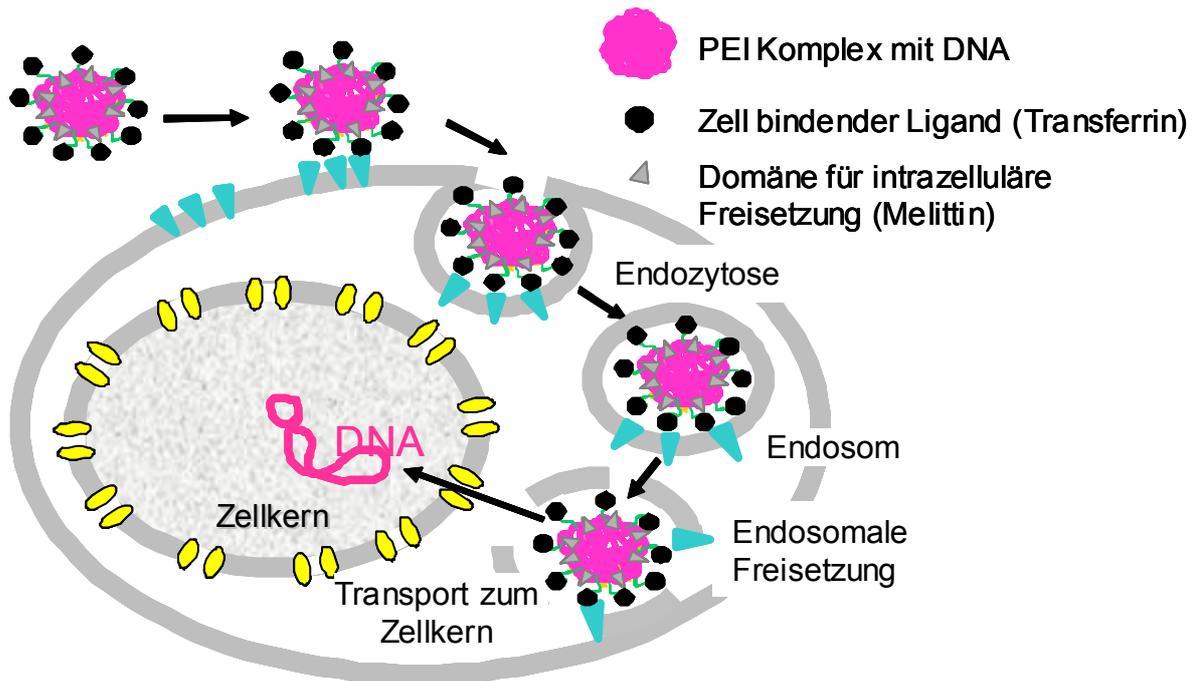


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von PEI-Polyplexen. Die Transferrin-abgeschirmten Polyplexe werden durch Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen. In der Zelle erfolgt die Freisetzung der Polyplexe aus den Endosomen durch das an den Polyplexen gebundene, endosomolytisch aktive Melittin. Die freien Polyplexe werden zum Zellkern transportiert und die DNS dort freigesetzt. Quelle: Arbeitskreis Prof. E. Wagner, LMU München.

1.3.2 Elektroporation

Für den lokalen Gentransfer wurde die physikalische Methode der Elektroporation eingesetzt. Hier wird mit Hilfe von feinen Nadel-Elektroden oder Kaliper-Elektroden kurzzeitig ein elektrisches Feld (20 - 100 V) im Zielgewebe erzeugt (38). In diesem Feld orientieren sich Ionen und freie geladene Moleküle aufgrund ihrer Ladung, so dass es zu einem Elektrophorese-ähnlichen Transport durch die Lipiddoppelschicht von den Zellmembranen kommt. Es entstehen dabei in der Membran reversible hydrophile Kanal Poren, die für mehrere Sekunden bis Minuten geöffnet sind. Durch diese Poren können auch relativ große Moleküle wie Nukleinsäuren in die Zellen eingeschleust werden. Dieser Molekültransfer nach Elektroporation der Zellmembran ist durch vier wichtige Schritte gekennzeichnet: die Bindung der Nukleinsäuren an die Zellmembran, die Insertion des Moleküls über die entstandenen Poren, der Transport durch die Membran in das Zytosol und schließlich der Transport in den Zellkern (39).

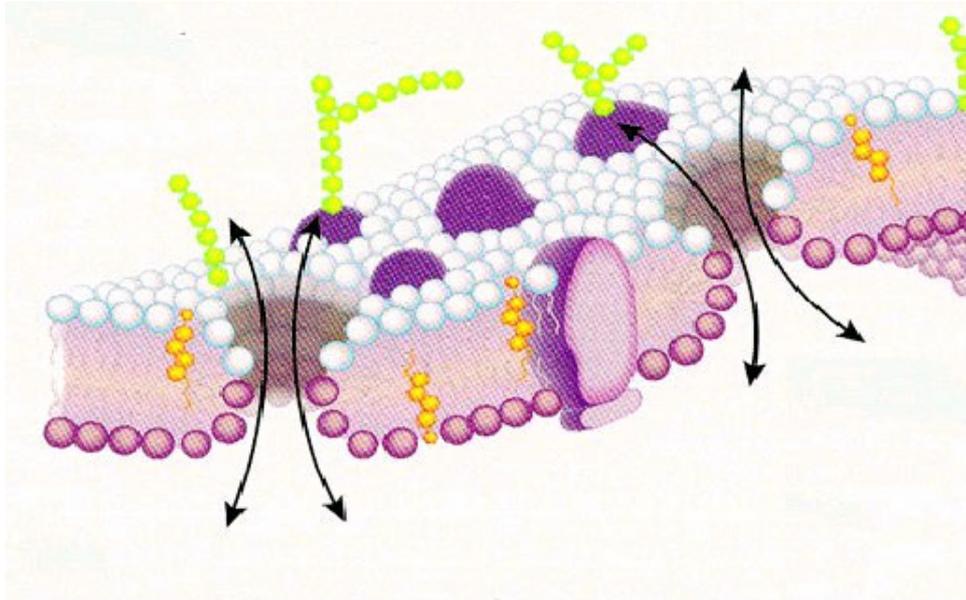


Abbildung 2: Darstellung von Membranporen in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, wie sie durch Elektroporation erzeugt werden. Durch diese Poren können verschiedene Substanzen wie Plasmid-DNS, Chemotherapeutika und Medikamente ins Zellinnere gelangen. Quelle: Prof. E. Wagner, LMU München

Die entscheidenden Parameter bei der Elektroporation sind die Stärke des elektrischen Feldes und die Pulslänge. Stärke und Ausdehnung des elektrischen Feldes sind Funktionen aus angelegter Spannung (in V/cm), Elektrodendesign (vor allem der Abstand zwischen den Elektroden) und dem Widerstand des jeweiligen Gewebes (40). Die Effizienz der Elektroporation variiert in Abhängigkeit von den verwendeten Parametern und betroffenen Geweben. Die Dauer der Pulse und die Höhe der angesetzten Spannung haben signifikanten Einfluss auf die Effizienz, während die Anzahl der Pulse vor allem die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass jede Zelle im elektrischen Feld Membranporen ausbildet und somit transfiziert wird. Die Höhe der Spannung in Verbindung mit der Pulsdauer ist deshalb wichtig, weil ein sehr niedriger elektrischer Impuls möglicherweise die Zellmembranen nicht soweit verändert, dass ein vermehrter Eintritt von Nukleinsäuren stattfindet. Längere Pulse bei niedriger Spannung haben einen ähnlichen Effekt wie kürzere Pulse mit höherer Spannung. Die meisten der *in vivo* Elektroporationen werden mit niedriger Spannung (20 – 100 V) und einer Pulsdauer im Millisekundenbereich durchgeführt. Diese Methode ist nicht schmerzhaft und lediglich als leichtes Kribbeln spürbar (41). Die Dosierung der verschiedenen Parameter wird so gewählt, dass keine Gewebeschäden auftreten. Versuche in Mäusen und anderen Labornagern haben

eine 100 – 1000 fache Steigerung der Genexpressionen nach Elektroporation gezeigt. Die Elektroporation ist demnach eine effiziente Methode, um Nukleinsäuren in das Zielgewebe einzuschleusen. Auch in anderen Tierspezies wie Meerschweinchen, Kaninchen, Schweinen und Affen gibt es mittlerweile erste Versuche, bei denen die Elektroporation erfolgreich zur Steigerung der Genexpression ohne irgendeine Schädigung der Tiere angewendet wurde (42-44). In USA und Kanada wird die Elektroporation bereits beim Menschen in klinischen Studien der Phase II zur Therapie von Prostatakarzinom, Basalzellkarzinom, Melanom, Pankreas- und Leberkarzinom und bei Brustkrebs lokal zur Chemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin mit großem Erfolg eingesetzt (32;45-47). Die Wirkung des lokal injizierten Chemotherapeutikums wurde mittels Elektroporation in den Tumoren derart verstärkt, dass es zum massiven Tumorzelltod und damit zum Verschwinden der Tumoren kam: 98% komplette Reduktion bei Basalzellkarzinom (48) und 89% bei Melanom mit Bleomycin (49). In den klinischen Studien wurde die Behandlung von allen Patienten gut toleriert und zeigte wesentlich weniger unerwünschte Nebenwirkungen als die herkömmliche Methode der systemischen Verabreichung von Chemotherapeutika. In dieser Arbeit wurde zunächst die Elektroporation mit Reportergenen an verschiedenen Tumormodellen in der Maus etabliert, um die bestmöglichen Parameter der Applikation in Tumor und Muskel zu evaluieren.

1.3.3 Tumor-Gentherapie mit dem TNF α -Gen

Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α) ist ein pleiotropes Zytokin, das in Mausmodellen hämorrhagische Tumornekrose und Tumorregression auszulösen kann. Die Wirkung von TNF α basiert auf der Aktivierung und Schädigung von Tumorgefäßendothelzellen, Aktivierung von Entzündungs- und Immunzellen, und der direkten zytotoxischen Wirkung an Tumorzellen. Obwohl in Tierversuchen die potente antitumorale Aktivität von TNF α demonstriert wurde, verhindert die starke systemische Toxizität (z. B. disseminierte Koagulopathie, metabolische Azidose, akute Hypotension und Organversagen) die klinische Anwendung von TNF α in Proteinform. Um den antitumoralen Effekt von TNF α zu steigern und systemische Nebenwirkungen zu minimieren, wurde in klinischen Studien die sogenannte

Isolierte-Gliedmaßen-Perfusion entwickelt, bei der eine Kombination von TNF α mit Interferon oder Melphalan eingesetzt wurde. Trotzdem ist die systemische Applikation noch eine große Herausforderung (50). Ein neuartiger Ansatz, das zytotoxische Potential von TNF α für die Krebstherapie zu nutzen, wäre die Gentherapie. Die Dosierung des therapeutischen wirksamen Zytokins kann hier anhand der Menge des eingesetzten Gens sichergestellt und die Therapie zielgerichtet auf die Tumorzellen angewendet werden (51).

In dieser Arbeit wurde das TNF α -Gen lokal im Tumor mittels Elektroporation und systemisch mit Hilfe von Polyplexen eingesetzt. In weiteren Versuchen wurde eine Kombinationstherapie mit und ohne dem Chemotherapeutikum Doxil[®] durchgeführt. Intraperitoneal verabreichtes Doxil[®] wird von allen Zellen des Körpers unspezifisch aufgenommen und kann dort seine Wirkung entfalten (52). In Kombination mit der TNF α Applikation sollte somit ein synergistischer Effekt zwischen Gentherapie und niedrig dosierter Chemotherapie mit dem Ziel eruiert werden, das Tumorstadium zu reduzieren oder sogar eine Tumoreradikation zu erreichen. Diese Kombinationstherapie würde somit einen neuen Ansatz darstellen, um die Chemotherapie wirkungsvoller und vor allem verträglicher zu machen.

Zusätzlich zu dem Zytokin TNF α wurde das Zytokin IFN α intratumoral mittels Elektroporation appliziert, um eine Kombinationstherapie aus systemischem und lokalem Gentransfer zu evaluieren. Interferon alpha (IFN α) ist ein Glykoprotein mit antiviralen und immunregulatorischen Eigenschaften. Es gibt für IFN α mehrere Subtypen mit vielfältigen biologischen Funktionen, die das Zellwachstum kontrollieren, zum Beispiel durch Hemmung der Angiogenese (53). IFN α war das erste in klinischen Studien eingesetzte Zytokin zur Krebstherapie. Die Behandlung mit IFN α ist bei einigen Krebsarten, wie Nierenzellkarzinom, malignes Melanom, Basalzellkarzinom und bei multiplen Myelomen sehr effektiv. Eine überzeugende therapeutische Wirksamkeit ist allerdings erst bei lang andauernder täglicher, klinischer Anwendung zu sehen. Im Tumormodellen der Maus wurde in einer Studie die Wirksamkeit von intratumoral appliziertem IFN α -Gen, mit nachfolgender Elektroporation, als sehr viel versprechend beschrieben (53). Obwohl diese Methode hier sehr effizient war, gibt es Einschränkungen bei der klinischen Anwendung, da sie wenig praktikabel für Metastasen und für mikroskopisch kleine Tumorstadien nach

chirurgischer Entfernung des Haupttumors ist (54). Um diesem Problem entgegenzutreten, sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von intratumoral injiziertem IFN α -Gen und nachfolgender Elektroporation in Kombination mit einer systemischen Applikation des TNF α -Gens in Polyplexen getestet werden.

1.3.4 Enzym-Prodrug-Therapie mit P450-Gen und CPA

Die „Gene-directed Enzyme / Prodrug Therapy“, kurz auch GDEPT genannt, ist eine neuartige Therapieform, die sich in der Zellkultur bereits als sehr erfolgreich erwiesen hat (55). Das Konzept dieser Therapie ist die Verabreichung der inaktiven Vorstufe eines Medikaments (Prodrug), das erst durch eine enzymatische Reaktion in der Zielzelle zum aktiven Wirkstoff konvertiert wird. Diese Umsetzung erfolgt durch ein spezifisches, ansonsten im Körper nicht oder nur in geringen Maßen exprimiertes Enzym. Das für dieses Enzym kodierende Gen wird in der GDEPT möglichst selektiv in die Tumorzelle eingeschleust. Danach erfolgt die Applikation der inaktiven Vorstufe des Zytostatikums und dessen Umsetzung im Tumor zum aktiven Metabolit. Die Folge ist eine hohe Konzentration des Chemotherapeutikums lokal innerhalb des Tumors, was zu einer erheblichen Reduktion der systemischen Toxizität führt. In dieser Arbeit wurde Cyclophosphamid (CPA) als Prodrug und das für das Enzym Cytochrom P450 kodierende Gen eingesetzt.

CPA wird schon lange in der Krebstherapie als Chemotherapeutikum verwendet, dabei wird in klinischen Anwendungen die maximale tolerierbare Dosis von CPA im Abstand von drei Wochen eingesetzt. Das intravenös applizierte Medikament wird in der Leber in die aktive Form metabolisiert und gelangt von dort wieder in den Kreislauf zu den Tumorzellen, aber auch zu gesundem Gewebe. Das Zytostatikum wird durch Cytochrom P450 hydroxyliert und in die zytotoxischen Metabolite Acrolein (Denaturierung von Proteinen) und Phosphoramid Mustard (Quervernetzung von DNS Strängen) umgewandelt (56;57). Die Nebenwirkungen dieser Therapie sind allerdings erheblich, da der aktive Metabolit relativ unspezifisch im gesamten Organismus wirkt.

Mit dem oben beschriebenen neuartigen therapeutischen Konzept GDEPT sollen die Nebenwirkungen durch die zielgerichtete, vorerst lokale Anwendung um ein Vielfaches reduziert werden. Zusätzlich soll zu GDEPT ein neues Therapieschema

der CPA Applikation etabliert werden. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit den Mäusen eine moderate Dosis von CPA alle 7 Tage intraperitoneal appliziert, da die Gruppe um Waxman durch dieses Therapieschema zusätzlich zu stark reduzierten Nebenwirkungen einen anti-angiogenetischen Effekt im Tumor feststellte (58).

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Etablierung zweier verschiedener nichtviraler Gentransfersysteme *in vivo* und deren weitere Optimierung für therapeutische Einsätze. Dabei handelte es sich einerseits um systemischen Gentransfer mit Polyplexen und andererseits um physikalischen Gentransfer durch Elektroporation. Hierbei waren neue Transfermethoden für Nukleinsäuren zu testen und zu etablieren. Effiziente Genexpression im Gewebe und Tumor wurde mit Reportergenen und therapeutischen Genen *in vivo* an verschiedenen Mausstämmen gezeigt. Als Reportergene wurden die Gene für Luziferase (Luc), β -Galaktosidase (β -gal) und für das grün fluoreszierende Protein (GFP) benutzt. Anschließend wurde die therapeutische Einsetzbarkeit dieser zwei Gentransfersysteme *in vivo* getestet. Dabei wurde die Wirksamkeit der Zytokine Interferon alpha ($\text{IFN}\alpha$) sowie Tumor-Nekrose-Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) alleine und in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxil[®] evaluiert. Des weiteren wurde die therapeutische Einsetzbarkeit von GDEPT (gene direct enzyme/prodrug therapy) evaluiert. Dazu wurde das Cytochrom P450 Gen lokal mittels Elektroporation und systemisch mit Polyplexformulierungen in Kombination mit dem Chemotherapeutikum CPA eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Verzweigtes PEI mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 25 kDa (B-PEI oder PEI25br) und Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) wurde bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt, Melittin-SH-Peptid (CIGA VLKV LTTG LPAL ISWI KRKR QQ; Reinheit > 95% nach HPLC Messung) wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Arnold, Genzentrum der Universität München synthetisiert. Lineares PEI (PEI22lin) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 22 kDa ist über Euromedex (Exgen 500, Euromedex, Souffelweyersheim, Frankreich) verfügbar. PEI wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml oder 1,4 mg/ml eingesetzt und vorher mit HCl neutralisiert. PEI-Konjugate mit humanem Transferrin (Tf-PEI25br, 25 kDa, verzweigt), wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml oder 1,23 mg/ml angewendet und wie in (18) beschrieben synthetisiert. PEI25lin mit 25 kDa wurde von Polysciences (Eppelheim) geliefert. Melittin-PEI (25 kDa, linear) wurde von Wolfgang Rödl (Pharmazie, LMU München) analog wie in Ogris et al. (37) für Melittin-PEI (25 kDa, verzweigt) beschrieben synthetisiert, jedoch mit folgenden Modifikationen: 0,8 µmol von PEI25lin wurden mittels HCl auf pH 7,1 eingestellt und daraufhin mit 40 µmol SPDP (gelöst in 0.2 ml DMSO, wasserfrei) gemischt und auf 2 ml mit 50 mM HEPES pH 7,1, 250 mM NaCl aufgefüllt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde auf eine Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25 superfine; HR10/30 column, Amersham Biosciences, 20 mM HEPES pH 7,1, 250 mM NaCl) geladen um somit überschüssiges SPDP sowie niedermolekulare Nebenprodukte entfernen zu können. Im gereinigten Produkt war PEI im molaren Verhältnis von 0,9/1 mit SPDP modifiziert (37). 7 mg (2,42 µmol) D-Mel-SH wurden in 100 mM HEPES, 500 mM NaCl (Puffer begast mit Argon) pH 7,4, gelöst und mit 0,1 µmol von PEI-PDP gemischt. Nach 4 h unter Argon-Atmosphäre wurde die Mischung auf eine Kationenaustauschersäule (Macro-prep High S; BioScale 2 ml; BioRad, München) geladen und mittels eines Salzgradienten (von 0,5 bis 3 M NaCl in 20 mM HEPES pH 7,1) fraktioniert. Mel-PEI

eluierte zwischen 1,45 und 3 M NaCl, und wurde anschließend mittels Ultrafiltration (Millipore-Ultrafiltration membran MWCO 10,000) aufkonzentriert und entsalzt (Endkonzentration von 20 mM HEPES, 250 mM NaCl pH 7,4). Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert (0,2 µm Membranfilter, Corning, New York, USA) und bei -80°C gelagert. Der PEI-Gehalt (0,06 mg/ml) wurde spektrophotometrisch mit Hilfe eines Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assays bei 405 nm bestimmt. Der Gehalt an Melittin (34 nmol) wurde über die Extinktionskoeffizienten bei 280 nm berechnet ($\epsilon = 5570 \text{ M}^{-1}$).

Eingesetzte Chemotherapeutika wie das Liposomales Doxorubicin (Caelyx®) wurden von Dr. Lars Lindner (Klinikum Großhadern, München) zur Verfügung gestellt und ist kommerziell bei Essex Pharma (München) erhältlich. Die Stammlösung (2 mg/ml Doxil®-HCl) wurde bei 4°C gelagert und kurz vor der Benutzung mit 5% steriler Glucose Lösung (w/v) auf eine Endkonzentration von 0,125 mg/ml verdünnt. Cyclophosphamid (CPA) wurde bei Sigma (Taufkirchen) bestellt. Das Pulver wurde in Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS, 20 mM Phosphat pH 7,4, 145 mM NaCl) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, durch eine 0,2 µm Membran (UALILAB, Bruchsal) sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2 Plasmide

Das Plasmid pCMVLuc (Photinus pyralis Luziferase) unter der Kontrolle des CMV Enhancers/Promotors (Luc) (59), wurde endotoxinfrei von Elim Biopharmaceuticals (San Francisco, USA) oder von PlasmidFactory (Bielefeld) produziert. Die Plasmide pCMV β -gal kodierend für β -Galactosidase (60), pEGFP-N1, kodierend für das grüne fluoreszierende Protein (GFP), pGSmuTNF α kodierend für Tumor-Necrose-Faktor α (TNF α) (50), und pGW-muIFN α kodierend für Interferon-alpha (IFN α), alle unter der Kontrolle des CMV-Promotors, wurden von ELIM Biopharmaceuticals (San Francisco, USA) produziert.

2.3 Herstellung von Polyplexen

Zur Herstellung der Polyplexe wurden DNS und PEI separat auf gleiche Volumina mit dem angegebenen Puffer verdünnt. Anschließend wurde die PEI-Lösung zur DNS-Lösung hinzugegeben und durch sofortiges rasches auf- und abpipettieren gemischt

(flash-mixing), um die Bildung einer möglichst homogenen Suspension mit gleich großen Partikeln zu gewährleisten. Die DNS wurde mit PEI oder PEI-Konjugaten in einem molaren Verhältnis von PEI-Stickstoff zu DNS-Phosphat (N/P-Verhältnis) von 4,8 oder 6 zu Partikeln kondensiert. Um zum Beispiel einen Polyplex mit N/P 4,8 zu generieren, wurden 50 µg Plasmid mit 31,3 µg PEI gemischt und dadurch Partikel gebildet. Die Polyplexe wurden zu einer endgültigen DNS-Konzentration von 200 µg/ml durch Mischen mit HEPES-gepufferter Glucose (5% Glucose w/v, 20 mM HEPES, pH 7,1; HBG) oder in einer 1:1 Mischung von HBS (75 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,1) und HBG (20 mM HEPES, 5 % Glucose w/v) kondensiert, um eine Isoosmolarität der Lösung sicher zu stellen. Transferrin (Tf)-PEI/DNS-Polyplexe wurden ähnlich hergestellt wie die PEI22-Komplexe, jedoch mit der Ausnahme, dass das PEI teilweise durch das Tf-PEI-Konjugat ersetzt wurde (25 % Tf-PEI, 75 % PEI22). Zum Beispiel wurden für ein N/P = 4,8 50 µg DNS mit einer Mischung von 7,8 µg Tf-PEI25br und 23,5 µg PEI22 gemischt. Die Polyplexe wurden mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen bevor sie benutzt wurden.

2.4 Messungen von Partikelgröße und Zeta-Potential

Partikelgröße und Oberflächenladung (Zeta-Potential) der Transfektionskomplexe wurden in einem Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) mittels Laser-Licht Scattering gemessen wie von Kircheis et al (18) beschrieben. Polyplex-Lösungen mit 10 µg DNS wurden in dem entsprechenden Puffer auf ein Endvolumen von 1 ml verdünnt, die Größenbestimmung erfolgte durch Mittelung von 10 Messungen. Für die Bestimmung der Oberflächenladung wurden die Komplexe mit 10 mM NaCl Lösung zu einer DNS-Endkonzentration von 2 µg/ml auf 5 ml verdünnt. Aus fünf Einzelmessungen wurde der Wert für das Zeta-Potential gemittelt. Das Zeta-Potential für Transfektionskomplexe mit PEI22lin in HBG, N/P von 6 betrug 25 +/- 5 mV, für Transfektionskomplexe mit Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2 N/P 4,8, 0 +/- 5 mV, für Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2 N/P 6 betrug es 0,4 +/- 1,6 mV und für Transfektionskomplexe mit Tf-PEI25br/PEI25lin-mel HBS1/2, bei N/P 6 betrug es 1,6 +/- 0 mV. Die Größe der Transfektionskomplexe mit PEI22lin N/P 6 betrug ca. 3000 nm, für die Transfektionskomplexe mit Tf-PEI25br/PEI22lin N/P 4,8 ca. 2500 nm, für Tf-PEI25br/PEI22lin N/P 6 ca. 652 nm und für die

Transfektionskomplexe mit Tf-PEI25br/PEI25lin-Melittin wurde die Größe mit 964 nm gemessen.

2.5 Reinigung der Polyplexe durch Größenausschluß-Chromatographie

Die Reinigung der Polyplexe wurde von Sabine Boeckle durchgeführt. Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) wurde an einem BioLogic HR Systems durchgeführt, das mit einer Bio-Scale MT 2 Säule (7 x 52 mm, 2,3 ml Säule, Volumen; Bio-Rad, München) ausgerüstet war. Die Säule wurde mit S-200 HR (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, Ausschlussgrenze für globuläre Proteine 250 kDa) gefüllt. Nach Equilibrieren mit HBG wurde die Säule mit 200 µg PEI22lin konditioniert, um die unspezifische Adsorption zu reduzieren. Bis zu 2 ml Volumen mit bis zu 400 µg/ml DNS/PEI wurde auf die Säule geladen. Die SEC wurde bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/min durchgeführt, Fraktionen von 0,3 ml wurden gesammelt. Die Absorption der DNS-Polyplexe wurde bei 254 nm aufgezeichnet. Fraktionen mit der größten Absorption wurden gesammelt und die DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm an einem Cary 3 Bio Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australien) quantifiziert. Die DNS-Konzentration wurde auf Basis von $1 \text{ OD}_{260} = 45 \text{ µg/ml}$ oder 40 µg/ml für DNS gebunden an PEI22lin bestimmt. Diese Werte wurden ermittelt, indem der Standard für PEI-Polyplexe mit dem Standard von freier Plasmid DNS verglichen wurde. Der PEI22lin Inhalt der Fraktionen wurde durch einen Kupfer-Komplex-Assay bei 285 nm gemessen, wie von Ungaro et al beschrieben (61). In Anwesenheit von Plasmid-DNS wurde die Konzentration von PEI22lin durch folgende Gleichung berechnet:

$$C_{\text{L-PEI}} = \text{ABS}_{\text{TOT}} - \text{ABS}_{\text{DNS}} / \epsilon_{\text{L-PEI/Cu(II)}} * b$$

ABS_{TOT} = Absorption bei 285 nm von PEI22lin/Cu(II) in Gegenwart von DNS

ABS_{DNS} = Absorption bei 285 nm von dem PEI22lin-Polyplex

$\epsilon_{\text{L-PEI/Cu(II)}}$ = molare Absorptivität von PEI22lin/Cu(II) bei 285 nm ($\epsilon_{\text{L-PEI/Cu(II)}} = 6,31 \times 10^5$)

b = optische Weglänge (cm)

Ist der PEI22lin Inhalt bei 285 nm (als PEI22lin/Cu(II) Komplex) gemessen, so ist die Absorption durch DNS (ABS_{DNS}) bei Anwesenheit in der Lösung beträchtlich und muss von der Gesamtaborption abgezogen werden (ABS_{TOT}).

2.6 Zellkultur

CT26-Maus Colon-Karzinom-Zellen (ATCC CRL-2638), B16F10-Maus-Melanom (erhalten von I. J. Fidler, Texas Medical Center, Houston, USA) und Neuro2A-Maus-Neuroblastom-Zellen (ATCC CCI-131) wurden in DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Huh7-Humane hepatozelluläre Karzinom-Zellen (JCRB 0403; Tokio, Japan) und HepG2-Humane hepatozelluläre Karzinom-Zellen (ATCC HB-8065) wurden in DMEM/F12 (1/1) Medium (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe) mit 10 % FKS kultiviert. Alle Zelllinien wurden ohne Antibiotika bei 37°C mit 5 % CO₂ angereicherter und angefeuchteter Luft kultiviert.

2.7 Versuchtiere

Mäuse wurden entweder von Labortierzüchtern bezogen (Harlan Winkelmann, Borchon oder Charles River, Sulzfeld) oder stammten aus der eigenen Zucht. Bis zu 5 Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen (Typ II, lang, Tecniplast IVC System; Buguggiate, Italien) unter spezifiziert pathogen freien Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug 21°C, die relative Luftfeuchte war 60% und der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden. Futter (Sniff, Spezialdiäten, Maus: Sorte Haltung, autoklavierbar, Soest) und Wasser wurden vor der Verabreichung autoklaviert und standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Die Käfigeinstreu bestand aus Sägespäne (3/4 Faser, Abedd, Köflach, Österreich) und zusätzlich erhielten die Tiere Zellstoff, ein rotes Maushaus (Tecniplast, Italien) und einen Nagertunnel aus Holz (Abedd, Köflach, Österreich). Die Käfige wurden mit Einstreu und den Zusätzen bestückt und vor der Benutzung autoklaviert. Mäuse, die von den Labortierzüchtern geliefert wurden, hatten mindestens eine Woche Zeit, sich vor Versuchbeginn an die neue Umgebung zu akklimatisieren.

Die Tierversuche sind im Rahmen der Tierversuchanträge gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung Oberbayern genehmigt worden. Alle in

dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Rahmen der beiden genehmigten Tierversuchanträge „Gentherapeutische Behandlung von Tumoren im Tier-Modellsystem“ mit dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-5/03, Antragsteller: Prof. E. Wagner und „Elektroporation zur Behandlung von Tumoren mit therapeutischen Nukleinsäuren“ mit dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-63/03, Antragsteller: Dr. C. Culmsee.

2.8 Experimentelle Tumormodelle

Die Tumorzellen wurden wie in Kapitel 2.6 beschrieben kultiviert und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) bei einer Dichte von 70 – 80 % geerntet, nachdem das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen worden waren. Die Zellsuspension wurde dann mit FKS-haltigem Medium gemischt, um das Trypsin zu inaktivieren. Beim Auszählen unter dem Lichtmikroskop wurden nur morphologisch sichtbar lebende Zellen mittels einer Zählplatte nach Rosenberg gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension 4 min bei 150 g zentrifugiert, mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und dann in PBS in der gewünschten Konzentration aufgenommen. Die Mäuse wurden an einer Flanke mit einem elektrischen Kurzhaarschneider (Braun) geschoren und anschließend mit Isofluran (Forene[®], Abbott, Wiesbaden) in eine kurze Inhalationsnarkose gelegt. Während der Narkose wurden 100 µl der Tumorzellsuspension in unterschiedlicher Konzentration subkutan mit einer 25 G Nadel (Braun, Melsungen) injiziert. Die Mäuse wurden regelmäßig auf Tumorwachstum hin untersucht. Sobald der Tumor sichtbar wurde (ab einer Größe von 10 mm³), wurde die Tumorgöße mit einem digitalen Meßschieber (Digi-Met, Preisser, Gammertingen) jeden zweiten Tag gemessen. Jede Messung beinhaltet drei Parameter, immer um 90° versetzt und das Tumolvolumen wurde mittels der Formel $a \times b \times c \times 0.4$ (wobei a, b und c den drei Messwerten entsprechen) berechnet. Da bei den Messungen die Haut, die den Tumor umgibt immer mit gemessen wird, muss ein Korrekturfaktor mit 0,4 eingefügt werden um das wirklichen Tumolvolumen zu erhalten.

Syngene-Tumormodelle:

Zehn Wochen alte BALB/c-Mäuse erhielten 10^4 bis 10^6 CT26-Tumorzellen durch eine subkutane Injektion von 100 μ l einer Zellsuspension (62). Männlichen und weiblichen 8 - 14 Wochen alte A/J-Mäusen wurden 10^6 Neuro2A-Zellen in 100 μ l subkutan injiziert. (63). Für das Maus-Melanom-Modell wurden 8 - 10 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse mit 10^4 bis 10^6 B16F10-Tumorzellen wie oben beschrieben injiziert (64).

Xenografte Tumormodelle in SCID-Mäusen:

SCID-Mäuse besitzen eine autosomal rezessive Mutation, die eine Differenzierung in T- und B-Lymphozyten unmöglich macht (65). Diese Mutation resultiert in einer Hypogammaglobulinämie und einer fehlenden Immunsystemfunktion, die durch T- und B-Lymphozyten gesteuert wird. Dies ermöglicht das Wachstum von xenograften Tumoren und verhindert ihre Abstoßung. Männlichen und weiblichen 8 – 9 Wochen alten SCID-Mäusen wurde subkutan eine Tumorzellsuspension wie oben beschrieben injiziert. Dabei wurden für das Huh7-Tumormodell 5×10^6 Zellen und für das HepG2-Tumormodell 1×10^7 Zellen pro Maus injiziert.

2.9 Systemische Applikation von Polyplexen

Für die intravenöse Injektion von Polyplexen wurden die Mäuse fixiert, indem sie in modifizierte 50 ml Falcon Röhrchen verbracht wurden. Eine Öffnung am Boden erlaubte die Luftzufuhr und eine Öffnung neben dem Deckel das Hervorholen des Schwanzes. Der Schwanz wurde für ca. 3 min in 37°C warmes Wasser gehalten, um eine Dilatation der Schwanzvenen zu erreichen. Polyplexe in einem Endvolumen von 250 μ l wurden mit einer Insulin-Nadel (30 G Nadel, U 40, Becton, Dickinson) innerhalb von 5 - 15 Sekunden appliziert.

2.10 Luziferase-Reporter-Expressions-Assay

24 bis 48 h nach der Injektion von Transfektionskomplexen wurden die Tiere mittels CO₂ euthanasiert, die entsprechenden Organe entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Nachdem die Organe auf Eis aufgetaut waren, wurde dem Gewebe 0,5 – 1 ml einer 250 mM TRIS-Pufferlösung, pH 7,5 zugesetzt und diese mit einem IKA-Gewebe Homogenisierer (IKA Werke,

Staufen) zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenisat für 10 min bei 4°C und 2800 g zentrifugiert (Haereus Megafuge 1.0 R). 25 µl von dem klaren Überstand wurden abgenommen und damit die Luziferaseaktivität mit einem Luminometer LB9507 (Berthold, Bad Wildbad) gemessen wie in Kircheis et al. beschrieben (66). Das Hintergrundsignal der Luziferasemessungen (durchschnittlich 50 - 250 RLU) wurde von jedem Wert abgezogen und die Transfektionsrate wurde in RLU (Relative Lichteinheiten) pro Organ berechnet.

2.11 Elektroporation *in vivo*

Plasmid-DNS wurde entweder unverdünnt benutzt oder in sterilem Wasser, in 5% Glucose oder in 20% Glucose verdünnt. Die Endkonzentration der Plasmid-DNS betrug 1 - 2 mg/ml. Die Mäuse wurden mit Hilfe eines Narkosegerätes (Trajan, Dräger, Lübeck) mit Isofluran (Forene[®], Abbott, Wiesbaden) in Narkose gelegt. Zum Erhalt des Toleranzstadiums wurden 1,5 – 2 % Isofluran in Sauerstoff (400 ml/min) über eine Kopfkammer verabreicht. Die Kopfkammer wurde so konstruiert, dass nur die Nase der Maus mit dem Narkosegasgemisch in Berührung kam und somit die genaue Beobachtung des Tieres gewährleistet war. Das Fell wurde mit einem elektrischen Rasierer geschoren und 25 – 50 µl DNS-Lösung wurden mit einer Insulin Nadel (30-G Nadel, U-40, Becton-Dickinson) intratumoral und/oder intramuskulär injiziert. Eine Minute nach der Plasmid-Injektion wurde die Haut mit einer Isopropanol-Lösung (70% v/v) angefeuchtet, um die Leitfähigkeit zu erhöhen. Danach wurde die Elektroporation und somit das Senden von elektrischen Pulsen mit einem Elektroporator (Electro square porator ECM 830, BTX, Genetronics, San Diego, USA) durchgeführt. Zwei verschiedene Elektroden wurden benutzt, die nicht invasive Kaliper-Elektrode und die invasive Zwei-Nadel-Elektrode. Die Kaliper-Elektrode besteht aus zwei rostfreien Stahlplatten mit einer Fläche von 1 cm² je Platte. Für die Elektroporation wurde nach der Plasmid Injektion das Gewebe vorsichtig zwischen die zwei Platten geklemmt und anschließend elektroporiert. Der Abstand zwischen den beiden Plattenelektroden variierte zwischen 0,2 und 1 cm. Die Nadel-Elektrode ist mit zwei Nadeln ausgestattet, die einen fixen Abstand von 0,5 cm zueinander haben. Für die Elektroporation wurde nach der Plasmid Injektion die Nadeln in das zu elektroporierende Gewebe gestochen und danach die elektrischen

Pulse gesendet. Die elektrischen Pulse wurden mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Pulslänge von 25 – 50 ms und einer Spannung von 80 – 1000 V/cm gesendet. Die Anzahl der elektrischen Pulse betrug 2 – 6 Pulse pro Tumor oder Muskel.

2.12 Intraperitoneale Applikation

Die Chemotherapeutika Caelyx[®], Doxil (Essex Pharma, München) und CPA (Cyclophosphamid, Sigma, Taufkirchen) wurden intraperitoneal appliziert. Dazu wurden die Mäuse mit einer Hand fixiert, auf den Rücken gedreht und in Richtung Kopf leicht nach unten gehalten (um den Darm nach vorne zu verlagern und eine versehentlich Injektion ausgeschlossen wird). Dann wurde das Chemotherapeutika mit einer 25 G Nadel (Braun, Melsungen) intraperitoneal appliziert. Die Chemotherapeutika wurden jeden zweiten bis siebten Tag in einem Volumen von 80 – 350 µl je nach Indikation verabreicht. Das Körpergewicht der Mäuse wurde danach jeden zweiten Tag gemessen.

2.13 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Für die immunhistochemischen Verfahren zum Nachweis von Plasmid pCMVLuc wurden den Mäusen Transfektionskomplexe (PEI22lin/PEG-PEI22 90%/10% in HBG, N/P 6) injiziert, in denen die DNS mit Cy3 markiert war. Dazu wurden 50 µg DNS unter Benutzung eines Label IT Kit (MIRUS, Madison, WI) markiert und intravenös injiziert. Die histologischen Präparate wurden für die Epifluoreszenz-Mikroskopie vorbereitet (siehe 2.14) und Cy3-Fluoreszenz wurde unter Benutzung eines 546 ± 12 nm Filters angeregt und die Emission unter Benutzung eines 575 - 640 nm Filter gemessen. Die DNS Verteilung im Gewebe wurde mit Hilfe eines Axiovert 200 Fluoreszenz Mikroskops (Zeiss, Jena), ausgerüstet mit einer Zeiss AxioCam Kamera, sichtbar gemacht. Das Licht wurde durch ein 63 x 1,4 NA Öl Immersions-Objektiv (Zeiss, Jena) oder ein 40 fach oder 10 fach vergrößerndes Objektiv ohne Öl detektiert. Die digitale Bildverarbeitung und Bildanalyse wurde mit der Axiovision 3.1 Software (Zeiss) durchgeführt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit 4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) der Firma Boehringer (Mannheim, 1 µg/ml in Methanol), um die Zellkerne und damit die Gewebestrukturen sichtbar zu machen. Diese wurden von Melinda Kiss durchgeführt.

2.14 Histologie

Für alle Präparate wurden die Tiere 4 – 24 Stunden nach der Injektion euthanasiert, die Organe entnommen, in Einbettmedium (OCT Tissue Tek) eingelegt und bis zum Erstarren des Einbettmediums auf Trockeneis gelagert. Die Organproben wurden bei -80°C gelagert. Für die Immunhistologie wurden die Organe mit einem Kryomikrotom (Leica CM 3050s, Bensheim) bei -20°C in 6 – 7 µm dünne Präparate geschnitten, diese auf einen Objektträger verbracht, in eisgekühltem Aceton fixiert und gefärbt. Für den immunhistologischen Nachweis von Endothelzellen, wurde das Gewebe mit Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper (CD31 ist ein Antigen auf Endothelzellen) behandelt (Pharmingen, BD BioSciences, San Diego, USA). Der Antikörper CD31 reagiert spezifisch mit dem Antigen zum Antigen-Antikörper-Komplex. Mit einem zweiten Antikörper, Ziege-anti-Ratte, an den der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gekoppelt ist, kann man den 1. Antikörper markieren und somit unter dem Epifluoreszenz Mikroskop sichtbar machen. Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 520 nm detektiert. Um die Zellkerne im Gewebe erkennen zu können, wurden die Präparate mit DAPI (Boehringer, Mannheim, 1 µg/ml in Methanol) einer Zellkernfärbung unterworfen.

Für den histologischen Nachweis von GFP wurden 20 µm dicke Gewebeschnitte unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop visualisiert. Dazu wurden die Präparate bei 488 nm angeregt und die Emission bei 520 nm detektiert.

2.15 Erythrozyten-Aggregation

Erythrozyten wurden von frisch gewonnenem heparinisierten Mausblut einer C57BL/6-Maus isoliert. Sie wurden in HBG-Puffer in drei Zyklen durch Zentrifugieren bei 400 g für 10 Minuten bei 4° C gewaschen. Die Erythrozyten-Suspension (50 µl) wurde in einer 24-Well-Platte gegeben und mit PEI22lin-Polyplexen (mit 5 µg DNS) oder mit PEI22lin alleine versetzt. In den Kontrollen wurden die Erythrozyten mit HBG alleine gemischt. Nach 15 min Inkubation bei 37° C wurden die Aggregationsphasen der Erythrozyten mittels Kontrastaufnahmen mit einem Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) ausgerüstet mit einer Sony DSC-S75 Kamera

(Sony Electronics, USA) analysiert. Dieser Versuch wurde von Sabine Boeckle durchgeführt.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche basierte auf zwei verschiedene Methoden. In den Experimenten, in denen nur ein gemessener Wert pro Tier vorliegt (z. B. Luziferase-Expression im Tumor) wurde die statistische Auswertung mit dem Programm WinStat berechnet. Dazu wurden die zum jeweiligen Versuchsaufbau passenden Methoden wie t-Test oder mittels ANOVA der LSD-Test und der Duncan's-Test angewendet. Für die Experimente in denen der Tumorwachstumsverlauf über mehrere Tage beobachtet wurde, erfolgte für die statistische Berechnung mit dem „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Dies ist ein Softwarepaket zur statistischen Datenverwaltung und -analyse der Firma SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA). Analysiert wurden die Wachstumsparameter in einem gemischten linearen Modell unter der Berücksichtigung der Verlaufstrukturen der Daten mit einem zufälligen Effekt mit dem Trend für einzelne Tiere (67). Es wurden die Tumorwachstumsdaten pro Tag der Gruppen mit Standardfehler berechnet und mit den Daten der anderen Gruppen verglichen. Es wurden nur die Versuche ausgewertet, die eine Tierzahl von mindestens $n = 5$ Tieren pro Gruppe enthielten.

3 Ergebnisse

3.1 Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer

3.1.1 PEI22lin-Polyplexe in verschiedenen Mausstämmen

Jeweils vier Tiere aus den Mausstämmen, BALB/c, SCID and C57BL/6 wurden PEI22lin Polyplexen in HBG N/P 6 intravenös injiziert. Jede Maus erhielt dabei 50 µg Luziferase-Plasmid-DNS (Abbildung 3). Das Zeta-Potential der Transfektionskomplexe betrug + 25±5 mV und die Größe der Komplexe ca. 3000 nm. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion war im Vergleich zu den anderen Organen die Genexpression in der Lunge am stärksten ausgeprägt, wobei die höchsten Werte bei den SCID-Mäusen zu finden waren. Die Expression in den Organen dieses Mausstamms erfolgte in absteigender Reihenfolge von Lunge, Herz, Niere, Leber zur Milz. Bei dem Mausstamm BALB/c war die absteigende Reihenfolge etwas anders: von Lunge, Herz, Milz, Leber zur Niere. Wie schon vorher bei den SCID-Mäusen zeigten die Tiere nach der intravenösen Injektion ein gestörtes Allgemeinbefinden wie gesträubtes Fell und ein auffällig ruhiges Verhalten. Nochmals anders war die absteigende Reihenfolge in der Expression bei dem Mausstamm C57BL/6 von Lunge, Milz, Leber, Herz zur Niere. Dieser Mausstamm tolerierte die Komplexe recht gut und zeigte kein bis kaum gestörtes Allgemeinbefinden. Des weiteren wurde hier der Einfluss von unterschiedlichem DNS-Gehalt auf die Expressionsraten getestet, wobei eine Gruppe 25 µg und die andere 50 µg Plasmid erhielt. Dabei waren nur geringe Unterschiede festzustellen, nur in Leber und Milz war eine höhere Expression mit 50 µg Plasmid gegenüber der niedrigeren Dosis zu finden. Diese Untersuchungen dienten als Kontrolle für nachfolgende Experimente, um unterschiedliche Expressionsmuster von PEI22lin-Komplexen in verschiedenen Mausstämmen zu eruieren.

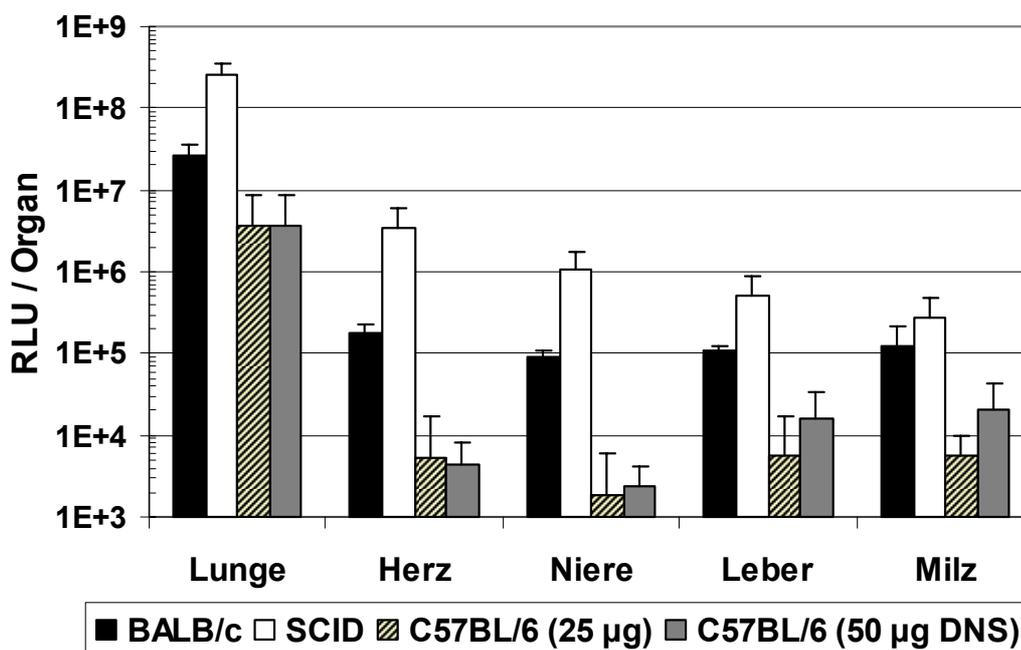


Abbildung 3: Reportergenexpression nach systemischer Applikation von PEI22lin Transfektionskomplexen in HBG, N/P 6 in BALB/c-, SCID- oder C57BL/6-Mäusen. Transfektionskomplexe mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml pCMVLuc-DNS (50 µg DNS per Maus in 250 µl) wurden in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Im C57BL/6-Mausmodell erfolgte die Applikation zusätzlich mit 25 µg DNS und 50 µg DNS. Die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Applikation als totale Luziferase-Expression pro Organ gemessen. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe dargestellt.

3.1.2 Gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe

Frühere Zellkulturexperimente legten nahe, dass freies, nicht an Polyplexe gebundenes PEI toxisch wirkt (31). Um den Einfluss von ungebundenem PEI22lin zu testen, wurden 3 verschiedene DNS/PEI22lin-Komplexe (hergestellt in HBG mit N/P 6) an BALB/c-Mäusen mit $n = 4$ Tieren pro Gruppe verglichen. Gelfiltrierte Transfektionskomplexe wurden mit nicht filtrierten Komplexen und gelfiltrierten Transfektionskomplexen, denen nach der Aufreinigung freies PEI22lin hinzugefügt wurde, verglichen. Dazu wurden den BALB/c-Mäusen die Komplexe mit 50 µg pCMVLuc-DNS in 250 µl HBG intravenös injiziert. Es konnte ein großer Unterschied in der akuten Toxizität nach der Injektion von PEI-haltigen im Vergleich zu PEI-freien Polyplexen festgestellt werden. Mäuse, die entweder nicht gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe oder gelfiltrierte Polyplexe mit nachträglich hinzugefügtem PEI22lin erhielten, zeigten ein gestörtes Allgemeinbefinden wie gesträubtes Fell und reduzierte Aktivität, die bis zur Beendigung des Experiments andauerten. Im

Gegensatz dazu wurde bei Mäusen die gelfiltrierte PEI22lin-Komplexe erhielten kein gestörtes Allgemeinbefinden beobachtet. Die Applikation von nicht gelfiltrierten PEI22lin-Polyplexen führte zu einer hohen Luziferase-Expression (Abbildung 4) in der Lunge (> 500 fach höher als in der Leber und > 100 fach höher im Vergleich zu den anderen Organen). Ähnliche Ergebnisse zeigten frühere Arbeiten (27;28;68). Dasselbe Expressionsprofil wurde in der Gruppe gefunden, die gelfiltrierte PEI22lin-Komplexe mit hinzugefügtem freiem PEI22lin erhielt. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe mit gelfiltrierten PEI22lin-Komplexen eine geringere Expression in allen Organen, die Expressionswerte in der Lunge waren 200 fach niedriger im Vergleich zur Gruppe die Polyplexe mit freiem PEI erhielt. Die Tiere aller drei Gruppen zeigten einen Gewichtsverlust (Abbildung 5), wobei die Tiere, die nicht gelfiltrierte Komplexe erhielten, signifikant höheren Gewichtsverlust zeigten (8,4 +/- 2,1 %) als die Tiere, die gelfiltrierte Komplexe erhielten (Gewichtsverlust von 5,8 +/- 1,1 %). Der Gewichtsverlust der Tiere, die gelfiltrierte Komplexe und zugesetztes freies PEI22lin erhielten, betrug 6,7 +/- 1 % und war zu keiner der beiden anderen Gruppen signifikant verschieden ($p < 0,05$ ANOVA, Duncan's Test). Das Zeta-Potential und die Größe der Komplexe wurden durch die Gelfiltration nicht beeinflusst (siehe Kapitel 3.1.1).

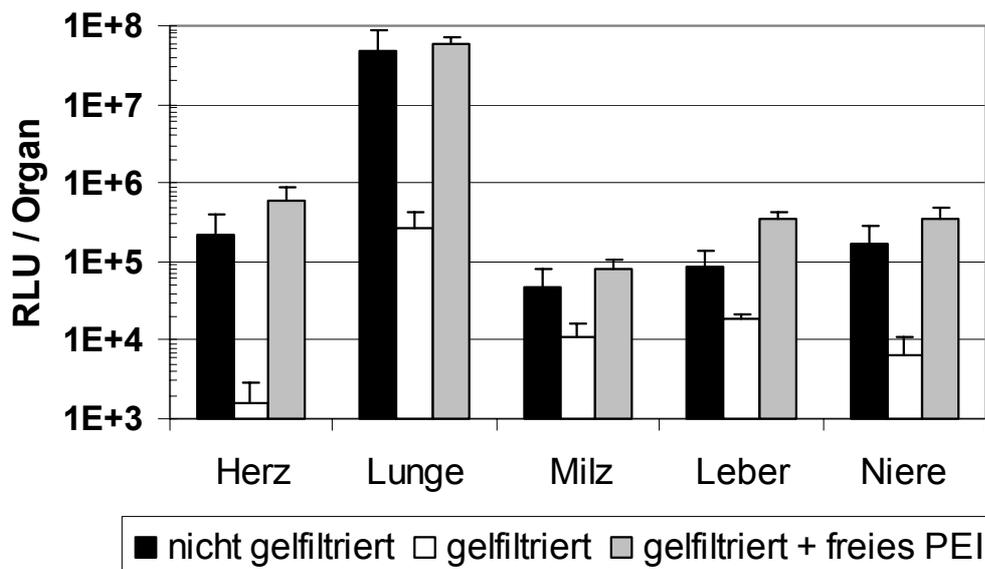


Abbildung 4: Gelfiltration von Polyplexen. Reporter-Gen-Expression nach systemischer Applikation von Transfektionskomplexen mit PEI22lin in HBG, N/P 6 in BALB/c-Mäusen. Transfektionskomplexe mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml pCMVLuc-DNS (50 µg DNS per Maus in 250 µl) wurden in die Schwanzvene von BALB/c Mäusen injiziert und die Luziferase-Expression 24 h nach der Applikation als totale Luziferase-Expression pro Organ gemessen. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe dargestellt. Bezeichnung von links nach rechts: nicht gefilterte Polyplexe, gefilterte Polyplexe, gefilterte PEI22lin-Polyplexe + zugesetztes freies PEI22lin.

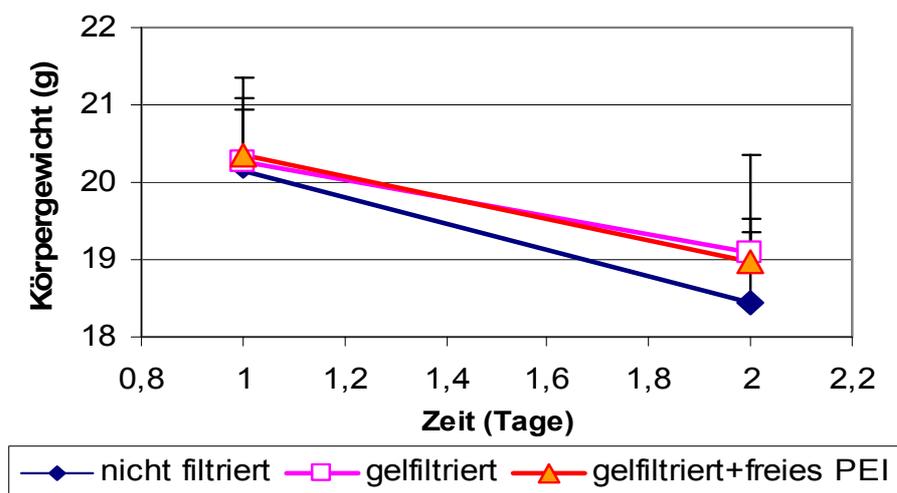


Abbildung 5: Gewichtsverlust nach systemischer Applikation von Transfektionskomplexen in BALB/c-Mäuse. Bezeichnung von links nach rechts: nicht gefilterte PEI22lin-Polyplexe, gefilterte PEI22lin-Polyplexe, gefilterte Polyplexe + zugesetztes freies PEI22lin. Der Gewichtsverlauf stellt den Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe am Tag 1 vor der Applikation und am Tag 2, 24 h nach der Applikation dar.

Dasselbe Experiment wurde mit dem Mausstamm C57BL/6 mit einer Tierzahl von $n = 5$ Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die DNS-Menge betrug hier $25 \mu\text{g}$, die Endkonzentration $200 \mu\text{g/ml}$. Die Tiere erhielten $125 \mu\text{l}$ Transfektionskomplex intravenös injiziert. Das Ergebnis (Abbildung 6) war ähnlich wie bei dem Mausstamm BALB/c. Gelfiltrierte, nicht filtrierte und gelfiltrierte Transfektionskomplexe mit nachträglich zugefügtem freiem PEI22lin zeigten die selben relativen Verhältnisse wie in dem Experiment mit dem Mausstamm BALB/c. Allerdings reagierten die Mäuse dieses Mausstammes weniger empfindlich auf die intravenös verabreichten Transfektionskomplexe. Es wurde kein oder nur geringfügig gestörtes Allgemeinbefinden beobachtet, was einerseits an der geringen applizierten Menge, andererseits an dem sehr robusten Mausstamm liegen kann. Die Tiere aller drei Gruppen erlitten einen Gewichtsverlust (Abbildung 7), wobei der Gewichtsverlust der Tiere, die nicht gelfiltrierte Komplexe erhielten, bei $7,2 \pm 2,1\%$ lag und bei Tieren, die gelfiltrierte Komplexe + freies PEI22lin erhielten, mit $8,15 \pm 2,29\%$ signifikant höher war als bei den Tieren, die gelfiltrierte Komplexe erhielten (Gewichtsverlust von $4,7 \pm 1,89\%$) ($p < 0,05$, ANOVA, Duncan's Test).

Die unterschiedliche Toxizität der Komplexe konnte durch einen Erythrozyten-Aggregationstest nachgewiesen werden (Abbildung 8). Dabei wurde bei den Komplexen, die freies PEI enthielten, eine deutliche Aggregation der Erythrozyten beobachtet, während in der Kontrollgruppe (nur HBG-Puffer) und der Gruppe, die nur gelfiltrierte Komplexe erhielt, keine Aggregation detektiert wurde. In diesen Gruppen war kein freies PEI22lin vorhanden.

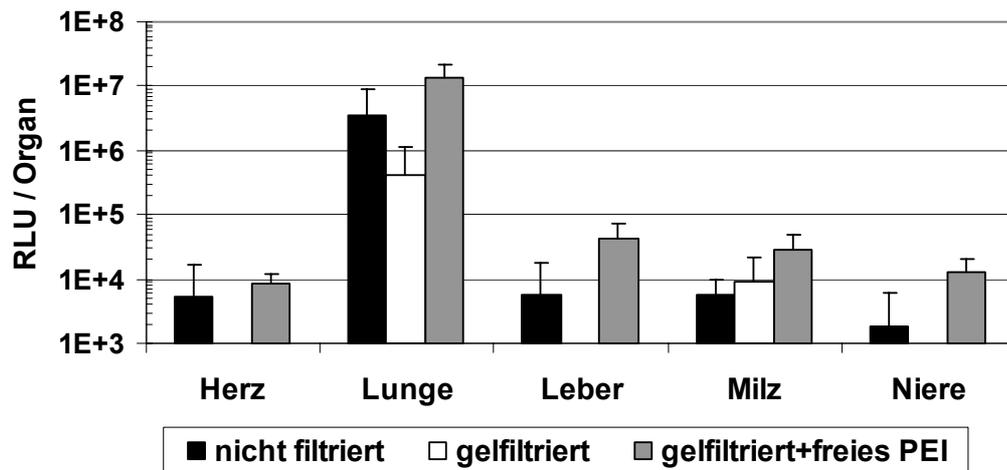


Abbildung 6: Gelfiltration von Polyplexen. Reporter-gen-Expression nach systemischer Applikation von PEI22lin in HBG, N/P 6 Polyplexen in C57BL/6-Mäuse. Transfektionskomplexe mit einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ pCMVLuc-DNS (25 μg pro Maus) wurden in die Schwanzvene von C57BL/6 Mäusen injiziert und die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Applikation als totale Luziferase Expression pro Organ gemessen. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 5 Tieren pro Gruppe dargestellt. Bezeichnung von links nach rechts: nicht gefilterte PEI22lin-Polyplexe, gefilterte PEI22lin-Polyplexe, gefilterte Polyplexe + freies PEI22lin.

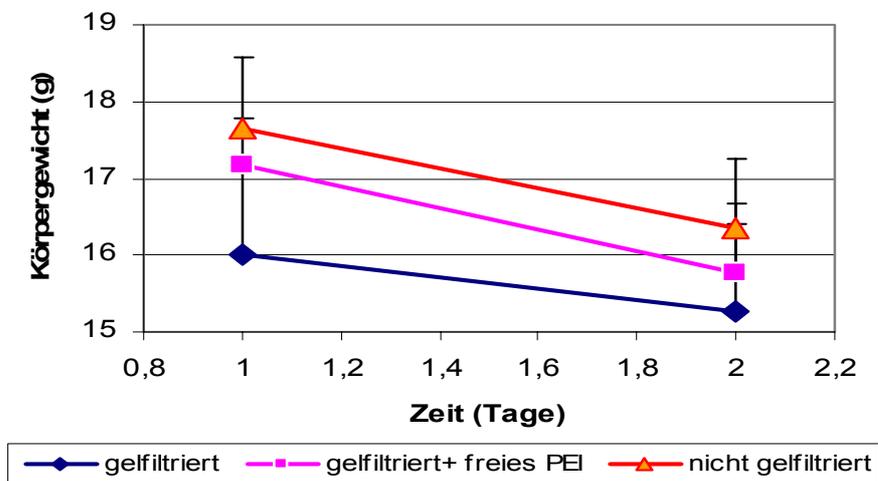


Abbildung 7: Gewichtsverlust nach systemischer Applikation von PEI22lin-Transfektionskomplexen in C57BL/6-Mäuse. Bezeichnung von links nach rechts: Gelfilterte PEI22lin-Polyplexe, gefilterte Polyplexe + freies PEI22lin, nicht gefilterte PEI22lin-Polyplexe. Der Gewichtsverlauf ist als Mittelwert + SD von 5 Tieren pro Gruppe am Tag 1 vor der Applikation und am Tag 2, 24 h nach der Applikation dargestellt.

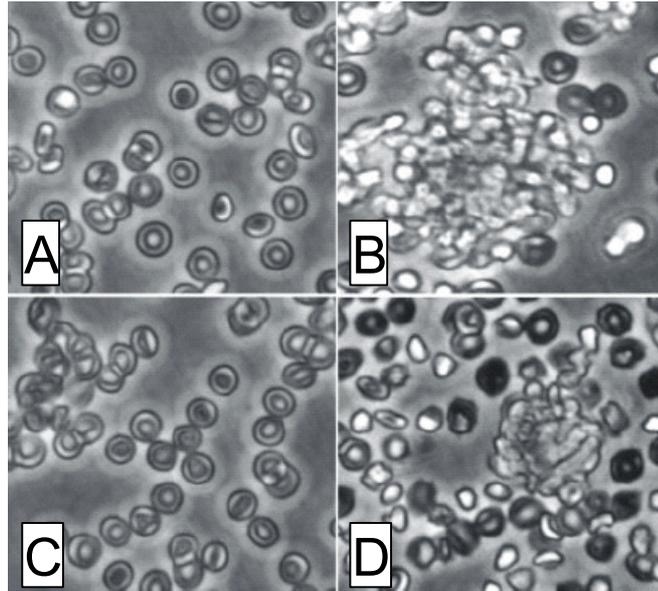


Abbildung 8: Erythrozyten-Aggregation verursacht durch PEI22lin-Polyplexe oder freies PEI22lin. Gewaschene Maus-Erythrozyten einer C57BL/6-Maus wurden in HBG inkubiert. (A): Kontrolle, es wurde nur Puffer hinzugefügt. (B): Nicht gefilterte PEI22lin Polyplexe, (C): gefilterte PEI22lin-Polyplexe, (D): PEI22lin alleine, die Menge an PEI ist dieselbe wie die bei den nicht gefilterten Polyplexen (B).

Ein ähnliches Experiment wurde mit dem Mausstamm SCID und einer Tierzahl von $n = 3$ Tiere pro Gruppe durchgeführt (Abbildung 9). Um den Einfluss der Gelfiltration von Transfektionskomplexen auf die Transgenexpression im Tumor zu untersuchen, wurden zum ersten Mal tumortragende Mäuse (HepG2-Tumor) eingesetzt. Sie erhielten gefilterte und nicht gefilterte PEI22lin-Polyplexe mit einer DNS-Menge von $50 \mu\text{g}$ pCMVLuc-DNS und einer Endkonzentration von $200 \mu\text{g/ml}$. Pro Maus wurde $250 \mu\text{l}$ Transfektionskomplex intravenös verabreicht.

Die gefilterten Komplexe bewirkten im Vergleich zu den nicht gefilterten Komplexen in allen Organen eine geringere Expression. In der Lunge war die Expression 100 fach reduziert, im Tumor dagegen war die Expression durch die gefilterten Komplexe sogar geringfügig höher als bei den nicht gefilterten Komplexen. Die Tiere beider Gruppen zeigten einen Gewichtsverlust (Abbildung 10), wobei Gewichtsverlust bei den Tieren, die nicht gefilterte Komplexe erhielten, mit $10 \pm 3,7 \%$ höher war als bei den Tieren, die gefilterte Komplexe erhielten (Gewichtsverlust von $5,2 \pm 4,4 \%$). Allerdings war der Gewichtsverlust zwischen den beiden Gruppen aufgrund der großen Streuung nicht signifikant. Die erhaltenen

Resultate zeigen, dass freies PEI in DNS/PEI-Polyplexformulierungen für einen effizienten intravenösen Gentransfer in die Lunge notwendig ist, aber auch eine erhebliche Toxizität verursacht. Um über systemische Applikation einen effizienten Gentransfer in andere Organe oder Tumore erzielen zu können, müssen daher andere Wege eingeschlagen werden.

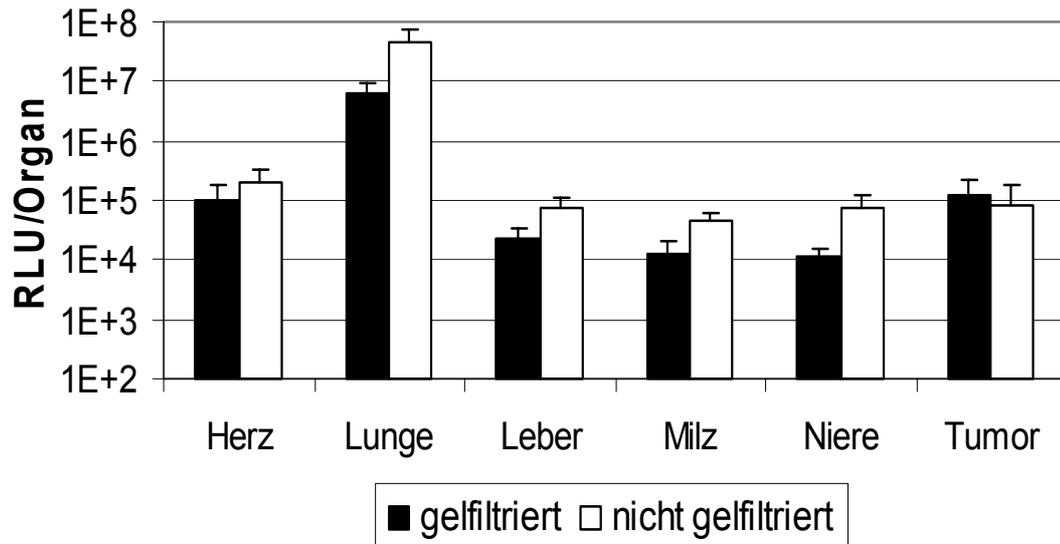


Abbildung 9: Gelfiltration von Polyplexen. Reporter-gen-Expression nach systemischer Applikation von PEI22lin in HBG, N/P 6 Polyplexen in SCID-Mäusen mit einem HepG2-Tumor. Gelfiltrierte Polyplexe und nicht gelfiltrierte PEI22lin-Transfektionskomplexe mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml pCMVLuc-DNS (50 µg pro Maus) wurden in die Schwanzvene von SCID-Mäusen mit HepG2-Tumoren injiziert und die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Applikation gemessen als totale Luziferase-Expression pro Organ. Bezeichnung von links nach rechts: nicht gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe, gelfiltrierte Polyplexe. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 3 Tieren pro Gruppe dargestellt.

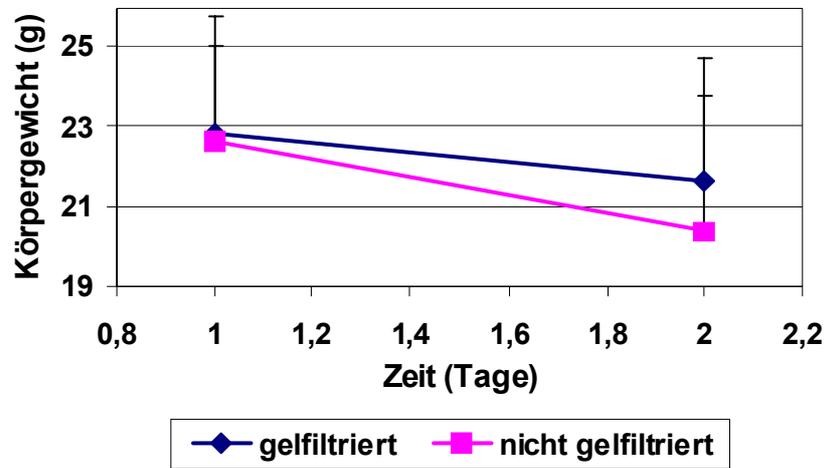


Abbildung 10: Gewichtsverlust nach systemischer Applikation von PEI22lin-Transfektionskomplexen in SCID-Mäuse mit einem HepG2-Tumor. Bezeichnung von links nach rechts: Gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe, nicht gelfiltrierte PEI22lin-Polyplexe. Der Gewichtsverlauf ist als Mittelwert + SD von 3 Tieren pro Gruppe am Tag 1 vor der Applikation und am Tag 2, 24 h nach der Applikation dargestellt.

3.1.3 Transferrin-konjugierte PEI-Polyplexe mit und ohne Melittin

Wie früher bereits gezeigt, kann der Einbau von Transferrin in PEI/DNS-Komplexe unerwünschte Nebenwirkungen wie Erythrozyten-Aggregation und hohe Expression in der Lunge stark reduzieren, da durch Transferrin die positive Außenladung der Partikel abgeschirmt wird und somit unspezifische Interaktionen reduziert werden. Tumortragende BALB/c-Mäuse mit CT26-Tumor, C57BL/6-Mäuse mit B16F10-Tumor und A/J-Mäuse mit Neuro2A-Tumoren wurden daher mit 250 μ l eines Transfektionskomplexes, bestehend aus 50 μ g pCMVLuc-DNS und Tf-PEI25br/PEI22lin (25% / 75% in HBS $\frac{1}{2}$, N/P 4,8), intravenös injiziert. Die Partikel hatten eine Größe von 2500 nm und ein Zeta-Potential von 0 +/- 5 mV.

Gegenüber der Expression mittels dem Transfektionskomplex PEI22lin wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, zeigte das Ergebnis für diesen Komplex bei dem Mausstamm BALB/c (Abbildung 11, Bild A) und C57BL/6 (Abbildung 11, Bild B) eine leichte Reduktion der Expression in allen Organen, vor allem aber in der Lunge. In den CT26-Tumoren von BALB/c-Mäusen war fast keine Expression zu finden, in den B16F10-Tumoren von C57BL/6-Mäusen war eine geringe Expression nachzuweisen. Die starke Expression im Schwanz ist auf die intravenöse Injektionsstelle zurückzuführen. Dagegen zeigte das Ergebnis bei den A/J-Mäusen eine um bis zu 13 fach höhere Expression in den Neuro2A-Tumoren im Vergleich zu allen anderen Organen, gegenüber der Lunge eine 5 fach höhere Expression (Abbildung 11, Bild C). Die Tiere zeigten kein gestörtes Allgemeinbefinden. Aus diesem Grund wurde für die weitere Optimierung der Transfektionskomplexe vorerst der A/J-Mausstamm weiter eingesetzt.

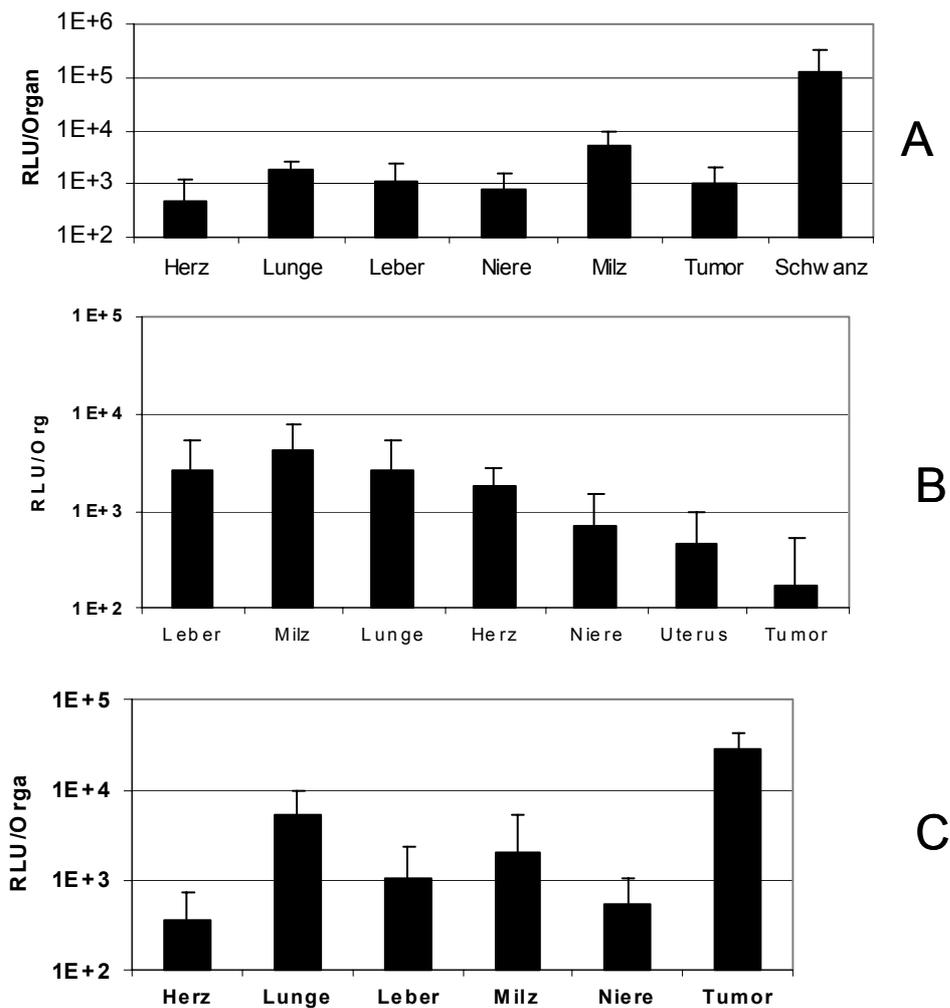


Abbildung 11: Reporter-gen-Expression nach systemischer Applikation von PEI-Transfektionskomplexen. BALB/c-Mäuse mit CT26-Tumor, C57BL/6-Mäuse mit B16F10-Tumor und A/J-Mäuse mit Neuro2A-Tumoren wurden je Maus 250 μ l des Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2 N/P 4.8 Komplexes mit 50 μ g pCMVLuc intravenös verabreicht. Bild A zeigt die Expression der Organe in BALB/c-Mäusen. Bild B zeigt die Expression der Organe in C57BL/6-Mäuse. Bild C zeigt die Expression der Organe in A/J-Mäuse. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD in den BALB/c-Mäusen von 6 Tieren, in den C57BL/6-Mäusen von 4 Tieren und in den A/J-Mäusen von 3 Tieren dargestellt.

Da mit den Transferrin-gekoppelten Komplexen bereits ein guter zielgerichteter Gentransfer in dem A/J-Mausstamm mit Neuro2A-Tumoren möglich war, wurde im nächsten Schritt zur Optimierung der endosomalen Freisetzung PEI22lin durch ein PEI25lin-Melittin-Konjugat ausgetauscht. Die Größe der Partikel betrug 964 nm und das Zeta-Potential 1,6 +/- 0 mV. Ein Komplex mit folgender Zusammensetzung wurde gewählt: Tf-PEI25br/PEI25lin-mel 25%/75% in HBG, N/P 6.

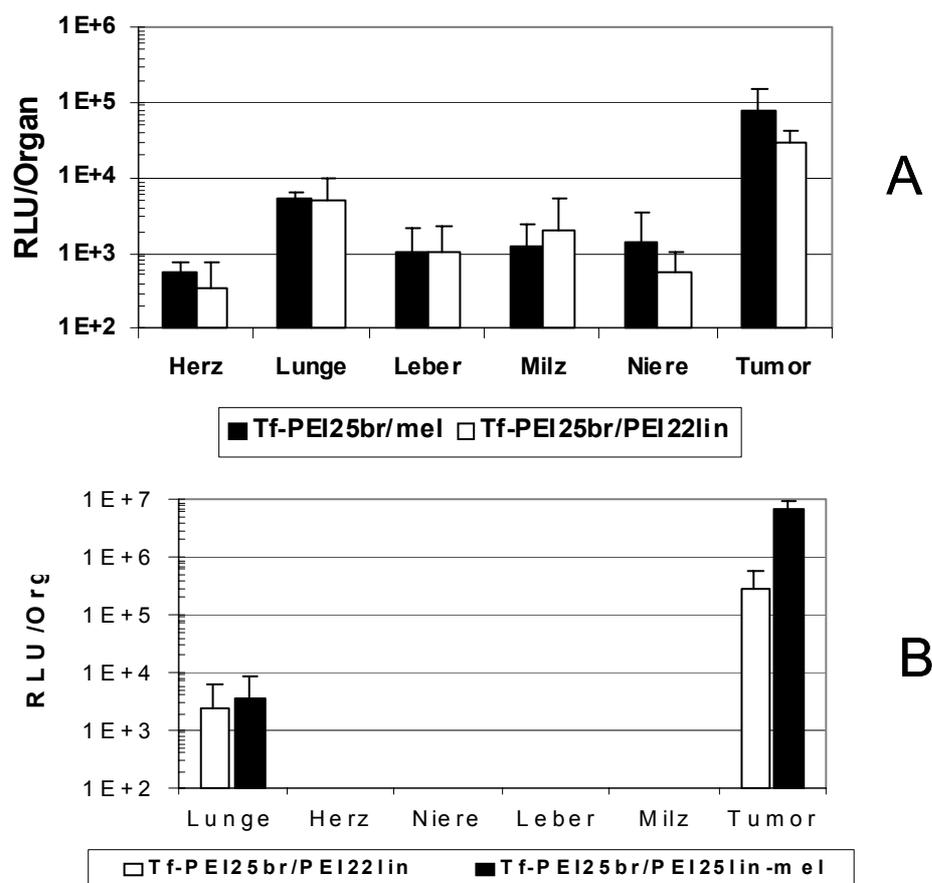


Abbildung 12: Reporter-Gen-Expression nach systemischer Applikation von Transfektionskomplexen in A/J-Mäuse mit Neuro2A-Tumoren. Bild A: Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS $\frac{1}{2}$, N/P 4,8 und Tf-PEI25br/mel-PEI25lin 25%/75% Komplexe (in HBG, N/P 6). Bild B: Tf-PEI25br/mel-PEI25lin 25%/75% in HBG, N/P 6 und PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS $\frac{1}{2}$, N/P 6. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 3 Tieren pro Gruppe dargestellt.

Die Ergebnisse im ersten Versuch (Abbildung 12, Bild A) zeigten für den Tf-PEI25br/PEI25lin-mel-Komplex höhere, aber nicht signifikant erhöhte Expressionswerte gegenüber den normalen Transferrinkomplexen (Tf-PEI25br/PEI22lin in HBS1/2, N/P 4,8). In einem zweiten Versuch wurden die Transferrinkomplexe (Tf-PEI25br/PEI22lin in HBS1/2, N/P 6) mit den Expressionen der Tf-PEI25br/PEI25lin-mel Komplexe (in HBG bei N/P 6) verglichen. Durch den höheren N/P-Wert werden die Transferrinkomplexe kleiner (Größe: 652 nm, Zeta-Potential: 0,4 +/- 1,6 mV). Die DNS-PEI Komplexe konjugiert mit dem Melittin-Konjugat waren im Tumor (Abbildung 12, Bild B) signifikant höher gegenüber den Transferrinkomplexen mit N/P 6 ($p < 0,05$, t-Test, unabhängig).

3.1.4 Histologie nach systemischem Gentransfer

Zur Kontrolle, ob die DNS überhaupt die Organe erreicht, wurden Transfektionskomplexe (PEI22lin/PEG-PEI22 90%/10% in HBG, N/P 6) mit Cy3-markierter DNS intravenös in eine BALB/c-Maus appliziert. Polyethylenglycol (PEG) wird zum Abschirmen der positiven Ladung der Komplexe eingesetzt. Die Organe wurden wie in Kapitel 3.14 beschrieben für die Histologie aufgearbeitet. Die Bilder zeigen die Leber einer BALB/c Maus (Abbildung 13). Um die Strukturen besser erkennen zu können, wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI vorgenommen, die blau erscheint. Die roten Punkte stellen die Cy3-markierte DNS dar.

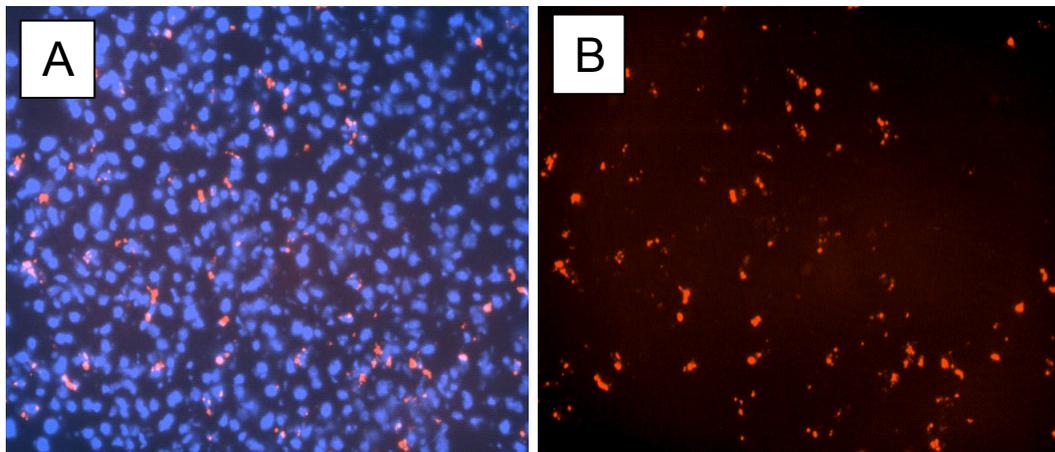


Abbildung 13: Histologisches Präparat einer BALB/c-Mäuseleber. Transfektionskomplexe (PEI22lin/PEG-PEI22 90%/10% in HBG, N/P 6) mit Cy3-markierter DNS (GFP) wurden intravenös appliziert. Bild A zeigt in den roten Punkten die markierte DNS. Die DAPI-gefärbten Zellkerne erscheinen Blau. Bild B: Dasselbe Bild wie A nur ohne Zellkernfärbung zur besseren Darstellung der markierten DNS.

Um die Wirksamkeit von Tf-PEI25br/PEI22lin-Komplexen auch histologisch nachweisen zu können, wurde einer A/J-Maus oben genannter Transfektionskomplex mit Plasmid-DNS kodierend für GFP intravenös verabreicht (Abbildung 14). 24 Stunden später wurde die Maus eingeschläfert, die Lunge und der Tumor exzidiert, eingefroren, in 20 µm dicke Präparate geschnitten und unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Da die Präparate in manchen Abschnitten sowohl in Lunge als auch im Tumor eine hohe Eigenfluoreszenz aufwiesen, war es schwierig, sie von GFP-transfizierten Zellen zu unterscheiden. Deshalb konnten im Tumor (Abb. 14, Bild A) nur einige wenige Zellen gefunden werden, die sicher GFP exprimieren. In Abb. 14, Bild B sieht man im linken Bildabschnitt deutlich die Eigenfluoreszenz von nekrotischem Tumorgewebe, während der noch intakte Tumor im rechten

Bildabschnitt bis auf eine Stelle keine Fluoreszenz zeigt. In der Lunge (Abb. 14, Bild C) ist deutlich eine grüne Fluoreszenz in der Bildmitte zu sehen, bei der es sich höchstwahrscheinlich um eine GFP-Expression handelt. Auf Abb. 14, Bild D ist ein Lungenabschnitt mit grüner Fluoreszenz zu sehen, wobei es sich hier vermutlich um einen Artefakt handelt. Anhand dieser Bilder ist zu sehen, dass es fast unmöglich ist eine echte GFP-Expression von Eigenfluoreszenzen und Artefakten zu unterscheiden. Da das GFP beim Einfrieren der Präparate aus dem Zellkern austrat, konnte kein deutliches Bild bezüglich zellulärer Lokalisation erhalten werden.

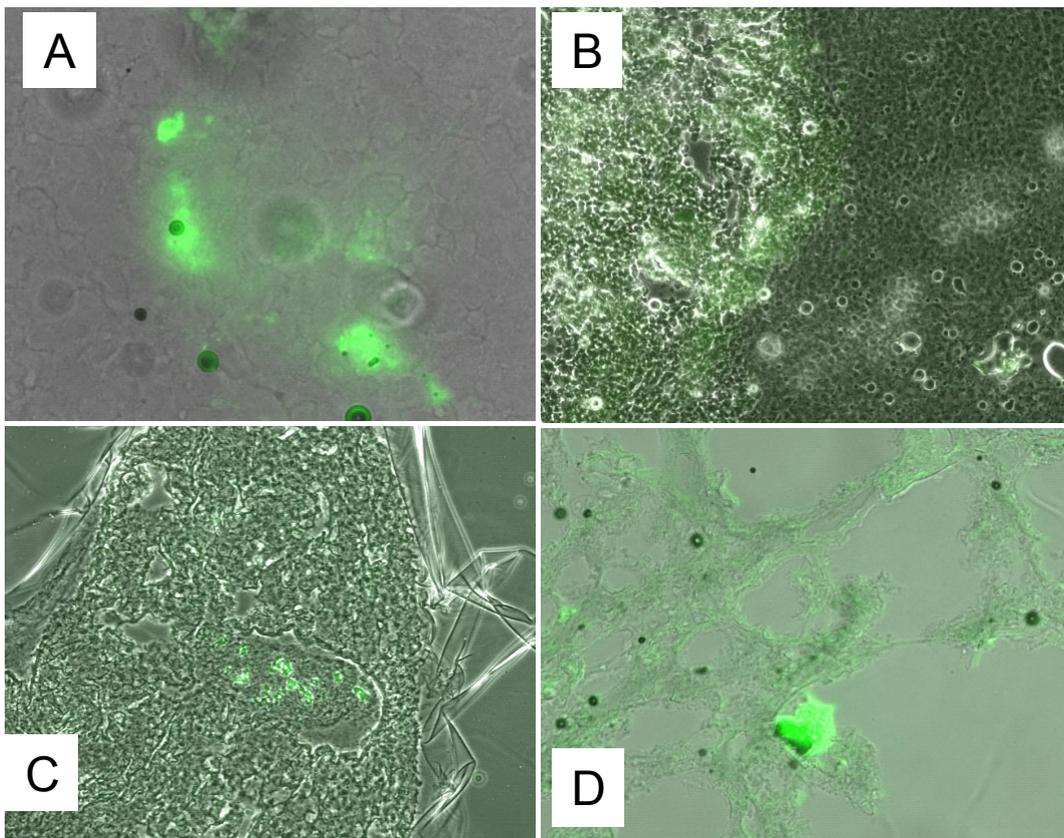


Abbildung 14: Versuch zum histologischen Nachweis von GFP-Expression in Lunge und Tumor. Einer tumortragenden A/J-Maus (Neuro2A) wurde intravenös ein Tf-PEI25br/PEI22lin-Komplex mit pCMVGFP-DNS verabreicht. Bei der Auswertung mittels Epifluoreszenzmikroskopie stellt sich GFP in einer starken grünen Fluoreszenz dar. Viele Zellen zeigen eine starke Eigenfluoreszenz, daher der grünliche Hintergrund. Die Bilder B - C sind mit 200 facher Vergrößerung, das Bild A mit 400 facher Vergrößerung aufgenommen. Bild A: Tumor, Bild B: Tumor, der im linken Bildabschnitt nekrotisch ist und daher eine starke Eigenfluoreszenz zeigt. Bild C: Lunge mit deutlicher GFP-Expression in der Bildmitte. Bild D: Grüne Fluoreszenz in einem kleinem Lungenabschnitt, der vermutlich ein Artefakt darstellt.

Die Größe und Anzahl der Tumorgefäße stellen für den systemischen Gentransfer den begrenzenden Faktor für dessen Effektivität dar. Je größer die Blutgefäße und je häufiger sie in einem Tumor vorkommen, desto wahrscheinlicher sollte effizienter

Gentransfer werden. Wichtig ist außerdem eine erhöhte Permeabilität (Fenestrierung) der Gefäßwände im Tumor, damit die relativ großen Transfektionskomplexe überhaupt erst aus dem Blutgefäß in das Gewebe gelangen können. Deswegen wurde das Gefäßsystem der Tumore histologisch untersucht. Für eine optische Bewertung wurden Antikörperfärbungen mit CD31 und Alexa 488 in Tumorpräparaten unterschiedlicher Mausstämmen (CT26-Tumor einer BALB/c-Maus, B16F10-Tumor einer C57BL/6-Maus und Neuro2A-Tumor einer A/J-Maus) durchgeführt (Abbildung 15).

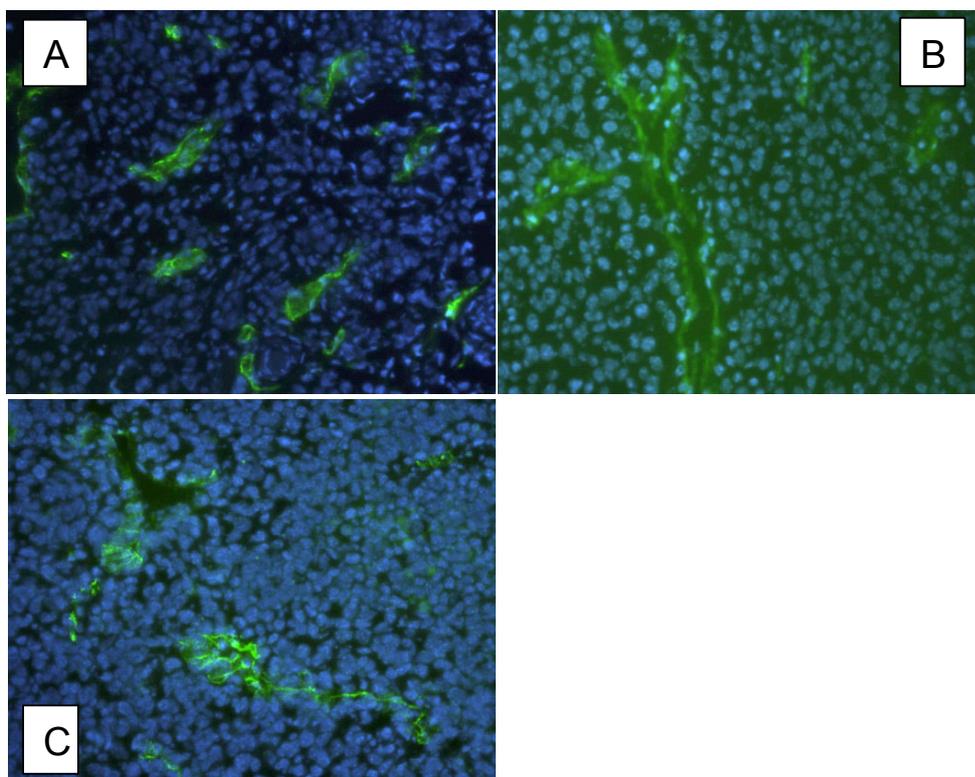


Abbildung 15: Histologische Präparate von verschiedenen Tumormodellen in der Maus. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Grün sind die mit einem Anti CD31 Antikörper markierten und einem zweiten Antikörper (Alexa 488) gefärbten Endothelzellen. Bild A zeigt den CT26-Tumor einer BALB/c Maus. Bild B zeigt den B16F10-Tumor einer C57BL/6-Maus und Bild C zeigt den Neuro2A-Tumor einer A/J-Maus. Vergrößerung: 200 fach.

Wiederum sind die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt, während die grüne Färbung das Endothel der Blutgefäße sichtbar macht, was in der Abbildung deutlich zu erkennen ist. Im CT26-Tumormodell sind nur sehr kleine Gefäße vorhanden, während im B16F10-Tumormodell und im Neuro2A-Tumormodell größere Blutgefäße sichtbar sind.

3.2 Elektroporation für den lokalen Gentransfer von DNS

3.2.1 Etablierung des CT26-Tumormodells

Als erstes Modell für die Elektroporation wurde das CT26-Tumormodell, syngon wachsend in BALB/c-Mäusen, etabliert. Das CT26-Kolon-Karzinom wurde ursprünglich mittels N-nitroso-N-methylurethan in BALB/c-Mäusen induziert (62). In dieser Arbeit wurden 3 Gruppen mit jeweils 8 BALB/c-Mäusen und drei unterschiedlich Konzentrationen von Tumorzellen in 100 µl pro Maus subkutan appliziert. Gruppe 1 erhielt 100.000 Zellen/Maus, Gruppe 2 500.000 Zellen/Maus und Gruppe 3 1.000.000 Zellen/Maus. Tag 0 markiert den Tag der subkutanen Applikation. Ab Tag 6 wurden die Mäuse jeden zweiten Tag gewogen und die Tumorgröße mit einem digitalen Meßschieber gemessen. Die untersuchten Parameter waren Körpergewicht, Tumorwachstum, Anzahl von Tumornekrosen und die Homogenität der Gruppe.

In Gruppe 1 (Abbildung 16, Bild A) erfolgte das Wachstum der Tumore sehr langsam und sehr heterogen. Das Körpergewicht blieb konstant (Abbildung 16, Bild B). Eine Maus musste vorzeitig eingeschläfert werden, da der Tumor intraperitoneal angewachsen war. Es wurden keine Tumornekrosen beobachtet und bei zwei Tieren verschwand der Tumor wieder. Am Tag 14 betrug das durchschnittliche Tumolvolumen 100 mm³. In Gruppe 2 (Abbildung 17, Bild A) erfolgte der Tumorwachstumsverlauf in 6 von 8 Tieren sehr homogen. Alle Tiere entwickelten einen Tumor, allerdings wurde bei zwei Tieren der Tumor nekrotisch. Die Gruppe wies ein homogenes Körpergewicht auf (Abbildung 17, Bild B). Am Tag 14 betrug das durchschnittliche Tumolvolumen 150 mm³. Auch in Gruppe 3 war der Tumorwachstumsverlauf homogen (Abbildung 18, Bild A). Alle Tiere entwickelten einen Tumor, doch dieser wurde bei 6 Mäusen nekrotisch. Die Ursache dieser hohen Rate von nekrotischen Tumoren liegt an der hohen Anzahl (1.000.000 Zellen/Maus) an applizierten Tumorzellen. Die Tumore wachsen daraufhin sehr schnell und können kein ausreichendes Versorgungssystem ausbilden und werden dann oft von der Mitte ausgehend nekrotisch. Das Körpergewicht blieb weniger homogen als in den anderen Gruppen (Abbildung 18, Bild B). Am Tag 14 betrug das durchschnittliche Tumolvolumen 120 mm³.

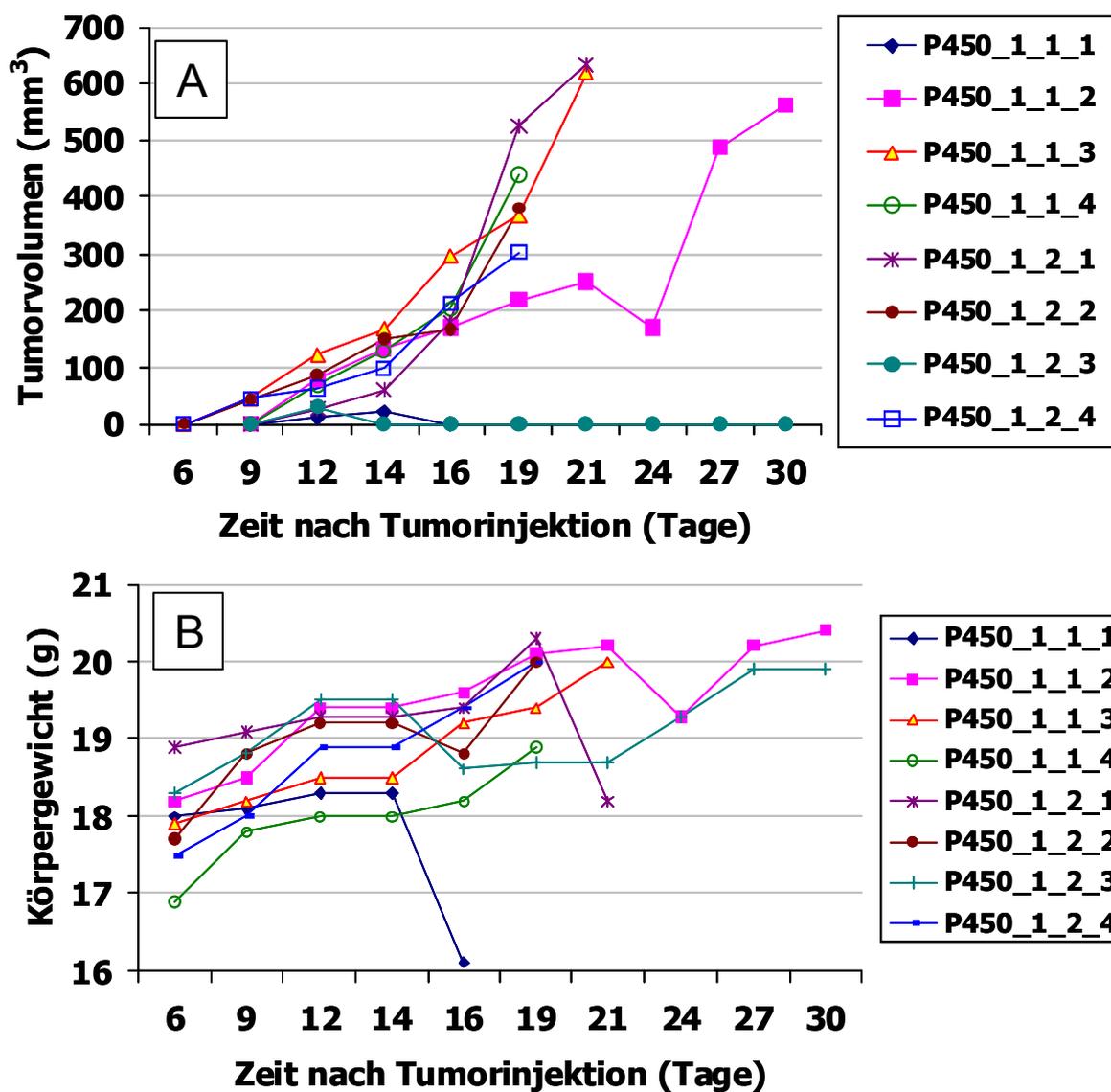


Abbildung 16: Etablierung des CT26-Tumormodells in der BALB/c-Maus: A) Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 1. 100.000 Tumorzellen/Maus in 100 μ l PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

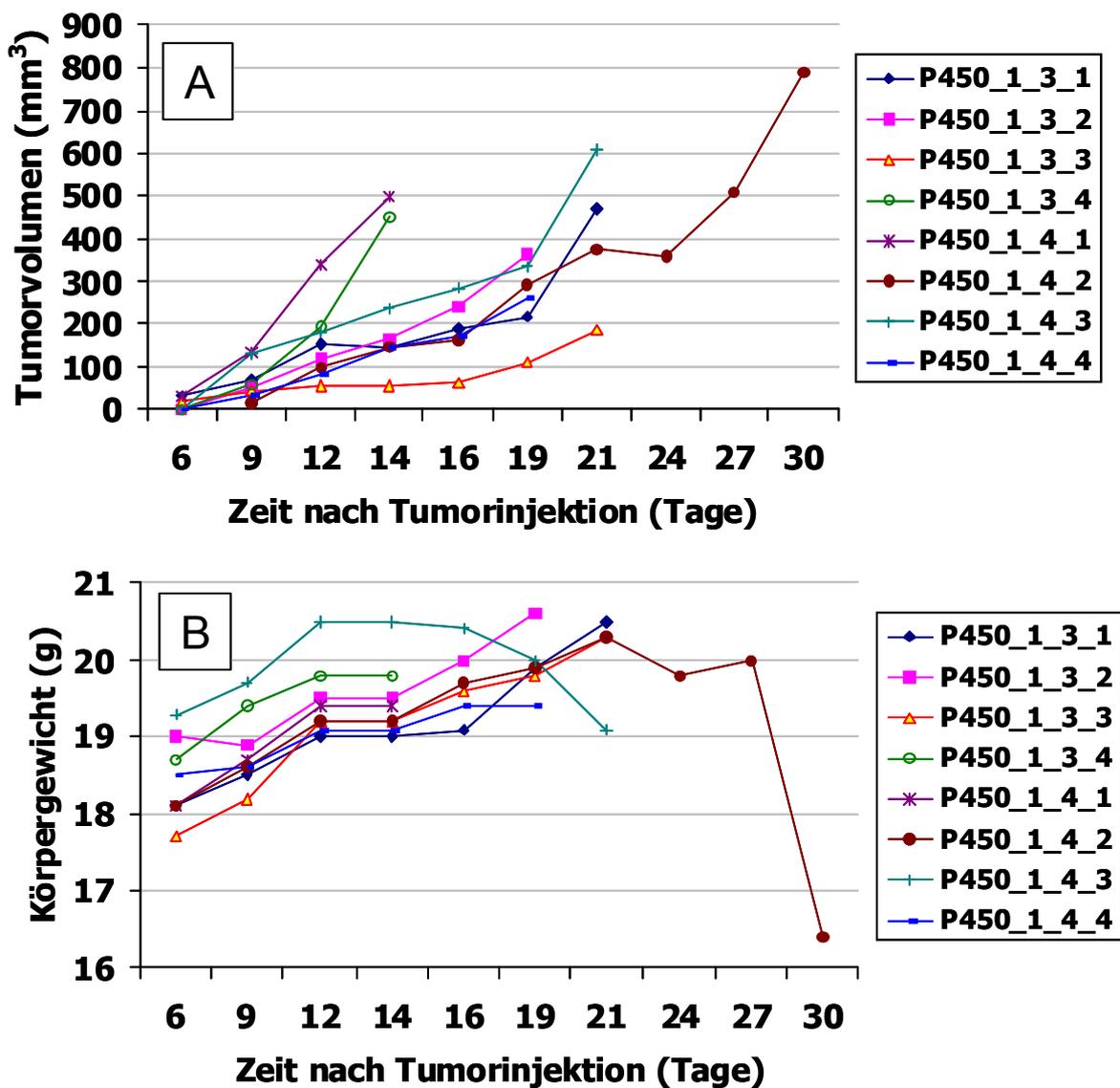


Abbildung 17: Etablierung des CT26-Tumormodells in der BALB/c-Maus: A) Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 2. 500.000 Tumorzellen/Maus in 100 µl PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

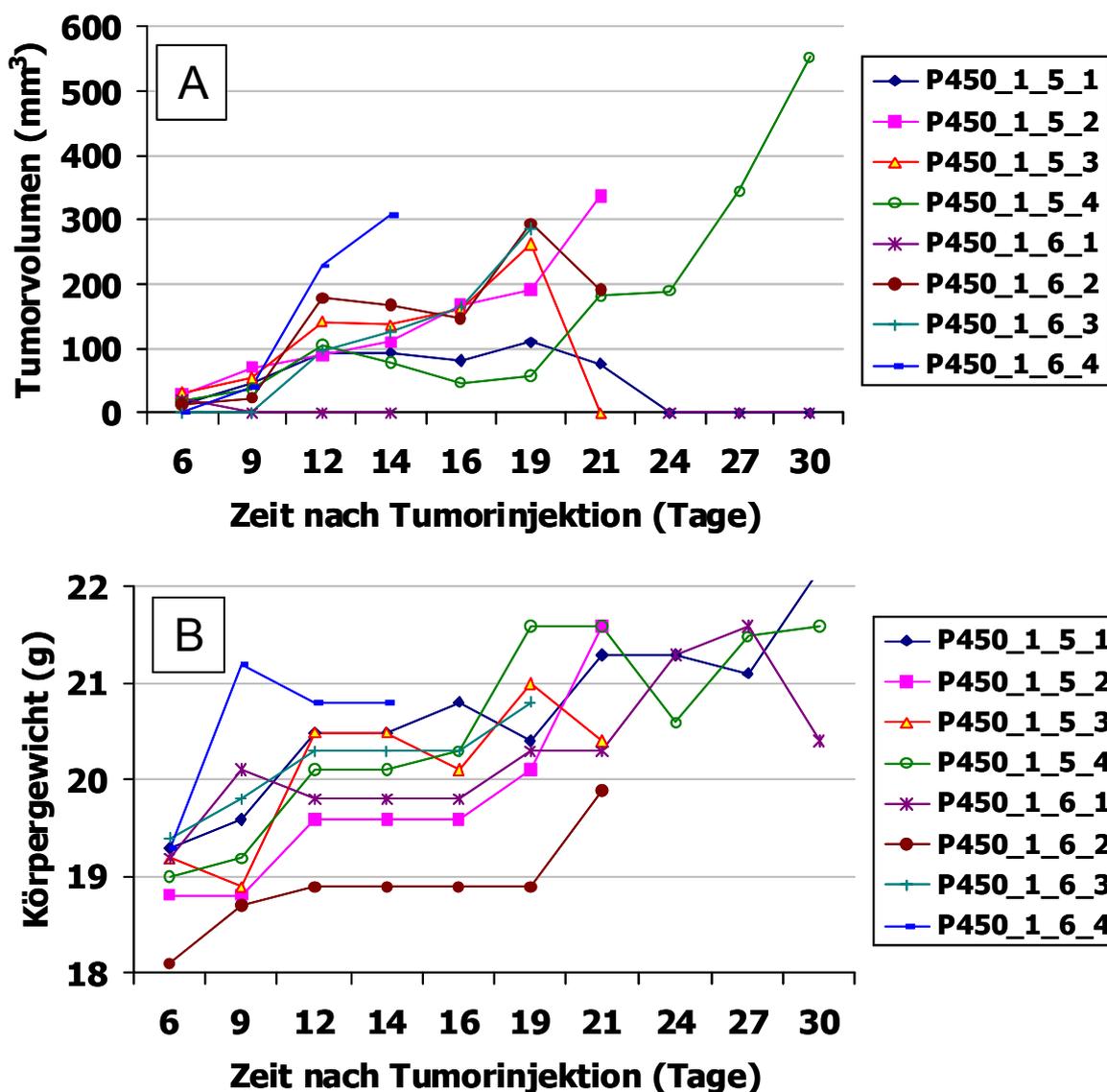


Abbildung 18: Etablierung des CT26-Tumormodells in der BALB/c-Maus: A) Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 3. 1.000.000 Tumorzellen/Maus in 100 μ l PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

Aufgrund der geringen Anzahl von Nekrosen, gleichmäßigem Tumorwachstum in der Gruppe und konstantem Körpergewicht wurde die Gruppe 2 mit einer Tumorzelldosis von 500.000 Zellen in 100 μ l PBS pro Maus als die sich am homogensten verhaltende Gruppe ausgewählt. Für zukünftige Experimente wurde weiterhin diese Zelldosis benutzt.

3.2.2 Etablierung der Elektroporation

Zur Etablierung der Elektroporation in verschiedenen Mausstämmen wurde in allen Experimenten das Reportergen pCMVLuc eingesetzt. Der Spannungsbereich wurde zwischen 80 V bis 1000 V gewählt. Die Kontrollgruppen erhielten unverpackte pCMVLuc-DNS intratumoral und/oder intramuskulär appliziert, ohne nachfolgende Elektroporation. Ein generelles Problem war die hohe Streuung der Ergebnisse bei gleich behandelten Tieren einer Gruppe. Bei vielen Versuchen zeigten sich trotzdem deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, die aber nur selten signifikant waren. Die statistische Auswertung der Versuche 1 bis 4 wurde mit ANOVA, LSD-Test, mit $p < 0,05$ durchgeführt. In Versuch 1 und 2 wurden zwei verschiedenen Elektroden benutzt, die invasive Nadel-Elektrode und die nicht invasive Kaliper-Elektrode (Abbildung 19). In den Versuchen 3 – 5 wurde nur die Kaliper-Elektrode benutzt.

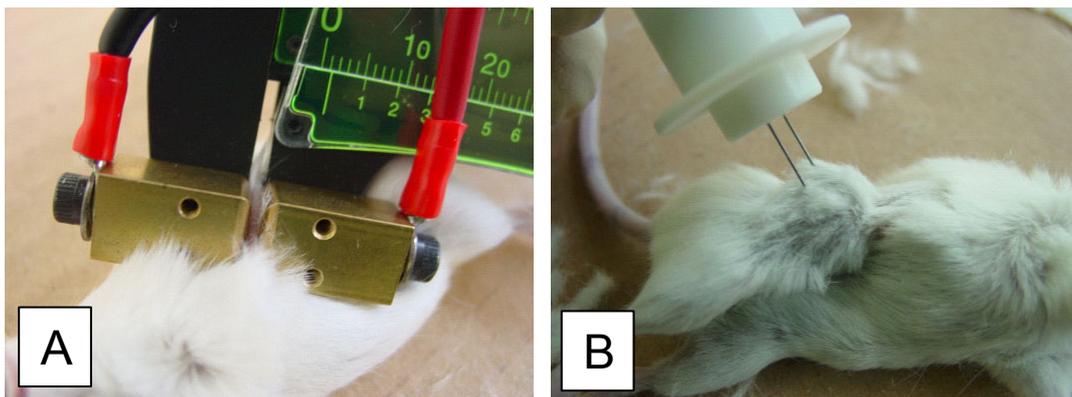


Abbildung 19: Für die Etablierung der Elektroporation wurden zwei verschiedene Elektroden benutzt. Bild A: Kaliper-Elektrode. Bild B: Nadel-Elektrode.

Zur Durchführung der ersten Experimente wurde der Mausstamm BALB/c mit syngenem CT26-Tumoren gewählt (Abbildung 20). Um die Zahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurde bei einer Maus sowohl die Elektroporation am Tumor als auch am gegenüberliegenden Oberschenkelmuskel angewendet. Die Elektroporation wurde wie in Kapitel 2.11 beschrieben durchgeführt. In Gruppe 1 wurde eine Kaliper-Elektrode benutzt und als Pulsparameter 80 V/Organ, eine Pulsdauer von 25 ms und eine Frequenz von 10 Hz gewählt. Für Tiere der Gruppen 2 – 5 wurde die Nadel-Elektrode mit den gleichen Pulsparametern benutzt, mit dem Unterschied, dass hier Spannung 160 V/cm betrug. In allen Gruppen wurden zwei Pulse eingesetzt, nur in Gruppe 2 wurden sechs Pulse angewendet. Alle Tiere

erhielten 50 µg DNS in 50 µl DNS-Lösung. Dabei wurden zwei verschiedenen DNS-Lösungen verwendet, um zu testen, welche DNS-Lösung zur höchsten Expression führt. In den Gruppen 2, 4 und 5 wurde die DNS in 20% Glucose gelöst, bei Gruppe 1, 3 und der Kontrolle in H₂O. In den Gruppen 1 – 4 und in der Kontrollgruppe wurden die Tiere 24 h nach der Elektroporation eingeschlüpfert, in Gruppe 5 nach 48 h. Anschließend wurde die Expression in Muskel und Tumor gemessen.

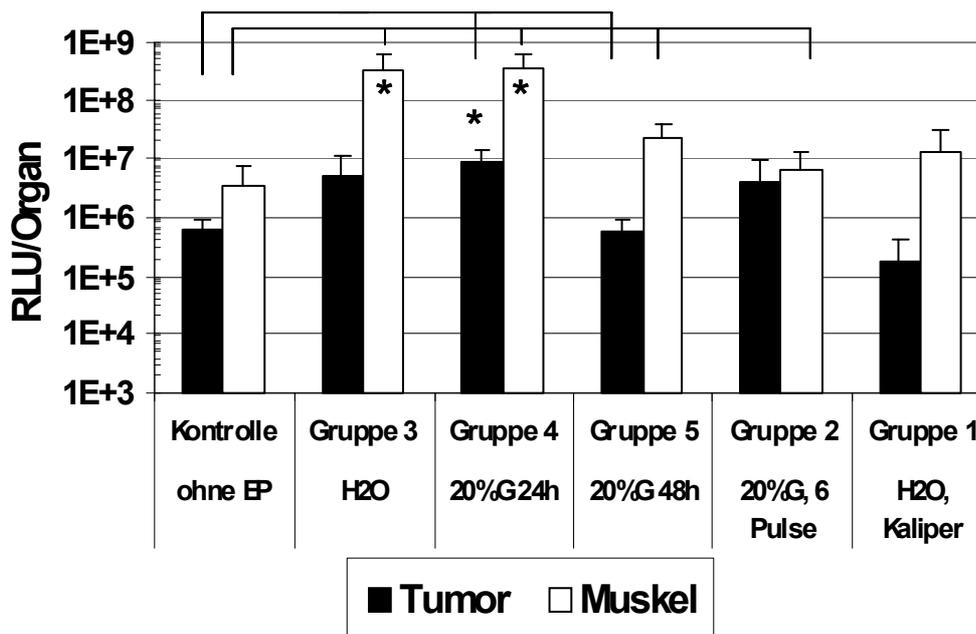


Abbildung 20: Versuch 1. Elektroporation von Tumor und Muskel in der BALB/c-Maus mit CT26-Tumor. Alle Tiere erhielten 50 µg pCMVLuc-DNS in verschiedenen Lösungen intratumoral und intramuskulär appliziert, die Elektroporation wurde mit einer Pulsdauer von 25 ms und 10Hz durchgeführt. Gruppe 1: Kaliper-Elektrode mit 80 V/Organ, 2 Pulse, 24 h, DNS in H₂O gelöst. Gruppe 2: Nadel-Elektrode, 160 V/cm, DNS in 20% Glucose gelöst und sechs Pulse, 24 h. Gruppe 3: Nadel-Elektrode, 160 V/cm, DNS in H₂O gelöst, 2 Pulse, 24 h. Gruppe 4: Nadel-Elektrode, 160 V/cm, DNS in 20% Glucose gelöst, 2 Pulse, 24 h. Gruppe 5: Nadel-Elektrode, 160 V/cm, DNS in 20% Glucose gelöst, 2 Pulse, 48 h. Kontrollgruppe: erhielt jeweils 50 µg DNS in H₂O gelöst ohne Elektroporation. Die Luziferase-Expression wurde 24 – 48 h nach der Applikation gemessen als totale Luziferase-Expression pro Organ. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 3 - 4 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die mit * gekennzeichneten Gruppen, zeigen eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu den durch Verbindungsbalken gekennzeichneten Gruppen ($p < 0,05$, ANOVA, LSD-Test).

Dies diente dazu, den optimalen Zeitpunkt der maximalen Luziferase-Expression zu herauszufinden. Die Anzahl der Tiere war $n = 4$ bei den Gruppen 3, 4 und der Kontrollgruppe und bei Gruppe 2 und 5 $n = 3$. Gruppe 1 stellte einen Vorversuch zur Anwendung der Kaliper-Elektrode dar, deshalb betrug die Tieranzahl hier $n = 2$.

Auswirkung der Anzahl an Pulsen: Der Unterschied zwischen sechs und zwei gesendeten Pulsen führte bei zwei Pulsen zu einer signifikanten Steigerung der Expression (50 fach) im Muskel, aber nur zu einer 2 fachen nicht signifikanten Steigerung im Tumor. Daher wurden in den folgenden Versuchen immer 2 Pulse gesendet.

Effekt der DNS-Lösung: Weder im Muskel noch im Tumor zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den verwendeten DNS-Lösungen. Da die Handhabung der 20% igen Glucose aufgrund ihrer zähflüssigen Konsistenz weitaus komplizierter war, wurde in den weiteren Experimenten die DNS immer in H₂O gelöst.

Einfluss des Zeitpunktes: Sowohl im Tumor als auch im Muskel sank die Expression nach 48 h verglichen mit der nach 24 h erheblich ab, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe 1 (Kaliper-Elektrode) war kein Unterschied feststellbar. Höchstwahrscheinlich war die angesetzte Spannung mit 80 V/Organ für eine effiziente Expression zu gering. Ein großes Problem bei diesem Versuch verursachte die sehr harte Konsistenz der CT26-Tumore. Hier war es deutlich schwieriger die gesamten 50 µl zu injizieren. Im Muskel stellte dies kein Problem dar.

Im nächsten Versuch wurde die Verwendung der Kaliper-Elektrode für Tumor und Muskel näher ausgetestet (Abbildung 21). Es wurde wie im vorhergehenden Versuch der Mausstamm BALB/c mit CT26-Tumoren eingesetzt, die Tierzahl betrug n = 4 pro Gruppe. Alle Tiere erhielten jeweils 50 µg pCMVLuc in H₂O gelöst sowohl intratumoral als auch intramuskulär injiziert. Um die Schwierigkeiten bei der Injektion in die sehr harten Tumore zu umgehen, wurde die DNS diesmal in der Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt und das Endvolumen somit auf 25 µl reduziert. Alle Versuche wurden mit einer Pulsdauer von 25 ms, einer Frequenz von 10 Hz und 2 Pulsen durchgeführt. Die Spannung variierte zwischen den Gruppen. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Die Tiere von Gruppe 1 erhielten 80 V/Organ, von Gruppe 2 160 V/Organ und von Gruppe 3 320 V/Organ. Gruppe 4 erhielt 80 V/0,5 cm mit der Nadel-Elektrode wie schon die Gruppe 3 in Versuch 1. Sie diente als Kontrolle, um eine Konstante zu Versuch 1 darzustellen.

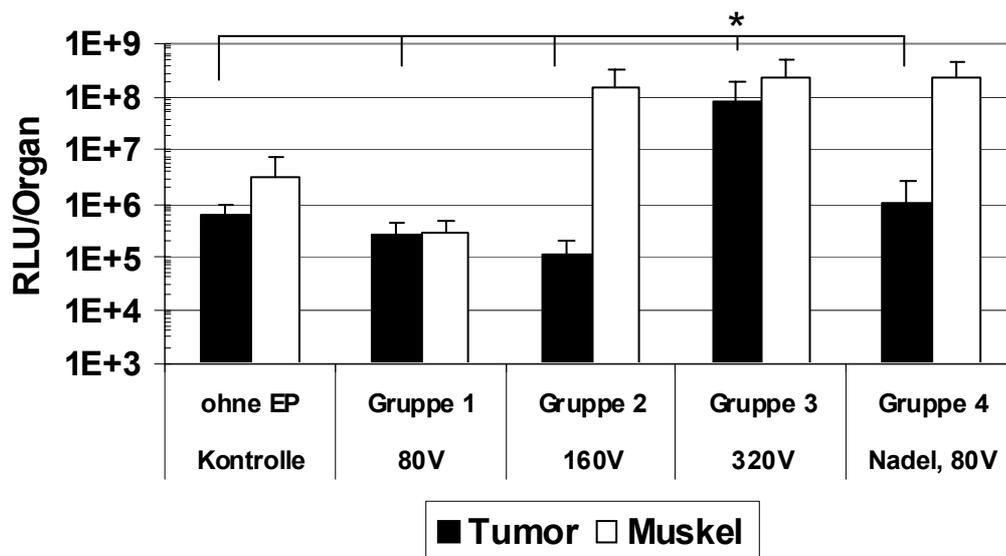


Abbildung 21: Versuch 2: Elektroporation von Tumor und Muskel in der BALB/c-Maus mit CT26-Tumor. Etablierung der Kaliper-Elektrode. Alle Tiere erhielten jeweils 50µg pCMVLuc Gen, in 25 µl H₂O gelöst, intratumoral und intramuskulär injiziert. Alle Versuche wurden mit einer Pulsdauer von 25 ms, 10 Hz und mit 2 Pulsen durchgeführt. Die Spannung wurde variiert. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Gruppe 1: erhielt 80 V/Organ. Gruppe 2: 160V/Organ. Gruppe 3: 320 V/Organ. Gruppe 4: Als Vergleich wurde nochmals die Nadelelektrode mit 80 V benutzt. Die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Applikation gemessen als totale Luziferase-Expression pro Organ. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von n = 4 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die Gruppe mit * gekennzeichnet, hat eine signifikant (p < 0,05, ANOVA, LSD-Test) höhere Expression zu den anderen, durch Verbindungsbalken gekennzeichneten Gruppen.

Ergebnis Muskel: Zwischen der Kontrolle und der Gruppe 1 mit 80 V konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Spannung von 80 V/Organ war offensichtlich zu gering. Die Expression in Gruppe 2 mit 160 V war um das 40fache höher als in der Kontrollgruppe und wurde durch Erhöhung der Spannung auf 320 V nicht weiter gesteigert. Außerdem war die Expression genauso hoch wie in Gruppe 4, die mit der Nadelelektrode mit 80 V/0,5 cm behandelt worden war. Das mittels Elektroporation behandelte Hinterbein zeigte bei den Mäusen der Gruppe 2 keine Lähmungserscheinungen, dagegen zeigten die Mäuse der Gruppe 3 nach Elektroporation mit der höchsten Spannung eine Lähmung des Hinterbeines, die bei 2 von 4 Mäusen auch noch nach 24 h bestand. Es traten keine Hautverbrennungen auf. Der Versuch zeigte, dass eine Spannung von 160 V im Muskel ausreicht, um eine sehr hohe Genexpression zu erzielen. Die Muskelzellen reagieren sehr sensibel auf elektrische Pulse. Da die Elektroporation bei 160 V/Organ durchgeführt wurde und der Muskel eine Dicke von 4 mm hat, beträgt die umgerechnete Spannung 400

V/cm. 320 V wie in Gruppe 3 sind für den Muskel zu hoch, da sich die Muskelzellen danach anscheinend nur sehr langsam erholen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

Ergebnis Tumor: Nur Gruppe 3 mit 320 V zeigte eine signifikant höhere Expression (140fach) als die Kontrollgruppe. Alle anderen Gruppen zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle. Bei der hohen Spannung wird eine gleich hohe Expressionsrate erreicht wie im Muskel. Anscheinend brauchen Tumorzellen eine weitaus höhere Spannung zur Aufnahme von Plasmid-DNS.

Da der CT26-Tumor sehr schlecht durchblutet ist und durch seine harte Konsistenz die Elektroporation erschwert, wurde für die Versuche 3 (Abbildung 22) und 4 (Abbildung 23) der syngene Mausstamm A/J mit gut durchbluteten Neuro2A-Tumoren verwendet. Der Tumorzellklon Neuro2A (Neuroblastom) war ursprünglich von einem spontanen Tumor im Albino-Mausstamm A isoliert worden (63). Bei diesen Experimenten wurde auf Erfahrungen aus den Versuchen 1 und 2 zurückgegriffen.

In Versuch 3 wurde die Elektroporation mit der Kaliper-Elektrode an Tumor und Muskel durchgeführt und den Tieren jeweils 50 µg pCMVLuc-DNS gelöst in 50 µl H₂O injiziert. Die Tierzahl betrug n = 4 pro Gruppe. Alle Versuche wurden mit einer Pulsfrequenz von 10 Hz und 2 Pulsen durchgeführt. Pulsdauer und Spannung wurden variiert. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Gruppe 1 erhielt 120 V/Organ in 25 ms, Gruppe 2 220 V/Organ in 25 ms und Gruppe 3 erhielt 220 V/Organ in 50 ms um den Vergleich mit Gruppe 2 zu ermöglichen. Gruppe 4 erhielt 300 V in 25 ms.

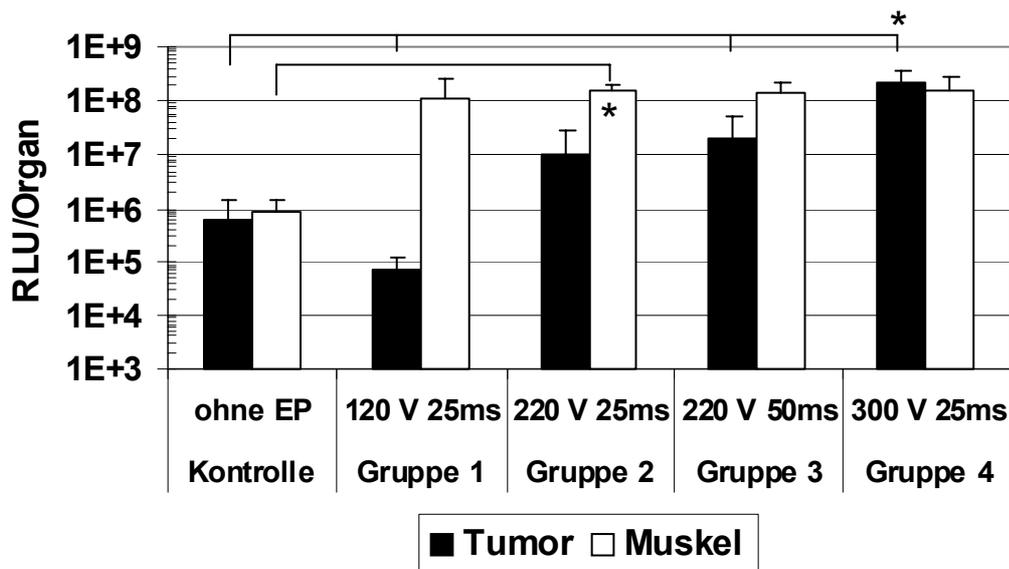


Abbildung 22: Versuch 3: Elektroporation von Tumor und Muskel in der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Etablierung der Kaliper-Elektrode. Die Tiere erhielten jeweils 50 µg pCMVLuc in 50 µl H₂O gelöst intratumoral als auch intramuskulär injiziert. Alle Versuche wurden mit einer Pulsfrequenz von 10 Hz und mit 2 Pulsen durchgeführt. Die Pulsdauer und die Spannung wurden variiert. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Gruppe 1: erhielt 120 V/Organ in 25 ms. Gruppe 2: 220 V/Organ in 25 ms. Gruppe 3: 220 V/Organ in 50 ms. Gruppe 4: 300 V in 25 ms. Die Luziferase-Expression wurde 24 h nach der Applikation gemessen und als totale Luziferase-Expression pro Organ angegeben. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die Gruppen mit * gekennzeichnet, haben eine signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, LSD-Test) höhere Expression zu den anderen, durch Verbindungsbalken gekennzeichneten Gruppen.

Ergebnis Muskel: Die Gruppen 1 – 4 zeigten alle hohe Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings war nur Gruppe 2 mit 220 V in 25 ms mit einer 17 fach stärkeren Expression signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Auch die Ergebnisse aus Versuch 1 und 2 bestätigen, dass die niedrige Spannung von 300 V/cm (120 V/Organ) zu ausreichender Expression im Muskel führt und mit einer höheren Spannung keine stärkere Expression erreicht werden kann. Gruppe 2 und 3 zeigten bei unterschiedlicher Pulsdauer gleiche Expressionwerte.

Ergebnis Tumor: Gruppe 1 mit 120 V/Organ zeigte keine höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit steigender Spannung konnte eine höhere Expression erreicht werden. Auch diesmal zeigte sich zwischen Gruppe 2 und 3 mit unterschiedlicher Pulsdauer nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied. Daher wurde in späteren Experimenten immer die Pulsdauer von 25 ms eingesetzt. Die höchste Expression wurde mit 300 V/Tumor erreicht: Sie war um das 350fache

stärker als bei der Kontrollgruppe und auch signifikant höher als in allen anderen Gruppen.

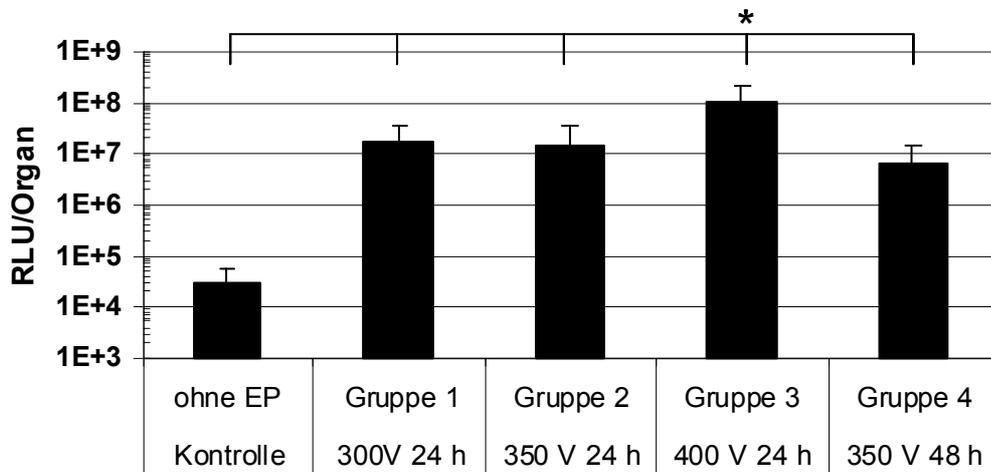


Abbildung 23: Versuch 4: Elektroporation des Tumors mit der Kaliper-Elektrode in der A/J Maus mit Neuro2A Tumor. Die Tiere erhielten jeweils 50 µg pCMVLuc in 50 µl H₂O gelöst intratumoral appliziert. Alle Versuche wurden mit einer Pulsfrequenz von in 10 Hz, einer Pulsdauer von 25 ms und mit 2 Pulsen durchgeführt. Die Spannung und die Zeit wurden variiert. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Gruppe 1: erhielt 300V/Organ in 25ms. Gruppe 2: 350V/Organ in 25 ms. Gruppe 3: 400 V/Organ in 25 ms. Gruppe 4: 350 V in 25 ms, Entnahmezeitpunkt 48 h. Die Luziferase-Expression wurde 24 - 48 h nach der Applikation gemessen als totale Luziferase-Expression pro Organ. Die Luziferaseaktivität ist als Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die Gruppe mit * gekennzeichnet, hat eine signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, LSD-Test) höhere Expression zu den anderen, durch Verbindungsbalken gekennzeichneten Gruppen.

Um herauszufinden wie hoch die Spannung im Tumor für eine optimale Expression angelegt werden kann, wurde ein weiterer Versuch 4 mit Neuro2A-Tumoren in A/J-Mäusen durchgeführt. Diesmal wurde die Elektroporation mit der Kaliper-Elektrode nur am Tumor eingesetzt. 50 µg pCMVLuc-DNS in 50 µl H₂O gelöst wurden in den Tumor injiziert (Abbildung 23). Alle Versuche wurden mit einer Pulsfrequenz von 10 Hz, einer Pulsdauer von 25 ms und mit 2 Pulsen durchgeführt. Spannung und Zeitpunkte der Expressionsmessung wurden variiert. In den Gruppen 1 - 3 fand die Entnahme der Tumore nach 24 h statt. Die Kontrollgruppe erhielt nur DNS ohne Elektroporation. Gruppe 1 erhielt 300 V/Tumor in 25 ms, Gruppe 2 erhielt 350 V/Tumor in 25ms, Gruppe 3 erhielt 400 V/Tumor in 25 ms, Gruppe 4 erhielt 350 V in 25 ms mit einem Entnahmezeitpunkt von 48 h. Die Tieranzahl betrug $n = 4$ pro Gruppe.

Ergebnis Tumor: Gruppe 1 und 2 hatten beide eine nicht signifikante, um das 500 fache höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gruppe 3 mit 400 V/Tumor hatte eine 3500 fache höhere Expression als die Kontrolle und war signifikant höher im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Gruppe 4 zeigte mit der Auswertung nach 48 Stunden eine nicht signifikant geringere Expression als die Gruppe 2 bei der Auswertung nach 24 Stunden.

Da in den nachfolgenden therapeutischen Experimenten der SCID-Mausstamm mit Huh7-Tumoren eingesetzt wurde, mussten die Parameter für die Elektroporation erneut etabliert werden. Da in den vorangegangenen Versuchen immer die Spannung pro Tumor angegeben wurde, aber nicht die Spannung pro cm, wurde in diesem Versuch die Tumorgöße gemessen und die Spannung nach der Tumorgöße angelegt. Dadurch konnte erstmals die angelegte Spannung pro cm angegeben werden.

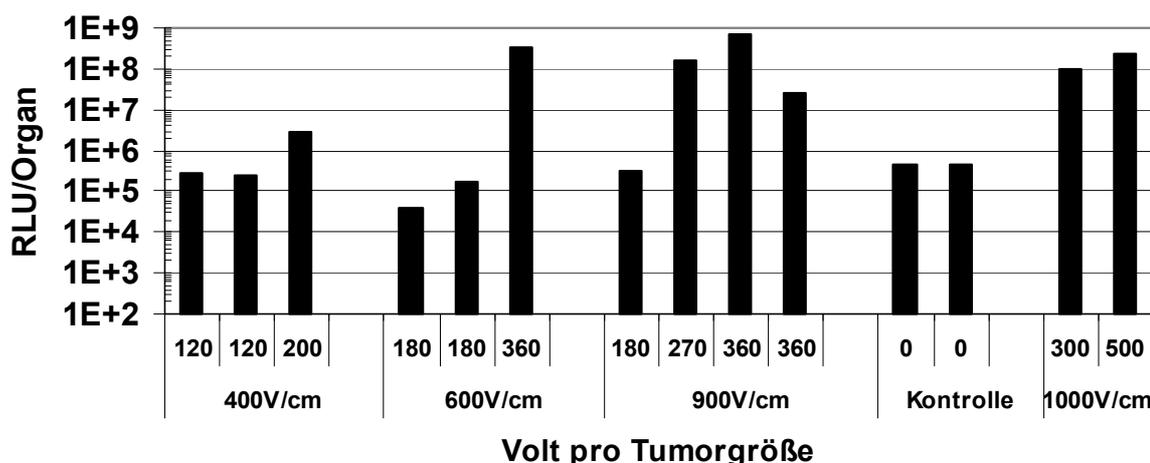


Abbildung 24: Versuch 5: Elektroporation des Tumors mit der Kaliper-Elektrode in SCID-Mäusen mit Huh7-Tumoren. 50 µg pCMVLuc DNS in 50 µl H₂O wurden intratumoral injiziert. Die Tumorgöße wurde gemessen und die Spannung nach der Größe des Tumors verabreicht. Da die Tierzahlen pro Gruppe zwischen 2 und 4 Tieren pro Gruppe variierten, wurde die Expressionswerte der einzelnen Tiere dargestellt. Die Pulszahl war 2 mit einer Pulsdauer von 25 ms und einer Frequenz von 10 Hz. Es wurden Spannungen von 120 V – 500 V pro Tumor angelegt.

SCID-Mäusen mit Huh7-Tumor wurde 50 µg pCMVLuc-DNS in 50 µl wässriger Lösung intratumoral injiziert. Die Tumorgöße wurde vermessen und die angelegte Spannung der Größe des Tumors angepasst. Die Tierzahl pro Gruppe lag zwischen n = 2 und n = 4. Gruppe 1 erhielt 400 V/cm, Gruppe 2 600 V/cm, Gruppe 3 900 V/cm

und Gruppe 4 1000 V/cm. Die Kontrollgruppe erhielt Plasmid-DNS ohne Elektroporation intratumoral injiziert. Da die Abweichungen der gefundenen Expressionen innerhalb der Gruppen sehr groß sind, wurden die Daten nach applizierter Volt/Tumor in einer Einzeltierdarstellung wiedergegeben (Abbildung 24).

Ergebnis Tumor: Es bestand ein deutlicher Unterschied zwischen Tieren, die weniger als 180 V/Tumor erhielten, und Tieren die mehr als 270 V/Tumor erhielten. Mäuse die 120 - 180 V/Tumor erhielten, wiesen keine höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Tiere die mit 270 V/Tumor, 300 V/Tumor, 360 V/Tumor und 500 V/Tumor behandelt wurden, zeigten eine sehr hohe Expression. Es stellte sich heraus, dass es keine Rolle spielte, wie viel Volt/cm gesendet wurde, ausschlaggebend alleine war die gesendete Spannung/Tumor. Daher war es für die Elektroporation nicht von Bedeutung, wie groß die Tumore waren.

3.2.3 Histologischer Nachweis von GFP-Expression nach Elektroporation

Um die Lokalisation der Genexpression im elektroporierten Tumor nachzuweisen, wurden der Neuro2A-Tumor von einer A/J-Maus und der Huh7-Tumor von einer SCID-Maus mit dem Reportergen GFP transfiziert. Dabei wurden 50 µg pCMVGFP-DNS in 50 µl H₂O in den Tumor injiziert und nachfolgend die Elektroporation durchgeführt. 24 h später wurden die Tiere eingeschläfert, der Tumor exzidiert, in Einbettmedium eingelegt und bei -80°C eingefroren und gelagert. Die Tumore wurden mit einem Kryotom in 20 µm dicke Präparate geschnitten und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Der Neuro2A-Tumor einer A/J-Maus zeigte keine GFP-Expression, beim Huh7-Tumor einer SCID-Maus wurde in einem kleinen Abschnitt des Tumors eine geringe Expression nachgewiesen. Abbildung 25, Bild A und Bild C zeigen das jeweilige Durchlichtbild eines Huh7-Tumors und die Abb. 25, Bild B und Bild D die dazugehörige GFP-Expression, wobei allerdings unklar ist, ob es sich dabei wirklich um eine GFP-Expression handelt. In Bild C handelt es sich im Durchlichtbild eindeutig um einen Ring aus Bindegewebszellen, die auch in Bild D eine deutliche grüne Fluoreszenz zeigen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Eigenfluoreszenz.

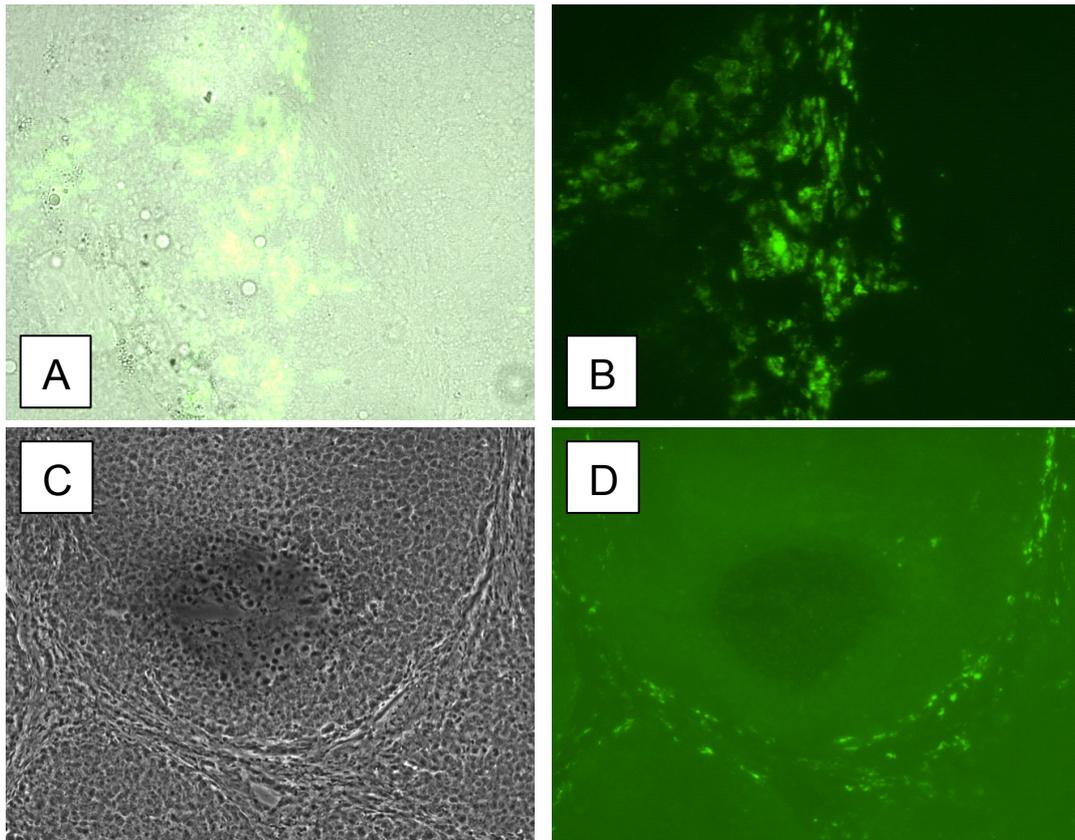


Abbildung 25: Versuch zum histologischen Nachweis von GFP-Expression. 50 µg in 50 µl Plasmid-DNS kodierend für GFP wurde intratumoral in einen Huh7-Tumor einer SCID-Maus appliziert und danach die Elektroporation durchgeführt. 24 h danach wurden die Mäuse eingeschläfert und die Tumore eingefroren. Bild A zeigt das Durchlichtbild eines Huh7-Tumors. Bild B zeigt die dazugehörige GFP-Expression und es ist eine GFP-Expression zu finden. Bild C zeigt das Durchlichtbild eines weiteren Tumorabschnitts. Deutlich ist hier ein Bindegewebsring um die Tumorzellen. Bild D zeigt die dazugehörige grüne Fluoreszenz. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Eigenfluoreszenz. Vergrößerung: 200 fach.

3.3 Tumor-Gentherapie mit dem TNF α -Gen

Die vielfältigen Aufgaben des Proteins TNF α wurden bereits in der Einleitung beschrieben. Um die systemische Toxizität des TNF α -Proteins zu umgehen, wurde in diesen Versuchen die Plasmid-DNS für das TNF α -Gen lokal am Tumor mit Hilfe der Elektroporation und systemisch mit Hilfe von Transfektionskomplexen (wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben) in diesen Versuchreihen eingesetzt. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Tumormodellen durchgeführt werden, dem B16F10-Melanom-Modell in dem Mausstamm C57BL/6 und dem Neuro2A-Neuroblastom-Modell im A/J-Mausstamm. Für beide Tumormodelle konnten in früheren Arbeiten bereits therapeutische Effekte der TNF α -Gentherapie bei systemischer Applikation

nachgewiesen werden (50), allerdings wurde dabei keine Heilung erzielt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher alternativ eine Kombinationstherapie mit dem Chemotherapeutikum Doxil[®] getestet, um etwaige additive oder synergistische Effekte herauszufinden.

3.3.1 Etablierung des B16F10-Tumormodells in der C57BL/6-Maus

Für die TNF α -Gentherapie wurde als Tumormodell das B16F10-Melanom in der C57BL/6-Maus gewählt. Der Klon B16F10 wurde von I.J. Fidler isoliert, da sich nach i.v. Injektion des ursprünglichen B16-Melanom-Modells, ein hohes Potential für Lungenmetastasen ergab (64). Bei dem ursprünglichen B16-Melanom-Modell handelt es sich um ein spontanes Melanom, welches bei dem Mausstamm C57BL/6J isoliert wurde (69). Die Tumore sind zwar relativ gut durchblutet, doch aufgrund ihrer Struktur für die Gentherapie nicht so leicht zugänglich. Die Wirkung einer tumorspezifischen TNF α -Gentherapie wurde in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxil untersucht.

Um das Tumormodell zu etablieren, wurden zunächst 3 Gruppen mit jeweils 8 C57BL/6-Mäusen verwendet, denen an Tag 0 drei unterschiedliche Dosen an B16F10-Tumorzellen subkutan appliziert wurden. Gruppe 1 erhielt 100.000 Zellen/Maus, Gruppe 2 500.000 Zellen/Maus und Gruppe 3 1.000.000 Zellen/Maus. Ab Tag 7 wurden die Mäuse jeden zweiten Tag gewogen und die Tumorgöße mit einem digitalen Kaliper-Messgerät gemessen. Wichtige Parameter waren Körpergewicht, Tumorwachstum, Anzahl an Tumornekrosen und die Homogenität der Gruppe.

In Gruppe 1 (Abbildung 26, Bild A) war das Wachstum der Tumore sehr langsam, dafür war der Wachstumsverlauf gleichmäßig, allerdings mit einer breiten Streuung der Tumorgöße. Eine Maus entwickelte erst nach 16 Tagen einen Tumor. Bei 4 von 8 Tieren wurde der Tumor nekrotisch. An Tag 14 betrug das durchschnittliche Tumolvolumen 200 mm³. Das Gewicht der Tiere innerhalb der Gruppe war sehr homogen (Abbildung 26, Bild B).

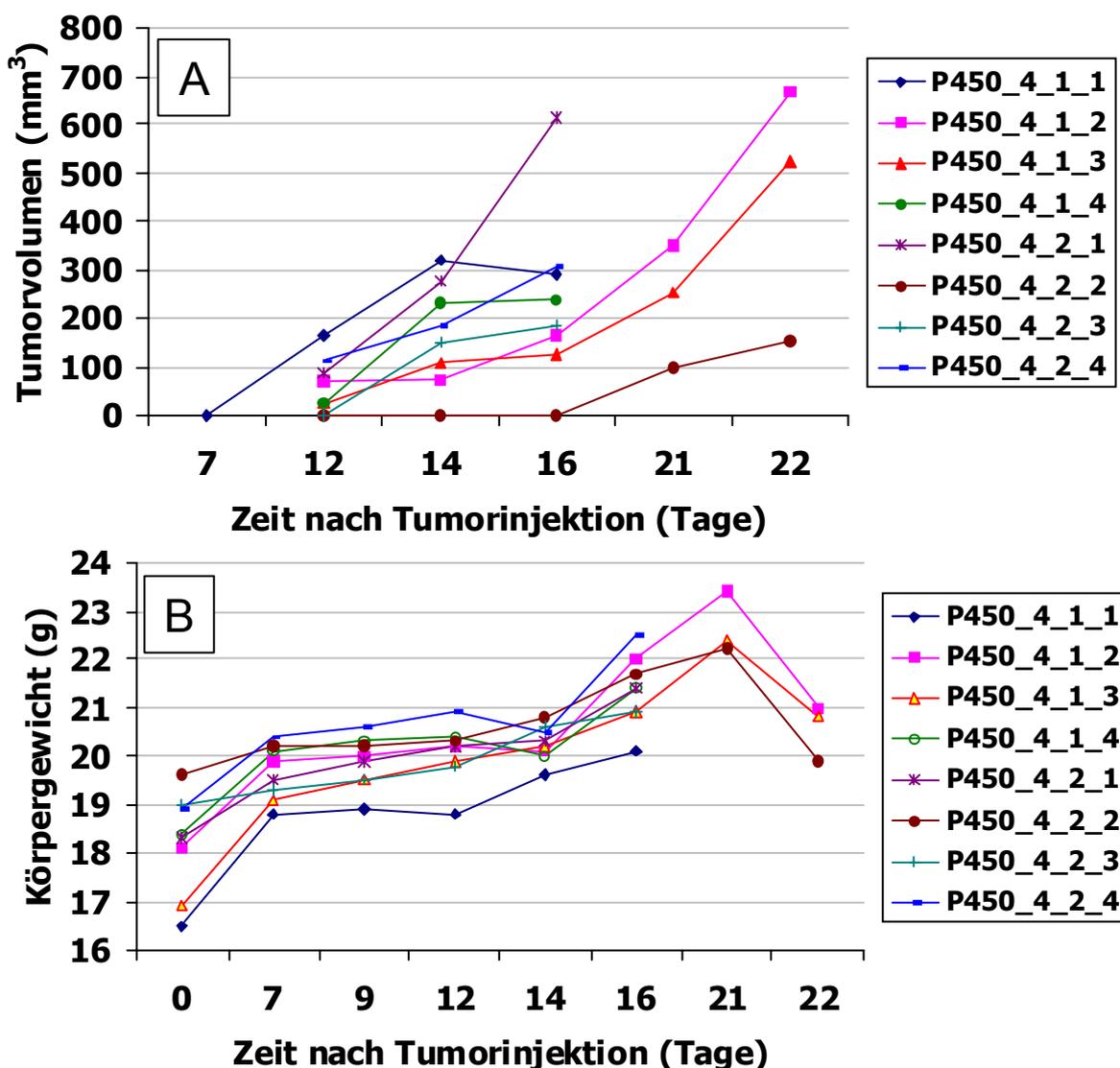


Abbildung 26: Etablierung des B16F10-Tumormodells in der C57BL/6-Maus: A) Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 1. 100.000 Tumorzellen/Maus in 100 µl PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

In Gruppe 2 (Abbildung 27, Bild A) war das Tumorwachstum langsam und der Wachstumsverlauf sehr heterogen. Eine von 8 Mäusen entwickelte keinen Tumor, bei einer anderen verschwand der Tumor wieder und bei einer entwickelte sich der Tumor erst an Tag 21. Zwei von 8 Tieren entwickelten bereits an Tag 16 eine Tumornekrose. Das Körpergewicht innerhalb der Gruppe war heterogen (Abbildung 27, Bild B) und das durchschnittliche Tumolvolumen an Tag 14 konnte aufgrund der großen Heterogenität nicht ermittelt werden. In Gruppe 3 (Abbildung 28, Bild A) war

der Tumorwachstumsverlauf relativ homogen. Jede Maus entwickelte einen Tumor, wobei dieser bei einer der Mäuse schon im frühen Wachstumsstadium nekrotisch wurde. Das Körpergewicht in der Gruppe war relativ heterogen (Abbildung 28, Bild B). An Tag 14 betrug das durchschnittliche Tumolvolumen ca. 120 mm³.

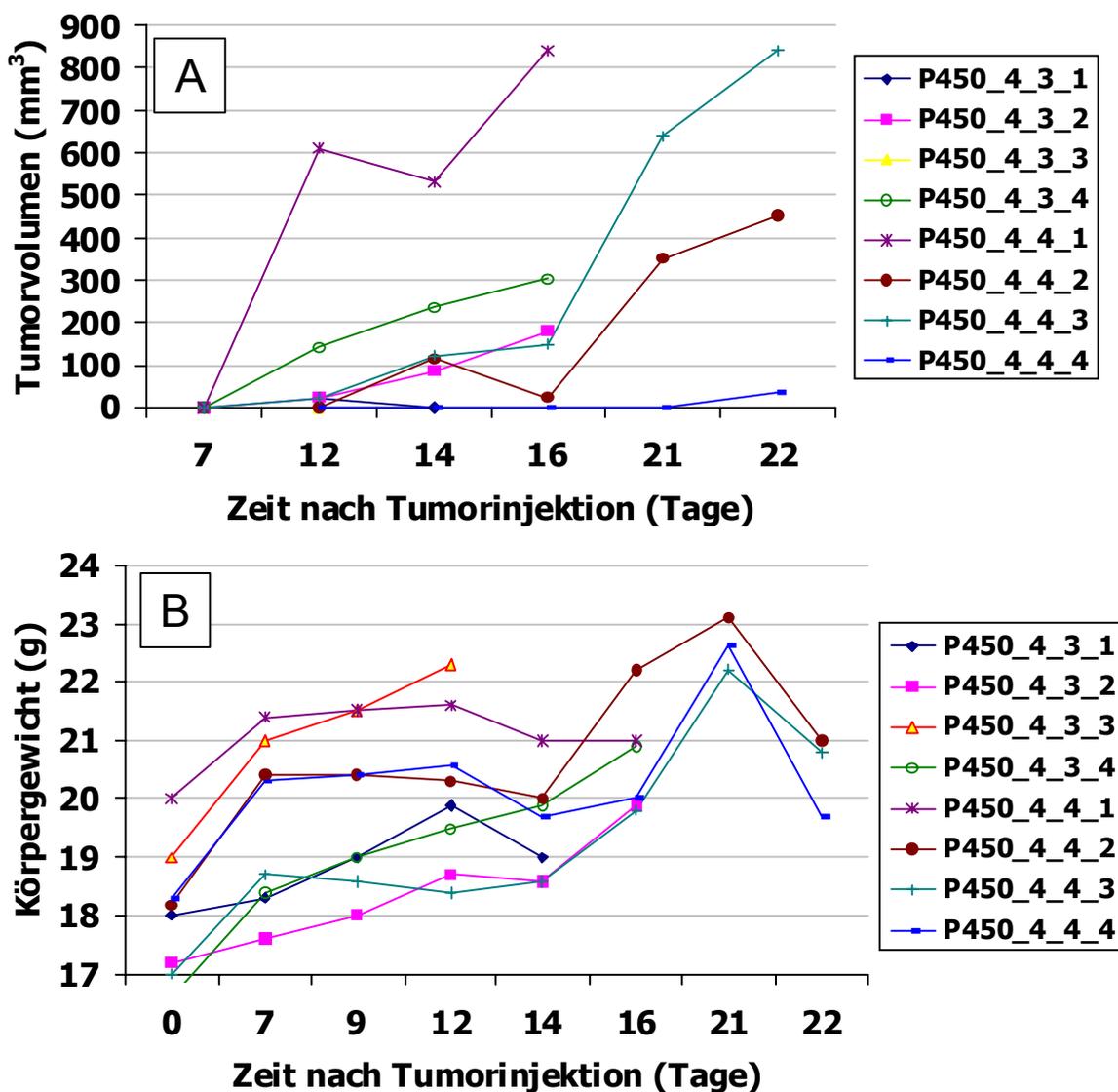


Abbildung 27: Etablierung des B16F10-Tumormodells in der C57BL/6-Maus: A) Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 2. 500.000 Tumorzellen/Maus in 100 µl PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

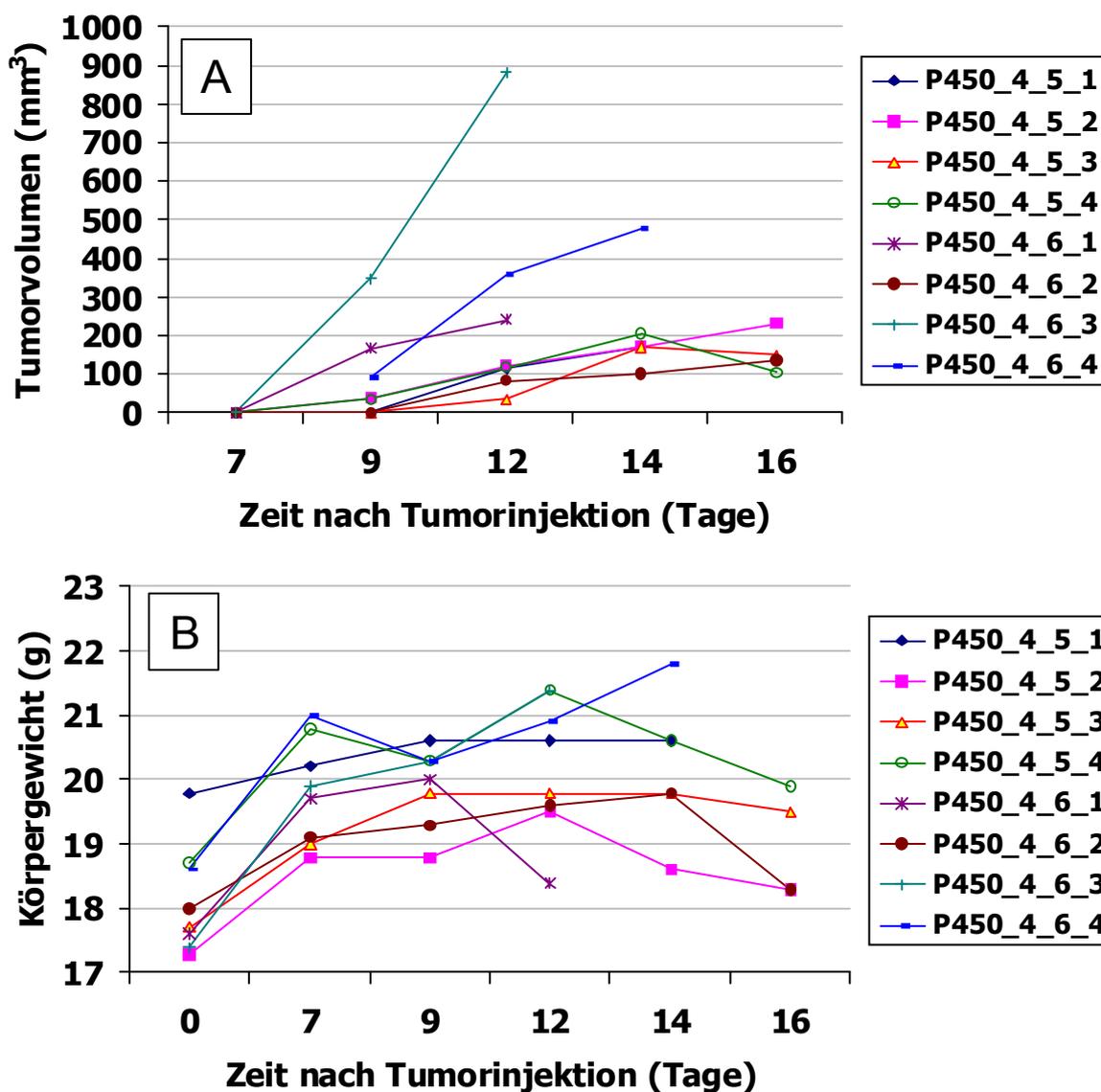


Abbildung 28: Etablierung des B16F10-Tumormodells in der C57BL/6-Maus: A): Tumorwachstumsverlauf von den einzelnen Tieren in Gruppe 3. 1.000.000 Tumorzellen/Maus in 100 μ l PBS wurden subkutan appliziert. B) Gewichtskurve. Die Bezeichnung P450 stellt die Projektnummer dieser Versuchreihe dar.

Aufgrund der geringen Anzahl von Nekrosen, des vergleichsweise gleichmäßigen Tumorwachstums und trotz der relativ heterogenen Entwicklung des Körpergewichts, wurde die Tumorzelldosis von 1.000.000 Zellen/Maus der Gruppe 3 als die zuverlässigste Dosierung ausgewählt und für zukünftige Experimente benutzt.

3.3.2 Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne Doxil[®] im B16F10-Tumormodell

In einem ersten groß angelegten Versuch wurde an Tag 0 40 C57BL/6-Mäusen 1.000.000 B16F10-Zellen/Maus subkutan appliziert. Die Tiere wurden in 5 Gruppen mit jeweils n = 8 eingeteilt. Eine Maus starb während der Injektion, somit bestand die „Kontrollgruppe“ aus n = 7 Tieren. An Tag 10 wurde mit der systemischen Gentherapie begonnen und an Tag 11 erfolgte die intraperitoneale Doxil-Applikation. Die Therapien wurden immer abwechselnd durchgeführt. Tumorwachstum und Gewicht der Tiere wurden jeden 2. Tag gemessen. Die systemische Applikation erfolgte dreimal pro Woche mit 250 μ l des Transfektionskomplexes (Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2, N/P 4,8) mit 50 μ g TNF α - oder Luziferase-Gen pro Maus. Doxil[®] wurde dreimal pro Woche intraperitoneal mit einer Konzentration von 1 mg/kg appliziert. Zuvor wurden die Tiere gewogen, um für jedes Tier die seinem Körpergewicht entsprechende Menge Doxil[®] zu ermitteln. Die „Kontrollgruppe“ erhielt keine Therapie. Die „Doxil-Gruppe“ erhielt nur Doxil[®] i. p. und diente als Kontrolle, um das Tumorwachstum bei dieser Behandlung beobachten zu können. Die Gruppe „TNF α “ erhielt nur den Transfektionskomplex mit dem TNF α -Gen und galt als weitere Kontrollgruppe, um auch hier das Tumorwachstum mit dieser Monotherapie beobachten zu können. Die Gruppe „TNF α + Doxil“ war die eigentliche therapeutische Gruppe. Die Gruppe „Luc + Doxil“ erhielt dieselbe Therapie wie die zuvor genannte Gruppe, jedoch wurde hier das Gen TNF α gegen das Gen für Luziferase ausgetauscht. Diese Gruppe diente dazu, die Wirkung des angewendeten Gens für die Therapie bewerten zu können.

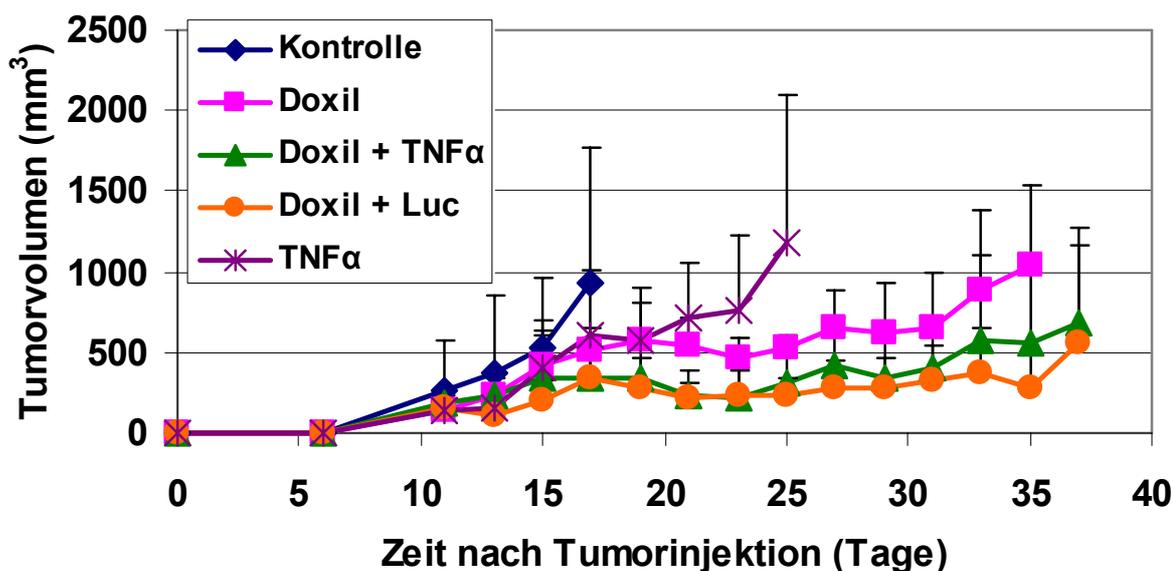


Abbildung 29: TNF α -Gen +/- Doxil in der C57BL/6-Maus im B16F10-Tumormodell. Die Mäuse erhielten abwechselnd die Doxil-Applikation i.p. und den intravenösen systemischen Gentransfer mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2, N/P 4,8. Die „Kontrollgruppe“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „Doxil“ erhielt nur Doxil in einer Konzentration von 1 mg/kg. Die Gruppe „TNF α “ erhielt den Transfektionskomplex mit TNF α -Gen. Die Gruppe „TNF α + Doxil“ erhielt abwechselnd den Transfektionskomplex mit TNF α -Gen und das Doxil. Die Gruppe „Luc + Doxil“ erhielt den Transfektionskomplex mit Luziferase-Gen und Doxil. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 8 Tieren pro Gruppe dar. Alle Gruppen bis auf Gruppe „TNF α “ zeigten gegenüber der Gruppe „Kontrolle“ eine signifikante Tumorstillwachstumsverzögerung. Die therapierten Gruppen „Doxil“, „TNF α + Doxil“ und „Luc + Doxil“ zeigten untereinander keine signifikante Wachstumsverzögerung.

Das Ergebnis lässt zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen (Abbildung 29). In der Kontrollgruppe wurde, wie erwartet, ein exponentielles Tumorstillwachstum beobachtet. Da am Tag 17 bereits 3 Tiere wegen zu großem Tumor eingeschläfert wurden, fiel die Gruppe ab diesem Tag weg. Alle Gruppen, bis auf die Gruppe „TNF α “, zeigten eine signifikante Verzögerung des Tumorstillwachstums zur Kontrollgruppe. Die Gruppe „TNF α “ zeigte ein ähnliches, nicht signifikantes Tumorstillwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings fiel das Tumorstillwachstum etwas langsamer aus und die Bewertung der Gruppe endete an Tag 25. Alle therapierten Gruppen zeigten eine signifikante Verzögerung des Tumorstillwachstums verglichen mit Gruppe „TNF α “. Wenn ausschließlich „nur Doxil“ verwendet wurde, zeigte sich eine deutliche Verzögerung des Tumorstillwachstums. Dieses verharrte in der Mitte des Versuchs bei 600 mm³ und nahm erst gegen Ende des Versuchs (ab Tag 30) wieder deutlich zu. Die Gruppe „Luc + Doxil“ zeigte eine

noch deutlichere Verzögerung des Tumorwachstum bis hin zum Wachstumsstillstand von Tag 19 - 29. Das Tumolvolumen hielt sich konstant zwischen 200 – 300 mm³. Bei einem Tier der Gruppe verschwand der Tumor komplett. Bei zwei Tieren führte die Behandlung zur Tumornekrose, welche durch eine deutliche Schwarzfärbung des Tumors in der Mitte gekennzeichnet war. Sehr ähnlich verhielt sich die Gruppe „TNF α + Doxil“, bei der sich die Tumorgöße allerdings mit größeren Schwankungen bei ca. 350 mm³ einpendelte. Bei einer Maus verschwand der Tumor, während bei 5 Tieren eine Tumornekrose zu beobachten war. Bei den zwei letzt genannten Gruppen zeigte sich, abgesehen vom vermehrten Auftreten von Nekrosen in der TNF α -Gruppe, kein Unterschied im Tumorwachstum. Eine mögliche Erklärung des therapeutischen Effekts in der Gruppe „Luc + Doxil“ könnte die immunogene Wirkung des wirtsfremden Luziferase-Proteins sein. Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit der „Procedure Mixed“ des SAS-Systems (Kapitel 2.16). Analysiert wurden die Wachstumsparameter in einem gemischten linearen Modell unter der Berücksichtigung der Verlaufstrukturen der Daten mit einem zufälligen Effekt mit dem Trend für einzelne Tiere (67). Es wurden die Tumorwachstumsdaten pro Tag der Gruppen mit Standardfehler berechnet und mit den Daten der anderen Gruppen verglichen.

Tabelle 1: Statistische Auswertung des Experiments „Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne DOXIL im B16F10-Tumormodell“. Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit dem „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Das Tumorwachstum/Tag wird mit der Einheit mm³ berechnet.

Gruppe	Tumorwachstum/Tag	Standardfehler	
Kontrolle	71,16	+/- 17,85	
Doxil	27,12	+/- 19,59	* , #
TNF α + Doxil	9,17	+/- 19,75	** , ###
Luc + Doxil	8,05	+/- 19,65	** , ###
TNF α	69,79	+/- 21,67	

* p < 0,05; ** p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle

p < 0,001; ### p < 0,0001 im Vergleich zu TNF α

Auf den Fotografien (Abbildung 30) ist auf Bild A der Tumor einer Maus aus der Kontrollgruppe zu sehen. Abb. 30, Bild B zeigt den Tumor einer Maus aus der Gruppe „TNF α + Doxil“. Deutlich ist die in der Tumormitte beginnende schwarz

gefärbte Nekrose des Tumors zu erkennen. Bild Abb. 30, Bild C zeigt den Tumor einer „Luc + Doxil“ Maus, auch hier mit Eintrocknung des Tumors. Abb. 30, Bild D zeigt einen Tumor aus der Gruppe „TNF α “. Auf diesem Bild zeigt der Tumor kaum Wachstumsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Abbildung 30: Abbildung von vier B16F10-Tumoren von C57BL/6-Mäusen des Experiments „Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne DOXIL im B16F10-Modell“. Bild A zeigt den Tumor einer Maus aus der Kontrollgruppe. Bild B den Tumor einer Maus aus der Gruppe „TNF α + Doxil“ mit deutlicher schwarz gefärbten Nekrose des Tumors. Bild C zeigt den eingetrockneten Tumor einer „Luc + Doxil“. Bild D zeigt den Tumor aus der Gruppe „TNF α “.

3.3.3 Doxil®-Titration in der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumormodell

Um die Wirkung des systemischen TNF α -Gentransfers in Kombination mit Doxil® im Neuro2A-Tumormodell der A/J-Maus zu testen, musste zunächst die optimale Doxil-Konzentration für die Kombinationstherapie ermittelt werden. Dazu wurden 16 tumortragende A/J-Mäuse in Gruppen zu n = 4 eingeteilt. Tag 0 markiert den Tag der Tumorzellapplikation. Ab Tag 15 erhielten die Tiere jeden 2. – 3. Tag Doxil in unterschiedlicher Konzentration intraperitoneal appliziert. Gruppe 1 erhielt 0,5 mg/kg, Gruppe 2 1 mg/kg und Gruppe 3 2 mg/kg. Gruppe 4 war die Kontrollgruppe und erhielt 100 μ l 5 %ige Glucose intraperitoneal appliziert. Da Doxil® mit 5% Glucoselösung gemischt wurde, musste die Kontrollgruppe auch mit der entsprechenden Menge Glucose versorgt werden um vergleichbare Gewichtsdaten zu bekommen. Jeden 2. – 3. Tag wurden das Tumorwachstum (Abbildung 31) und das Gewicht der Mäuse (Abbildung 32) gemessen, wobei letzteres dazu diente, die Verträglichkeit der Chemotherapie abschätzen zu können.

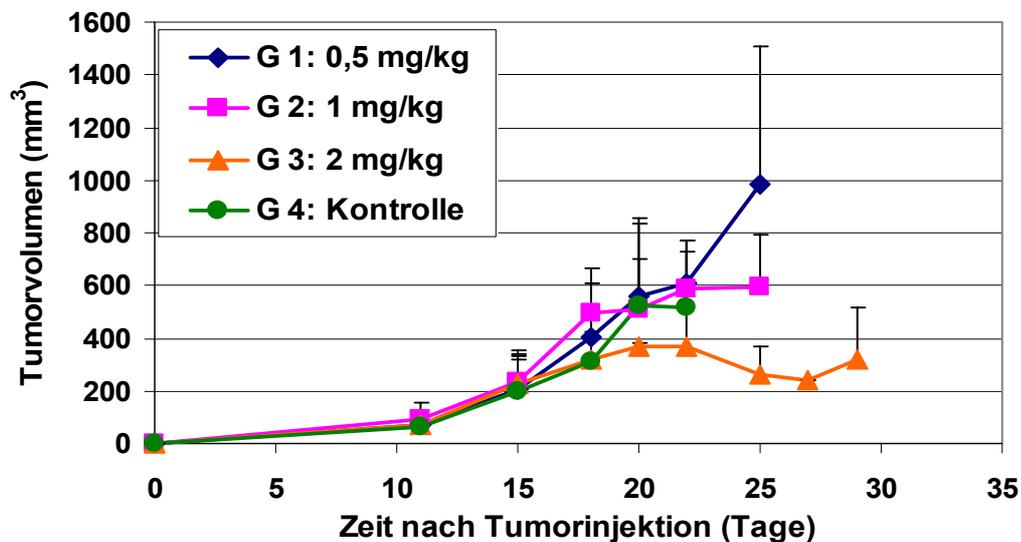


Abbildung 31: Doxil-Titration in der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Ab Tag 15 erhielten die Tiere jeden 2. – 3. Tag das Doxil intraperitoneal appliziert. Gruppe 1 erhielt 0,5 mg/kg Doxil, Gruppe 2 1 mg/kg Doxil und Gruppe 3 2 mg/kg Doxil. Gruppe 4 stellte die Kontrollgruppe dar. Diese erhielt 100 μ l 5%ige Glucose intraperitoneal appliziert. Die Kurve zeigt den Verlauf des Tumorwachstums. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwert + SD von 4 Tieren pro Gruppe dar.

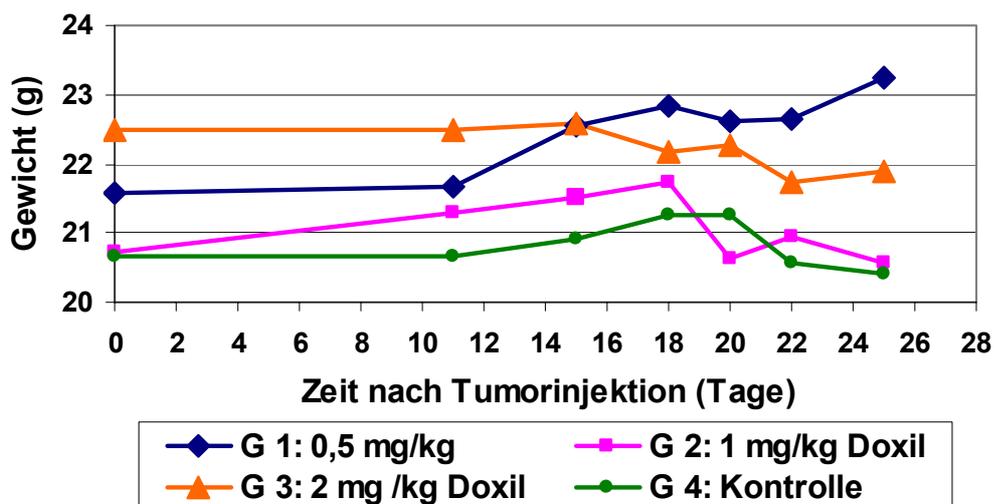


Abbildung 32: Doxil-Titration in der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Gewichtsverlauf der Tiere. Gruppe 1 erhielt 0,5 mg/kg Doxil, Gruppe 2 1 mg/kg Doxil und Gruppe 3 2 mg/kg Doxil. Gruppe 4 stellte die Kontrollgruppe dar. Dieser wurden 100 μ l 5%ige Glucose intraperitoneal appliziert. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert von 4 Tieren pro Gruppe dar.

Gruppe 1 mit 0,5 mg/kg Doxil[®] zeigte zu Beginn einen ähnlichen Tumorwachstumsverlauf wie die Kontrollgruppe, dieser war zunächst nur leicht ansteigend, ab Tag 22 wurden die Tumore jedoch zunehmend größer. Zwei Mäuse in der Kontrollgruppe mussten wegen Tumornekrose vorzeitig eingeschläfert werden. Da somit kein Mittelwert mehr errechnet werden konnte, endeten die Werte mit Tag 22. Der Gewichtsverlauf von Gruppe 1 war konstant zunehmend, ähnlich wie in der Kontrollgruppe. Der Tumorwachstumsverlauf von Gruppe 2 mit 1 mg/kg Doxil pendelte sich an Tag 17 bei einem Tumolvolumen von 500 – 600 mm³ ein. Der Gewichtsverlauf dieser Gruppe nahm ab Tag 18 im Durchschnitt um insgesamt 1 g ab. Das Tumorwachstum bei Gruppe 3 mit 2 mg/kg Doxil[®] reduzierte sich nach anfänglicher Zunahme ab Tag 22 wieder und der Gewichtsverlauf verringerte sich im Durchschnitt um 0,7 g. Die zu geringe Anzahl an Tieren pro Gruppe erlaubte keine statistische Auswertung.

Aufgrund dieser Daten wurde die Doxil[®]-Konzentration bei Gruppe 2 der A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor mit 1 mg/kg Doxil[®] als optimal bewertet.

3.3.4 Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne Doxil[®] im Neuro2A-Tumormodell

In einem weiteren Versuch wurde an Tag 0 60 A/J-Mäusen 1.000.000 Neuro2A-Tumorzellen/Maus subkutan appliziert. An Tag 9 wurden 40 Tiere nach TumorgroÙe und Körpergewicht ausgewählt, dabei waren die Kriterien ein Körpergewicht über 20 g, und eine TumorgroÙe von 3 – 6 mm in einer gemessenen Richtung. Die Mäuse wurden in Gruppen mit jeweils n = 8 eingeteilt. An Tag 10 wurde mit der systemischen Therapie begonnen, darauf folgte an Tag 11 die intraperitoneale Doxil-Applikation. Das Tumorstadium und das Gewicht der Tiere wurden jeden 2. – 3. Tag kontrolliert. Die systemische Applikation des TNF α -Gens erfolgte zweimal pro Woche mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2, N/P 4,8. Dabei wurden 50 μ g DNS in 250 μ l Transfektionslösung pro Maus intravenös appliziert. Die Doxil[®]-Applikation erfolgte zweimal pro Woche intraperitoneal in einer Konzentration von 1 mg/kg. Zuvor wurden die Tiere gewogen und jedes Tier erhielt die seinem Körpergewicht entsprechende Menge Doxil[®]. Die Gruppe „Kontrolle“ erhielt keine Therapie und diente als negative Kontrolle. Die Gruppe „Doxil“ erhielt nur Doxil[®] und diente dazu, das Tumorstadium bei dieser Behandlung beobachten zu können. Die Gruppe „TNF α “ erhielt nur den Transfektionskomplex mit dem TNF α -Gen und diente auch hier dazu, das Tumorstadium ohne Doxil[®] beobachten zu können und somit die Wirkung von TNF α -Gen alleine zu bewerten. Die Gruppe „TNF α + Doxil“ ist die eigentliche therapeutische Gruppe. Die Tiere erhielten abwechselnd systemisch Transfektionskomplexe mit dem TNF α -Gen, sowie das Chemotherapeutikum Doxil[®]. Die Gruppe „ β -gal + Doxil“ erhielt dieselbe Therapie wie die zuvor genannte Gruppe, allerdings wurde hier das Reportergen β -gal verwendet. Diese Gruppe diente als Kontrolle um eruieren zu können, wie sich diese Therapie ohne das TNF α -Gen auswirkt. Das Gen für β -gal wurde verwendet, da angenommen wurde, dass es weniger immunogen wirkt als die Luziferase.

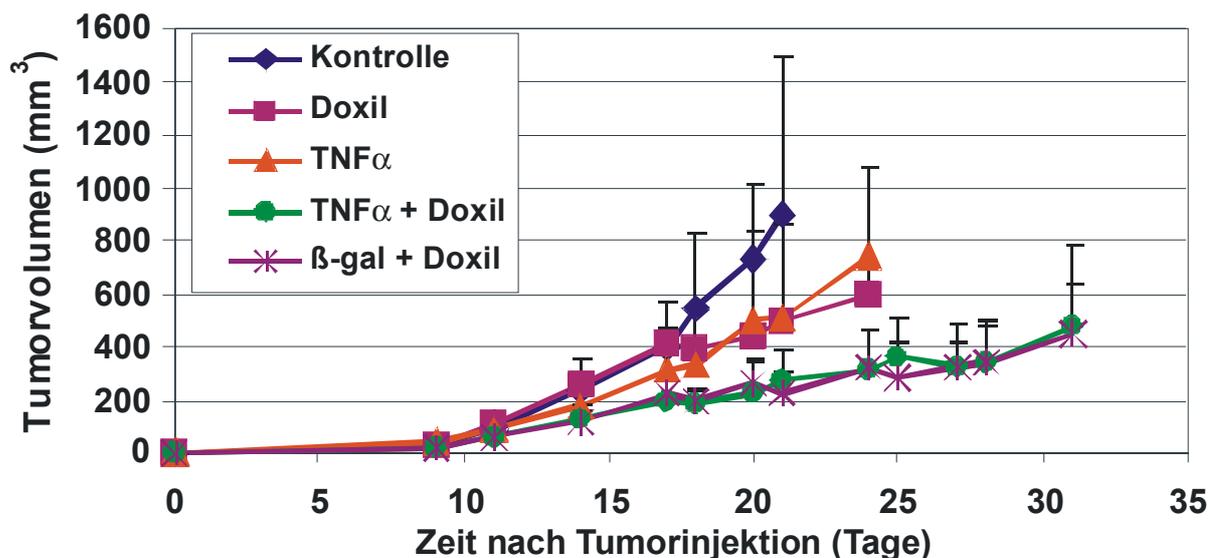


Abbildung 33: TNF α +/- Doxil in A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Die Mäuse erhielten abwechselnd die Doxil-Applikation i.p. und den systemischen Gentransfer mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2, N/P 4,8 i.v. appliziert. Die „Kontrollgruppe“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „Doxil“ erhielt nur Doxil in einer Konzentration von 1 mg/kg. Die Gruppe „TNF α “ erhielt den Transfektionskomplex mit dem Gen für TNF α , die Gruppe „TNF α + Doxil“ abwechselnd den Transfektionskomplex mit TNF α und das Doxil und die Gruppe „ β -gal + Doxil“ den Transfektionskomplex mit β -gal und Doxil und diente als zusätzliche Kontrollgruppe. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 8 Tieren pro Gruppe dar. Alle Gruppen zeigten gegenüber der Gruppe „Kontrolle“ eine signifikante Tumorstillstandverzögerung. Die therapierten Gruppen „Doxil“, „TNF α + Doxil“ und „ β -gal + Doxil“ zeigten untereinander keine signifikante Wachstumsverzögerung aber dafür gegenüber der Gruppe „TNF α “.

Die Kontrollgruppe zeigte ein exponentielles Tumorstillstandwachstum (Abbildung 33). Tag 21 stellt bei einem durchschnittlichen Tumorstillstandvolumen von 900 mm³ den letzten Tag der Messung dar, da bei vielen Tieren der Tumor nekrotisch oder zu groß wurde und die Mäuse daraufhin eingeschläfert wurden. Alle Gruppen zeigten eine signifikante Verzögerung des Tumorstillstandwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe „Doxil“ zeigte ein geringeres Tumorstillstandwachstum, hier war Tag 24 mit einem durchschnittlichen Tumorstillstandvolumen von 592 mm³ der letzte Tag der Messung, da auch hier die Tumore entweder nekrotisch oder zu groß wurden. Es zeigte sich vor allem ein verlangsamtes Tumorstillstandwachstum gegenüber der Kontrollgruppe. Die Gruppe „TNF α “ reagierte ähnlich wie die „Doxil“-Gruppe. Auch hier ist bei einem durchschnittlichen Tumorstillstandvolumen von 739 mm³ der letzte Tag der Messung Tag 24. Alle therapierten Gruppen wiesen eine signifikante Verzögerung des Tumorstillstandwachstums gegenüber Gruppe „TNF α “ auf. Das Verlaufsmuster der Gruppen „TNF α + Doxil“ und „ β -gal + Doxil“ sah sehr ähnlich aus und beide Gruppen zeigten eine deutliche Verzögerung

des Tumorwachstums gegenüber allen anderen Gruppen. An Tag 24 hatte die Gruppe „TNF α + Doxil“ ein durchschnittliches Tumolvolumen von 315 mm³ und die Gruppe „ β -gal + Doxil“ von 321 mm³. Der letzte Tag der Messung war Tag 31. Der Versuch wurde an diesem Tag abgebrochen, da das Ergebnis eindeutig war und die Mäuse nicht noch länger belastet werden sollten. Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit der „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Analysiert wurden die Wachstumsparameter in einem gemischten linearen Modell unter der Berücksichtigung der Verlaufstrukturen der Daten mit einem zufälligen Effekt mit dem Trend für einzelne Tiere (67). Es wurden die Tumorwachstumsdaten pro Tag der Gruppen mit Standardfehler berechnet und mit den Daten der anderen Gruppen verglichen.

Tabelle 2: Statistische Auswertung des Experiments „Systemische TNF α -Gentherapie mit und ohne Doxil im Neuro2A-Tumormodell“. Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit dem „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Das Tumorwachstum/Tag wird mit der Einheit mm³ berechnet.

Gruppe	Tumorwachstum/Tag	Standardfehler	
Kontrolle	85,38	+/- 7,41	
Doxil	34,43	+/- 9,74	** , #
TNF α	52,02	+/- 9,81	*
TNF α + Doxil	18,74	+/- 9,36	** , ##
β -gal + Doxil	18,52	+/- 9,46	** , ##

* p < 0,01; ** p < 0,0001 im Vergleich zur Kontrolle

p = 0,052, ## p = 0,0001 im Vergleich zu TNF α

3.3.5 Lokale TNF α -Gentherapie mittels Elektroporation

In einem Vorversuch sollte die Wirkung des intratumoral applizierten TNF α -Gens und mit nachfolgender Elektroporation ermittelt und die Wirksamkeit dieses therapeutischen Konzeptes eruiert werden. Die Tumorwachstumsdaten einer unbehandelten Kontrollgruppe wurden aus einem zeitgleich laufenden Versuch verwendet. Die Tierzahlen in den Gruppen betrug jeweils n = 4. Tag 0 markiert den Tag der subkutanen Neuro2A-Tumorzell-Applikation in A/J-Mäuse. An Tag 12 wurde das TNF α -Gen intratumoral injiziert und anschließend die Elektroporation durchgeführt. Gruppe „1 x TNF α “ erhielt einmalig das Gen intratumoral injiziert mit

nachfolgender Elektroporation, Gruppe „2 x TNF α in 4 d“ im Abstand von 4 Tagen 2 mal das Gen TNF α mit nachfolgender Elektroporation. Bei Gruppe „3 x TNF α in 8 d“ erhielt im Abstand von 4 Tage dreimal das Gen TNF α mit nachfolgender Elektroporation. Gruppe „2 x TNF α in 8 d“ wurde im Abstand von 8 Tagen zweimal das Gen TNF α verabreicht und die Elektroporation durchgeführt. Die Gruppe „TNF α ohne EP“ erhielt nur das TNF α -Gen intratumoral appliziert ohne nachfolgende Elektroporation. Die weitere Kontrollgruppe „unbehandelt“ mit n = 8 Tieren erhielt keine Behandlung. Das Tumorstadium wurde jeden zweiten Tag gemessen.

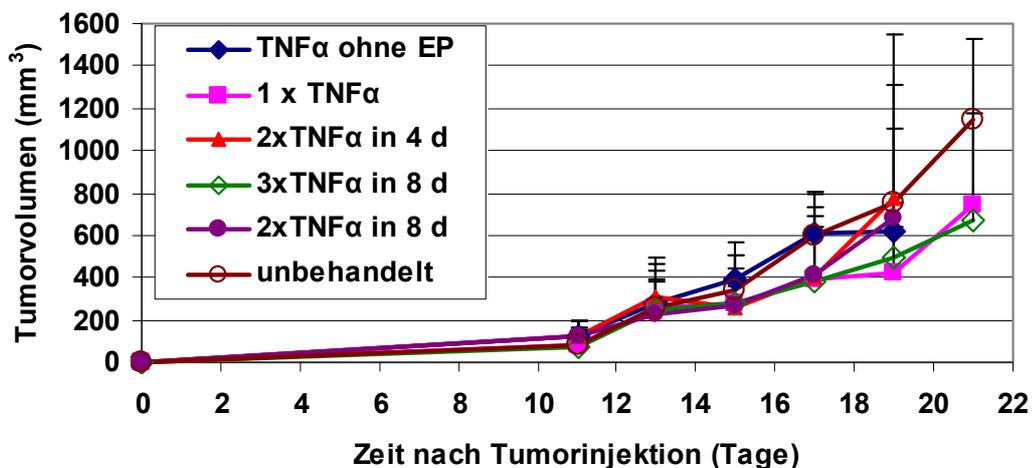


Abbildung 34: A/J-Mäuse mit Neuro2A-Tumor. 50 μ g TNF α -DNS wurden intratumoral appliziert und anschließend die Elektroporation durchgeführt. Diese Therapie wurde unterschiedlich oft wiederholt. Die Tierzahl betrug n=4. Gruppe „1xTNF α “ erhielt einmalig das Gen + EP. Gruppe „2 x in 4 d“ erhielt im Abstand von 4 Tagen zweimal TNF α + EP. Gruppe „3x in 8 d“ erhielt im Abstand von 4 Tagen dreimal TNF α + EP. Die Gruppe „2 x in 8 d“ erhielt im Abstand von 8 Tagen 2 mal TNF α + EP. Die Gruppe „TNF α ohne EP“ erhielt einmalig das Gen ohne nachfolgende Elektroporation. Die Gruppe „unbehandelt“ blieb ohne Behandlung. Die Werte dieser Gruppe wurden aus einem anderen Versuch mit n = 8 hinzugezogen um die Versuchstierzahl gering zu halten. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert von 4 Tieren pro Gruppe dar. Es wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

Die Ergebnisse (Abbildung 34) zeigten kaum einen Unterschied in den Mittelwerten des gleichen Tages zwischen den Gruppen. Alle Gruppen wiesen ein exponentielles Tumorstadium auf. Bei der Einzeltierauswertung konnten allerdings schon geringe Unterschiede festgestellt werden. In der Gruppe „3 x TNF α in 8 d“ verschwand der Tumor bei einem Tier komplett. Aufgrund dieser Ergebnisse und der zu geringen Tierzahl pro Gruppe wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet und der Versuch in dieser Art nicht wiederholt.

3.3.6 Kombination von systemischer TNF α -Gentherapie und Elektroporation mit dem IFN α -Gen

In diesem Versuch wurde die Kombination des systemischen Gentransfers mit Transfektionskomplexen und mit lokalem Gentransfer mittels Elektroporation eruiert. Hierfür wurde A/J-Mäusen mit Neuro2A-Tumoren alle 5 - 6 Tage das TNF α -Gen systemisch mittels dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI22lin 25%/75% in HBS1/2, N/P 4,8 verabreicht, und jeweils am darauf folgenden Tag intratumoral das IFN α -Gen mit nachfolgender Elektroporation appliziert. Die Gruppe „TNF α i.v.“ diente als Kontrollgruppe und erhielt das TNF α -Gen mittels Transfektionskomplex systemisch appliziert. Die therapeutische Gruppe „TNF α + IFN α + EP“ erhielt das Gen für TNF α systemisch und am darauf folgenden Tag das Gen für IFN α intratumoral mit nachfolgender Elektroporation. Die Gruppe „TNF α + β -gal + EP“ wurde analog behandelt wie die Gruppe zuvor, das therapeutische IFN α -Gen wurde jedoch durch das β -gal Gen ersetzt. Die Gruppe „Kontrolle“ diente als negative Kontrolle und blieb unbehandelt. Die Tierzahl pro Gruppe betrug n = 3 - 4.

Die Auswertung (Abbildung 35) zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der Gruppe „Kontrolle“ und allen anderen Gruppen. Die Kontrollgruppe wies ein exponentielles Tumorwachstum auf und erreichte an Tag 20 ein Tumolvolumen von 1018 mm³. Die anderen Gruppen zeigten ein relativ einheitliches Tumorwachstum, wobei die Gruppe „TNF α + IFN α + EP“ die geringste Steigungsrate aufwies und an Tag 20 mit 380 mm³ das kleinste Tumolvolumen hatte. Die Resultate geben einen Hinweis auf die Wirksamkeit der Therapie, wobei die Frage offen bleibt, inwieweit die Elektroporation und das systemisch applizierte Gen jeweils zu einer Reduktion des Tumorwachstums beitragen. Aufgrund zu geringer Tierzahlen pro Gruppe wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

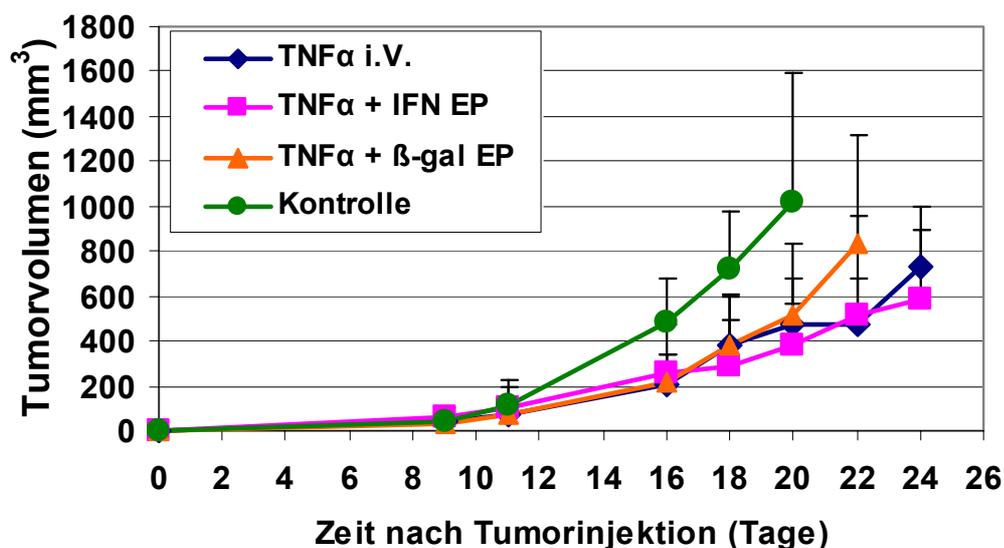


Abbildung 35: A/J-Mäuse mit Neuro2A-Tumor. Die Tierzahl betrug $n = 3 - 4$. Alle 5 - 6 Tage erhielten die Mäuse das TNF α -Gen systemisch mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI22, am Tag danach wurde intratumoral das IFN α -Gen appliziert und die Elektroporation durchgeführt. Gruppe „TNF α i.v.“ erhielt TNF α systemisch. Der Gruppe „TNF α + IFN α + EP“ wurde TNF α -Gen systemisch und IFN α -Gen intratumoral mit nachfolgender Elektroporation verabreicht. Die Gruppe „TNF α + β -gal + EP“ erhielt TNF α systemisch und β -gal intratumoral mit nachfolgender Elektroporation. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + Standardabweichung von 3 - 4 Tieren pro Gruppe dar.

3.4 Enzym-Prodrug-Therapie mit P450 und CPA

Als weiteres Therapiekonzept sollte GDEPT (Gene-directed Enzyme/Prodrug Therapy) mit dem P450-Gen und dem CPA untersucht werden. Dazu wurden zwei verschiedene Modelle gewählt, der lokalisierte Gentransfer über Elektroporation im Huh7- und Neuro2A-Tumormodell und der systemische im Neuro2A-Tumormodell.

3.4.1 CPA-Titration im Huh7-Tumormodell in der SCID-Maus

Da die optimale CPA-Konzentration für Huh7-Tumor tragende SCID-Mäuse noch nicht ermittelt worden war, wurde in diesem Mausmodell zuerst eine CPA-Titration durchgeführt. Dazu wurden 4 Gruppen mit jeweils $n = 3$ Tieren gebildet, die mit CPA in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden. Es wurde hierbei ein „moderates Therapieschema“ mit einer wöchentlichen intraperitonealen Applikation von CPA angewendet. Da es sich um einen Vorversuch handelte, wurde auf die statistische Auswertung verzichtet. Die Tiere wurden jeden zweiten Tag gewogen

und die Tumorgöße vermessen. Die Gruppe „CPA 50“ erhielt 50 mg/kg CPA, die Gruppe „CPA 75“ 75 mg/kg CPA und die Gruppe „120 CPA“ 120 mg/kg CPA intraperitoneal appliziert. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt.

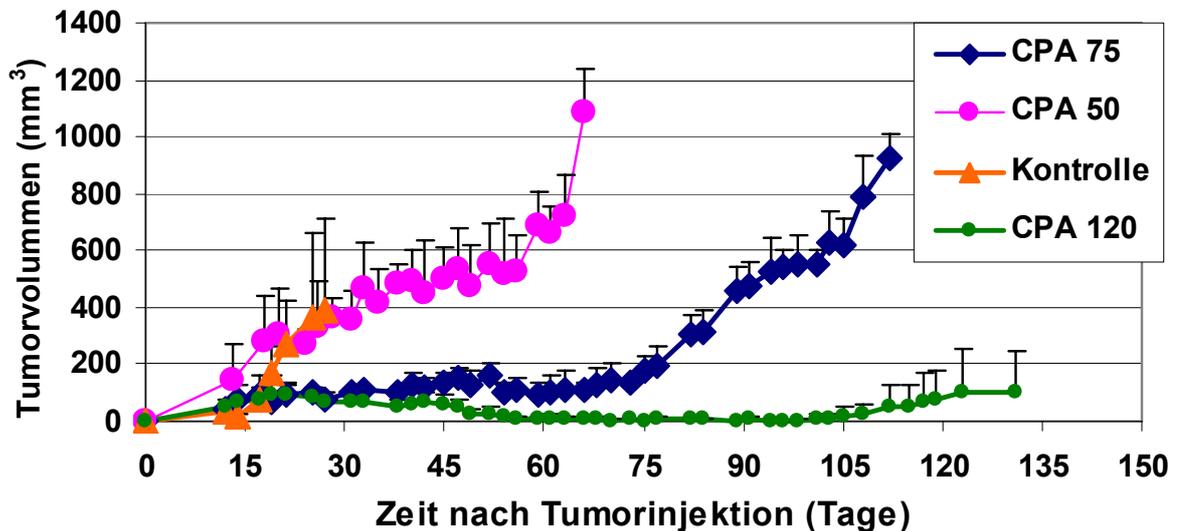


Abbildung 36: CPA-Titration in SCID-Mäusen mit Huh7-Tumoren. Intraperitoneale Applikation von CPA in unterschiedlichen Konzentrationen alle 7 Tage. Die Gruppe „CPA 50“ erhielt 50 mg/kg CPA, die Gruppe „CPA 75“ 75 mg/kg CPA und die Gruppe „120 CPA“ 120 mg/kg CPA. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 3 Tieren pro Gruppe dar.

Die Ergebnisse (Abbildung 36) zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Tumore der Gruppe „Kontrolle“ zeigten ein exponentielles Wachstum. Tag 27 war der letzte Tag der Messung, da zwei Tiere eingeschlüpfert werden mussten. Die Gruppe „CPA 50“ hatte am Anfang dasselbe Tumorstadium wie die Kontrolle, allerdings lebten die Tiere wesentlich länger und das Wachstum zeigte nach Therapiebeginn keinen exponentiellen Verlauf. Trotz Behandlung stieg das Tumorstadium ab Tag 56 wieder stark an. In der Gruppe „CPA 75“ war das Tumorstadium bei einer Größe von 100 – 200 mm³ bis zum Tag 77 zum Stillstand gekommen. Wurde die CPA-Therapie beendet, dann wurden die Tumore wieder größer. Als eine Nebenwirkung von CPA wurde festgestellt, dass die Felldecke am Bauch der Tiere ab der 6. Woche der Behandlung deutlich abnahm. Die Gruppe „CPA 120“ zeigte eine Reduktion des Tumorstadiums von anfänglich 57 mm³ auf 10 mm³ und bei 2 von 3 Tieren kam es zu einer vollständigen Tumoreradikation. Nach Ende der CPA-Applikation entwickelte nur 1 von 3 Tieren wieder einen Tumor. Am Ende der Untersuchung hatten die Tiere fast keine Bauchhaare mehr und auch

sonst deutlich lichterem Fell. Das Gewicht der Tiere blieb über den gesamten Messzeitraum in allen Gruppen konstant. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Absicht eine CPA-Konzentration zu ermitteln, die das Tumorstadium nur teilweise begrenzt, wurde für weitere Versuche die Konzentration von 50 mg/kg CPA ausgewählt. Aufgrund der geringen Tierzahlen pro Gruppe wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

3.4.2 Elektroporation mit P450-Gen in Kombination mit CPA im Huh7-Tumormodell

In diesem Experiment wurde das GDEPT-Konzept auf seine therapeutische Wirksamkeit hin getestet. SCID-Mäuse mit Huh7-Tumoren wurden für diesen Versuch in 7 Gruppen mit einer Tierzahl von $n = 5$ pro Gruppe aufgeteilt. Das Gen kodierend für Cytochrom P450 (50 µg in 50 µl H₂O) wurde am Tag 10 intratumoral appliziert und nachfolgend die Elektroporation durchgeführt. Am Tag 12 erhielten die Tiere ihrem Gewicht entsprechend 50 mg/kg CPA intraperitoneal verabreicht. Diese Behandlung wurde nach 9 Tagen wiederholt. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA appliziert und diente als Kontrolle, um die Wirkung von CPA allein verfolgen zu können. Die therapeutische Gruppe war „EP + P450 + CPA“ und erhielt das Gen für P450 mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „P450 + CPA“ erhielt das P450-Gen ohne Elektroporation und CPA. Die Gruppe „EP + P450“ erhielt nur das Gen für P450 mit nachfolgender Elektroporation. Die Gruppe „EP + PBS + CPA“ bekam anstatt des Gens PBS injiziert, mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „EP + PBS“ erhielt PBS injiziert, anschließend erfolgte die Elektroporation.

Die Ergebnisse (Abbildung 37) waren zum Teil wenig aussagekräftig. Der Grund hierfür war, dass die Tumore zu Therapiebeginn (Tag 10) mit durchschnittlich 150 mm³ bereits sehr groß waren und somit das Zeitfenster für die Therapie sehr klein wurde. Eine Verlangsamung des Tumorstadiums war nur in der Therapiegruppe „EP + P450 + CPA“ zu sehen, aber selbst hier waren die Unterschiede zur Kontrollgruppe nicht sehr groß. Alle anderen Gruppen zeigten keine oder nicht signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Selbst in die Gruppe „CPA“ verlief das Tumorstadium ähnlich wie in der Kontrollgruppe.

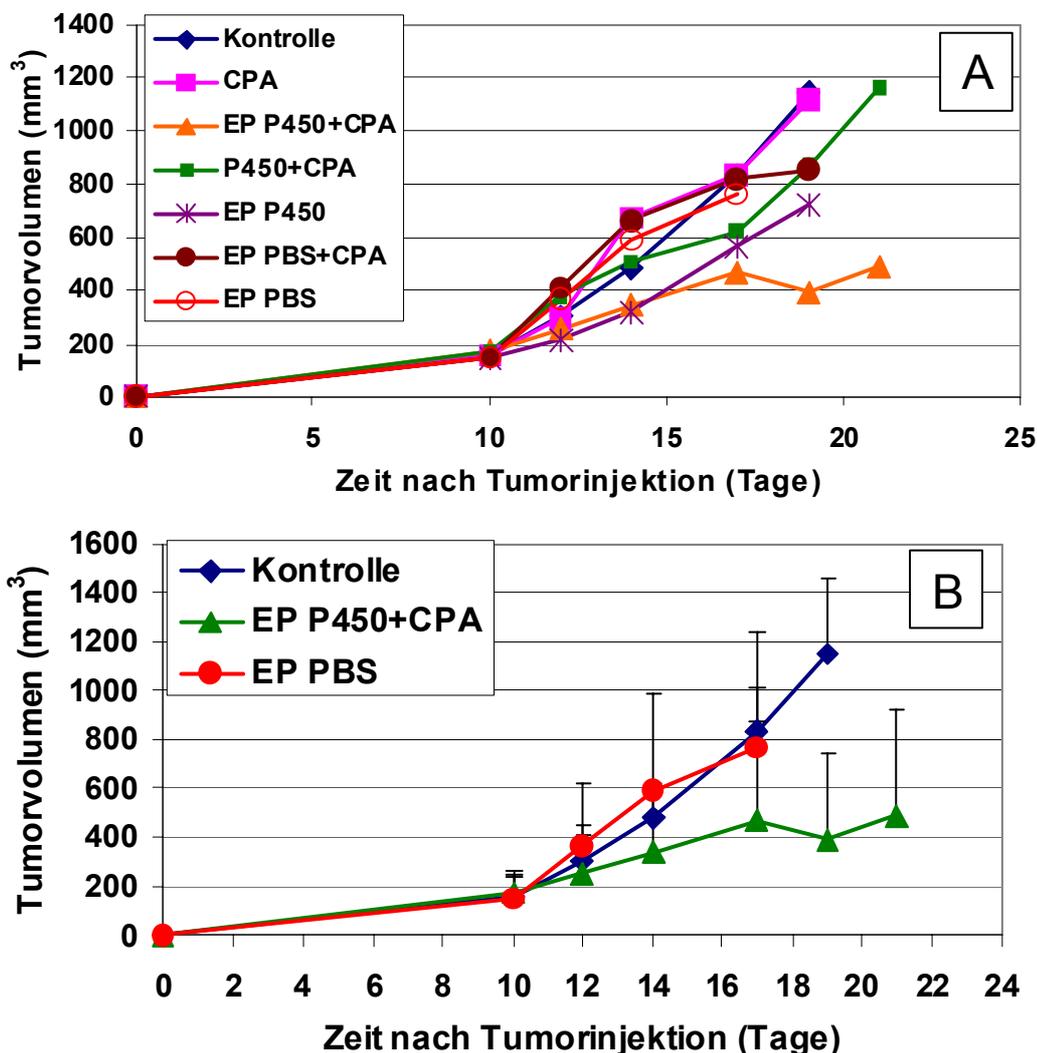


Abbildung 37.: Elektroporation mit dem P450-Gen in Kombination mit CPA in SCID-Mäusen mit Huh7-Tumoren. An Tag 10 wurde nach der intratumoralen Applikation von P450-Gen (50 μ g in 50 μ l H₂O) die Elektroporation durchgeführt. An Tag 12 erhielten die Tiere CPA (50 mg/kg) intraperitoneal appliziert. Die Tierzahl pro Gruppe betrug n = 5. Bild A: 7 Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert ohne Standardabweichung von 5 Tieren pro Gruppe dar. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ war die therapeutische Gruppe und erhielt das Gen für P450, die Elektroporation und CPA. Die Gruppe „P450 + CPA“ erhielt das Gen ohne Elektroporation und das CPA. Die Gruppe „EP + P450“ erhielt nur das P450-Gen mit nachfolgender Elektroporation. Die Gruppe „EP + PBS + CPA“ erhielt PBS injiziert mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „EP + PBS“ erhielt PBS injiziert mit nachfolgender Elektroporation. Bild B: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die 3 wichtigsten Gruppen ausgewählt. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 5 Tieren pro Gruppe dar.

In einem weiteren Experiment wurde derselbe Versuch mit kleinen Änderungen wiederholt. Hier wurde bereits an Tag 8 mit der Behandlung mittels Elektroporation mit dem P450-Gen begonnen, um ein größeres therapeutisches Zeitfenster zu

gewährleisten. Außerdem reagieren kleine Tumore auf die lokale Behandlung mittels Elektroporation empfindlicher, da eine größere Menge Gen pro Tumolvolumen zu Verfügung steht. An Tag 10 erfolgte die erste CPA-Applikation mit 50 mg/kg intraperitoneal. Die Tierzahl in den Gruppen war $n = 6 - 8$. 7 Tage später wurde die Therapie nach dem gleichen Schema wiederholt. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA intraperitoneal appliziert. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ ist die therapeutische Gruppe und erhielt das Gen für P450 mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „EP + β -gal + CPA“ erhielt das Gen für β -gal mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Sie diente als Kontrollgruppe bei gleicher Behandlung wie die therapeutische Gruppe, jedoch mit Austausch der Gene. β -gal ist ein Reporter-gen, wird aber häufig als Kontroll-Gen eingesetzt, da es nur relativ schwach immunogen wirkt (unveröffentlichte Daten von R. Kircheis).

In diesem Versuch waren die Ergebnisse und die Unterschiede zwischen den Gruppen wesentlich eindeutiger (Abbildung 38). Die Gruppe „Kontrolle“ zeigte ein exponentielles Tumorstadium. Tag 17 war der letzte Tag der Messung, da die Tumore zu groß wurden und die Tiere eingeschläfert werden mussten. Die anderen Gruppen zeigten eine signifikante Verzögerung des Tumorstadiums gegenüber der Gruppe „Kontrolle“. Bei der Gruppe „CPA“ war der letzte Tag der Messung Tag 20. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ zeigte eine deutliche Verzögerung des Tumorstadiums, was auch gegenüber der Gruppe „CPA“ signifikant war. Am Tag 17 war das durchschnittliche Volumen der Tumore in dieser Gruppe 203 mm^3 , im Gegensatz zur Gruppe „CPA“ mit 517 mm^3 oder zur Gruppe „Kontrolle“ mit 869 mm^3 . Die Gruppe „EP + β -gal + CPA“ zeigte ebenfalls eine deutliche Verzögerung beim Tumorstadium die auch signifikant gegenüber der Gruppe „nur CPA“ war. Das durchschnittliche Tumorstadium am Tag 17 betrug 319 mm^3 . Der Tumorstadiumsverlauf war dem der Gruppe „EP + P450 + CPA“ sehr ähnlich.

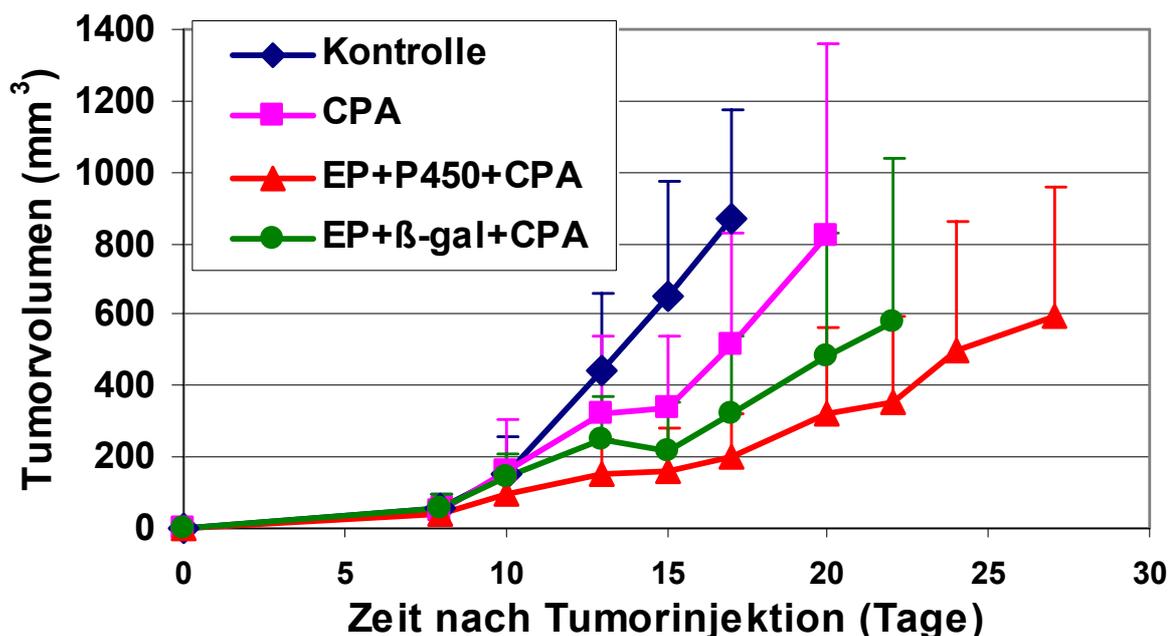


Abbildung 38: SCID-Mäuse mit Huh7-Tumor. Elektroporation mit dem P450-Gen in Kombination mit CPA. Am Tag 8 wurde nach der intratumoralen Applikation des P450-Gens (50 µg in 50 µl H₂O) die Elektroporation durchgeführt. Am Tag 10 erhielten die Tiere CPA (50 mg/kg) intraperitoneal appliziert. Die Tierzahl betrug n = 6 - 8 pro Gruppe. Wiederholung der Therapie nach 7 Tagen. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ war die therapeutische Gruppe und erhielt das P450-Gen mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „EP + β-gal + CPA“ erhielt das β-gal-Gen mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 6 - 8 Tieren pro Gruppe dar. Alle Gruppen zeigten gegenüber der Gruppe „Kontrolle“ eine signifikante Tumorstillwachstumsverzögerung. Die therapierten Gruppen zeigten untereinander verglichen eine signifikante Wachstumsverzögerung des Tumors bis auf die Gruppen „EP + P450 + CPA“ und „EP + β-gal + CPA“.

Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit der „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Analysiert wurden die Wachstumsparameter in einem gemischten linearen Modell unter der Berücksichtigung der Verlaufstrukturen der Daten mit einem zufälligen Effekt mit dem Trend für einzelne Tiere (67). Es wurden die Tumorstillwachstumsdaten pro Tag der Gruppen mit Standardfehler berechnet und mit den Daten der anderen Gruppen verglichen.

Tabelle 3: Statistische Auswertung des Experiments „Elektroporation mit P450-Gen in Kombination mit CPA im Huh7-Tumormodell“. Die statistische Berechnung dieses Versuches erfolgte mit dem „Procedure Mixed“ des SAS-Systems. Das Tumorstadium/Tag wird mit der Einheit mm³ berechnet.

Gruppe	Tumorstadium/Tag	Standardfehler	
Kontrolle	107,13	+/- 11,22	
CPA	72,15	+/- 14,79	*
P450 + CPA	31,04	+/- 14,87	** , ##
β-gal + CPA	38,2	+/- 15,5	** , #

* $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ im Vergleich zu CPA

3.4.3 Lokaler und systemischer Gentransfer mit P450-Gen in Kombination mit CPA im Neuro2A-Tumormodell

In diesem Experiment wurde der analoge Therapieansatz wie in 3.4.2 beschrieben durchgeführt, nur dass der A/J-Mausstamm mit syngenem subkutanen Neuro2A-Tumoren gewählt wurde. Neben der lokalen Applikation des P450-Gens wurde in einer anderen Gruppe dasselbe Gen mit einem Transfektionskomplex intravenös verabreicht. Als Transfektionskomplex wurde Tf-PEI25br/PEI25lin-mel 25%/75% in HBG, N/P 4.8 mit dem P450 Gen in einer Menge von 50 µg DNS in 250 µl Lösung intravenös injiziert. Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben zeigte dieser Transfektionskomplex die beste Transfektionsrate. Für die lokale Applikation wurden 50 µg DNS kodierend für P450 in 50 µl H₂O intratumoral injiziert und nachfolgend die Elektroporation durchgeführt. Da es sich um einen Vorversuch handelte, betrug die Tierzahl nur jeweils $n = 3$ pro Gruppe und daher wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. An Tag 11 nach der Injektion von Tumorzellen wurde das P450- oder β-gal-Plasmid intravenös oder intratumoral injiziert und an Tag 13 wurde das CPA in einer Konzentration von 75 mg/kg intraperitoneal appliziert. Die Therapie wurde alle 7 Tage wiederholt. Die Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA und diente als Kontrollgruppe. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ erhielt das P450-Gen intratumoral injiziert mit nachfolgender Elektroporation sowie CPA und stellt die therapeutische Gruppe für den lokalen Gentransfer dar. Die Gruppe „Tf/mel + P450 + CPA“ erhielt das P450-Gen mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI25-mel systemisch

sowie CPA und ist somit die therapeutische Gruppe für den systemischen Gentransfer.

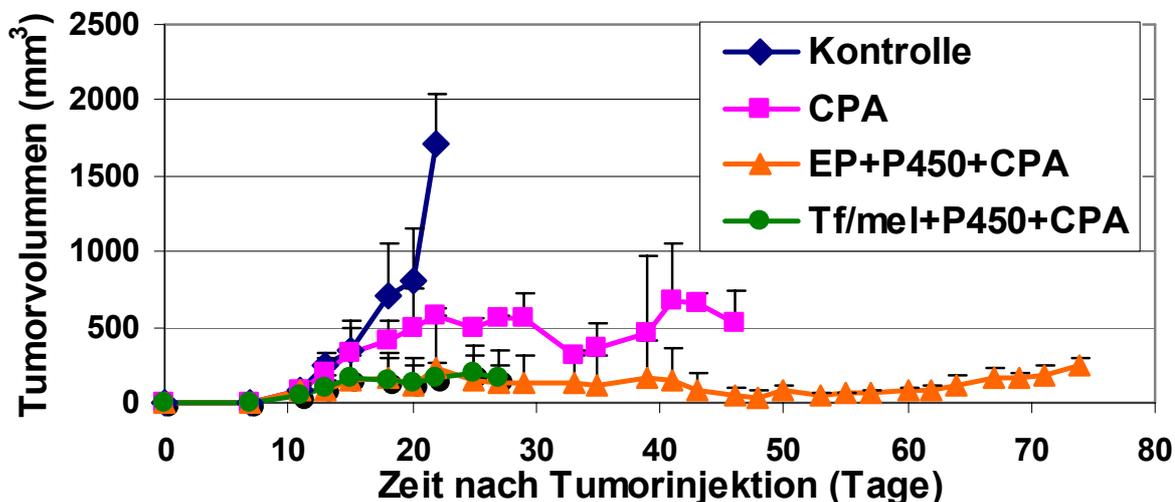


Abbildung 39: A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Lokaler und systemischer Gentransfer mit P450 in Kombination mit CPA (75 mg/kg). Vergleich systemischer Gentransfer mit lokalem Gentransfer mit dem P450-Gen zusammen mit CPA Verabreichung. Die Gruppe „Kontrolle“ blieb unbehandelt. Die Gruppe „CPA“ erhielt nur CPA. Die therapeutische Gruppe „EP + P450 + CPA“ erhielt das P450-Gen intratumoral injiziert mit nachfolgender Elektroporation und CPA. Die Gruppe „Tf/mel + P450 + CPA“ erhielt das P450-Gen mit dem Transfektionskomplex Tf-PEI25br/PEI25lin-mel 25%/75% in HBG, N/P 4,8 systemisch und CPA und stellte die therapeutische Gruppe für den systemischen Gentransfer dar. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert + SD von 3 Tieren pro Gruppe dar.

Die Ergebnisse sind in (Abbildung 39) dargestellt. Interessanterweise zeigte sich nach der dritten intravenösen Applikation in der Gruppe „Tf/mel + P450 + CPA“ mit dem Komplex Tf-PEI25br/PEI25-mel eine starke Nekrose der Venen im Schwanz der Mäuse (Abbildung 40). Daher wurden die Tiere dieser Gruppe an Tag 27 eingeschläfert. Bis zu diesem Tag zeigte sich allerdings bereits eine erhebliche Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe „Kontrolle“ zeigte ein exponentielles Tumorwachstum, Tag 22 war der letzte Tag der Messung. In der Gruppe „CPA“ war ein stark reduziertes Tumorwachstum mit Schwankungen in der Tumorgöße zu beobachten. Die CPA Applikation wurde nur einmal pro Woche durchgeführt. Der letzte Tag der Messung war Tag 46. Die Gruppe „EP + P450 + CPA“ zeigte das geringste Tumorwachstum von allen Gruppen. Bei 2 von 3 Tieren verschwand der sichtbare Tumor zeitweise komplett, um dann aber wieder zu wachsen. Der letzte Tag der Messung war Tag 74. Aufgrund zu

geringer Tierzahlen pro Gruppe konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

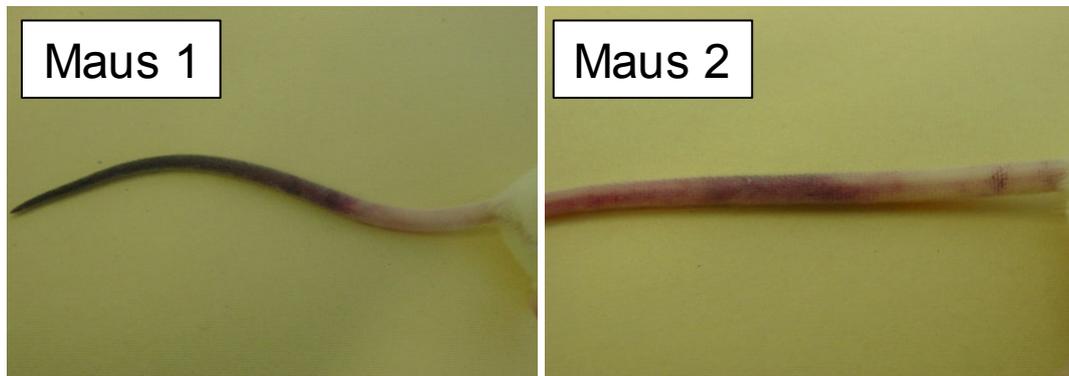


Abbildung 40: A/J-Maus mit Neuro2A-Tumor. Schwanz von zwei Mäusen nach der dritten intravenösen Applikation von 250 μ l des Transfektionskomplexes Tf-PEI25br/PEI25lin-mel 25%/75% in HBG, N/P 4,8 mit dem P450-Gen. Deutlich ist die violett-schwarze Verfärbung des Schwanzes in der Umgebung der Injektionsstelle zu sehen. Es handelt sich um eine Nekrose der Venen und des umliegenden Gewebes.

4 Diskussion

4.1 Polyethylenimin-Polyplexe für den systemischen Gentransfer

Polyplexe mit PEI22lin: Die beobachteten Reporter-gen-Expressionensraten *in vivo* (hohe Expression in der Lunge, geringere in Niere, Herz, Leber und Milz) decken sich mit bereits publizierten Ergebnissen (28;70). In BALB/c-Mäusen wurde eine höhere Expression als in C57BL/6-Mäusen gemessen. Eine von Stamm zu Stamm unterschiedlichen Transfektionseffizienz der PEI-Polyplexe kann man wie folgt erklären. Man nimmt an, dass die Aggregation der positiv geladenen Polyplexe mit Blutkomponenten wichtig für die Akkumulation in den Lungenkapillaren sowie Transfer und Expression in Alveolarzellen ist. Die Mausstamm-spezifische Gentransfer-Effizienz könnte an deren unterschiedlichen Reaktion mit den Polyplexen, basierend auf leicht verschiedenen biologischen Eigenschaften des Gerinnungssystems, des Komplementsystems bzw. der Erythrozyten liegen. Unterschiedliche Toxizität von PEI nach intravenöser Applikation wurde bereits von Chollet et al. beschrieben (31). Die hohen Expressionsraten in SCID-Mäusen im Vergleich zu den anderen Mausstämmen könnten auf die fehlende Reaktion des Immunsystems (keine B- und T-Lymphozyten) zurückzuführen sein. Trotz Verdoppelung der DNS Menge von 25 µg auf 50 µg in C57BL/6-Mäusen wurde keine weitere Erhöhung der Reporter-gen-Expression festgestellt.

Gelfiltrierte Polyplexe: Da die Gelfiltration die Größe und das Zeta-Potential der Komplexe nicht ändert und auch das N/P-Verhältnis gleich bleibt, ist diese Reinigungsmethode sehr effektiv, um freies PEI von den Komplexen zu entfernen. Des weiteren verringert die Gelfiltration die Toxizität der Komplexe deutlich. Dies zeigte sich vor allem in einer geringeren Gewichtsabnahme und dem ungestörten Allgemeinbefinden der Tiere, die gelfiltrierte Komplexe erhielten. Tiere, die gelfiltrierte Polyplexe + freies PEI22lin erhielten, zeigten dagegen eine starke Gewichtsabnahme und ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die Ursache ist damit zu erklären, das freies PEI sowohl systemisch durch Auslösung des Komplementsystems als auch zellulär durch die Aggregation von Erythrozyten toxisch wirkt. Allerdings wies diese Gruppe

eine sehr hohe Expressionsrate in der Lunge auf. Dies kommt vermutlich daher, dass freies PEI mit Blutkomponenten kleine Aggregate bildet in denen sich auch durch PEI gebundene DNS befindet. Diese bleiben in den Lungenkapillaren stecken und sind dort für die hohe Expression verantwortlich (68;71). Dagegen kommt es mit gefilterten Komplexen zu einer 200 fachen Reduktion der Lungenexpression. Dieser Effekt lässt sich durch eine verringerte Aggregation der gereinigten Polyplexe mit Erythrozyten erklären (siehe Abbildung 8). Auch in allen anderen untersuchten Organen war die Transfektionseffizienz deutlich verringert. Offensichtlich besitzt das freie PEI eine wichtige Funktion für die Effizienz der Transfektion. In Zukunft ist es daher wichtig Komplexformulierungen zu finden, die eine hohe Transfektionsrate durch weniger toxische Komponenten wie das freie PEI erreichen. Ein Vorteil von gefilterten Komplexen zeigte sich nach systemischer Applikation in tumortragenden SCID-Mäusen: Während in allen Organen die Expressionswerte von gefilterten Komplexen im Vergleich zu nicht filterten Komplexen verringert waren, war das Expressionsniveau im HepG2-Tumor erhöht. Dies könnte an der längeren Zirkulation der Komplexe im Organismus liegen, wenn diese nicht frühzeitig in den Lungenkapillaren durch Aggregation mit Blutkomponenten stecken bleiben und abgebaut werden, wodurch sich die Zahl der Transfektionskomplexe, die den Tumor erreichen, erhöht.

Polyplexe mit Transferrin: Die im Tumor gemessene Transgenexpression zeigt eine starke Abhängigkeit vom Tumormodell. Die gefundenen *in vivo* Ergebnisse decken sich mit den beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (18). In dem Mausstamm A/J mit Neuro2A-Tumoren wurden die höchsten Expressionsraten im Tumor gefunden, während in den anderen Organen keine bis moderate Expressionswerte zu finden waren. Dass dieser Gentransfer in anderen Mausstämmen mit anderen Tumorzellen wie z. B. hier bei C57BL/6-Mäusen mit B16F10-Tumoren und bei BALB/c-Mäusen mit CT26-Tumoren kaum funktioniert, liegt, wie bereits beschrieben, daran, dass die Tumore für den systemischen Gentransfer schwer erreichbar waren (72). Im Falle von A/J-Mäusen mit Neuro2A-Tumoren zeigt dieser Transfektionsversuch einen Weg auf, wie zielgerichtete Genexpression *in vivo* möglich wäre, um bestimmte Tumore therapeutisch anzugehen. Große Hoffnungen wurden auf den Einbau des membranaktiven Peptids

Melittin in PEI-Polyplexe gesetzt, da dieser in *vitro* deutlich verbesserte Transfektionsraten bewirkte (37). Bei einmaliger Applikation von Melittin enthaltenden Tf-PEI25br/PEI25lin-mel Komplexen mit pCMVLuc-DNS zeigte sich eine um das 2,8 – 23,8 fach (je nach Versuch) erhöhte Reporter-Expression im Tumorgewebe gegenüber den Tf-PEI25br/PEI22lin-Komplexen ohne Peptid. Daher wurde diese Formulierung auch in einer therapeutischen Anwendung (siehe 4.4.) angewendet.

Histologie: Die DNS ließ sich mittels markierter Transfektionskomplexe erfolgreich darstellen. Mit dieser Methode lässt sich der Weg der DNS und die Akkumulation in bestimmten Organen verfolgen. Die Färbung des Endothels der Tumore zeigte ähnliche Ergebnisse wie bereits beschrieben (72). Die Neuro2A-Tumore und auch die B16F10-Tumore zeigten eine gute Vaskularisierung mit großen Gefäßen, während die CT26-Tumore sehr kleine Gefäße aufwiesen. Die Möglichkeit eines effektiven Gentransfers ist sehr eng mit einer guten Vaskularisation verknüpft. Dass dabei auch noch die Art der Gefäße eine Rolle spielen muss, zeigte sich in der schlechten Transfizierbarkeit von B16F10-Tumoren. Die Tumore sind zwar gut vaskularisiert, zeigen aber eine geringe Transfektionsrate. Die Gefäße müssen permeabel (gefenstert) sein, damit die Transfektionskomplexe überhaupt eine Möglichkeit haben in das Gewebe einzudringen. Dies ist bei Neuro2A-Tumoren der Fall (72), bei B16F10-Tumoren vermutlich jedoch nicht.

Die histologische Untersuchung von GFP-Expression brachte nicht sehr eindeutige Ergebnisse. Es konnte in vielen Präparaten (sowohl mit systemisch verabreichten DNS-Transfektionskomplexen als auch mit intratumoral applizierter DNS mit nachfolgender Elektroporation) zwar eine Expression gefunden werden, allerdings konnten Fehlinterpretationen nicht ausgeschlossen werden. Daher eignet sich diese Methode nur sehr bedingt für den Nachweis von Transfektionseffizienz. Zum Beispiel konnte im Neuro2A-Tumor das mittels Elektroporation verabreichte Gen GFP histologisch überhaupt nicht nachgewiesen werden, im Huh7-Tumor einer SCID-Maus dagegen schon. Da auch in anderen Arbeiten dieselben Probleme beschrieben wurden (92), sollte für den histologischen Nachweis von Genexpression eine andere Methode gewählt werden.

4.2 Etablierung der Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode mit einem hohen Potential für die Gentherapie. Allerdings sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt (73). Die DNS scheint sich an der Zellmembran zu akkumulieren und im Laufe mehrerer Stunden nach der Elektroporation durch Poren in die Zellen zu gelangen. Dort muss die DNS dem Abbau durch Nukleasen auf dem Weg zum Zellkern entkommen (74). Inzwischen haben viele Forschergruppen die Elektroporation etabliert, so dass hier zum Teil auf bereits erzielte Ergebnisse zurückgegriffen werden konnte. Allerdings gibt es viele unterschiedliche Ergebnisse, was an den vielen veränderbaren Parametern, den unterschiedlichen Elektroden (41;75), und den zur Verfügung stehenden verschiedenartigen Elektroporatoren liegt. Die Forschungsgruppe von Durieux et al. (76) verabreichte in 8 Pulsabschnitten jeweils 1000 Pulse im Muskel mit geringer Spannung und sehr kurzer Pulsdauer (10 - 250 μ s). Andere Gruppen verabreichten einen ersten Puls mit sehr hoher Spannung und einen zweiten Puls mit sehr niedriger Spannung (77). Wieder andere Gruppen benutzten eine Spannung von 450 V/cm mit einer Pulsdauer von 25 ms und bis zu 6 Pulsen. Die experimentellen Bedingungen sind im Einzelnen durch das verfügbare Gerät und die vorhandenen Elektroden vorgegeben. Für die Etablierung der Elektroporation stand der ECM830 Elektroporator von BTX, Genetronics zur Verfügung. Da dieses Gerät nicht für die Applikation hochfrequenter Pulse im Mikrosekundenbereich bzw. die aufeinander folgende Applikation von Pulsen unterschiedlicher Spannung ausgelegt ist, wurden Pulse mit konstanter Spannung im Bereich von Millisekunden appliziert. Es wurde für die Etablierung ein Bereich von 200 – 800 V/cm gewählt, da die meisten in der Literatur beschriebenen Anwendungen in diesem Bereich lagen.

Als erstes wurde die Anwendung der Nadel-Elektrode im Muskel und in den CT26-Tumoren in BALB/c-Mäusen eingesetzt. CT26-Tumore zeigten ein sehr aggressives Wachstum, was auch zum Gewichtsverlust der Mäuse führte, auch wenn das Tumolvolumen erst 500 mm³ erreichte. Somit mussten Elektroporationsexperimente bereits an relativ kleinen Tumoren durchgeführt werden. Dabei stellte sich die Handhabung der Nadel-Elektrode in dem solide aufgebauten Gewebe des CT26-Tumor in BALB/c-Mäusen als sehr schwierig heraus. Die relativ dicken Nadeln

mussten in sehr kleine Tumore eingeführt werden, was zu erheblichen Verletzungen des Tumors führte. Auch kam es nach dem Herausziehen der Nadeln zu erheblichen Blutungen. Daher wurde in weiteren Experimenten für die Elektroporation von Tumor die nicht invasive Kaliper-Elektrode bevorzugt. Das therapeutische Fenster bei CT26-Tumoren ist sehr klein und somit wurde dieser in keinem therapeutischen Experiment eingesetzt. Im Muskel war die Nadel-Elektrode problemlos zu handhaben. Es zeigte sich bei der Anzahl der gesendeten Pulse, dass im Muskel mit 2 Pulsen eine wesentlich höhere Expression erreicht wird, als bei 6 Pulsen. Beim Tumor konnte dies nicht gezeigt werden. Der Grund dafür könnte die bei jedem gesendeten Puls zunehmende Schädigung des Gewebes sein, wobei die Muskelzellen in dieser Hinsicht offensichtlich viel empfindlicher sind als die Tumorzellen. Wird die Schädigung der Zellen zu stark, können sie keine Luziferase mehr exprimieren. Daher wurden in weiteren Experimenten zwei Pulse gesendet. Die höchsten Luziferase-Expressionswerte erzielte man im Muskel mit der Kaliper-Elektrode mit 400 V/cm (160 V/Organ) und mit der Nadel-Elektrode mit 160 V/cm (80 V/0,5 cm), einer Pulsdauer von 25 ms, einer Pulsanzahl von zwei bei einer Frequenz von 10 Hz. Für den Tumor erzielte man die besten Ergebnisse mit der Kaliper-Elektrode bei einer Spannung von 320 V/Tumor. Dagegen waren die mit der Nadel-Elektrode erzielten Werte in Versuch eins (Abb. 20) mit 160 V/cm signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, in Versuch zwei (Abb. 21) sind die Werte genauso hoch wie in der Kontrollgruppe. Deshalb lassen sich die erzielten Ergebnisse nicht definitiv bewerten. Bei Verwendung der Kaliper-Elektrode ist zu beachten, dass der Abstand zwischen den Elektroden variiert. Sie passt sich der Größe des Tumors bzw. Muskels an und die Berechnung der applizierten Spannung pro cm (V/cm) ist nur durch Bestimmung der Abstände zwischen den Elektroden möglich. Es wurde aber festgestellt, dass die absolute pro Tumor applizierte Spannung meist einen größeren Einfluss auf das Transfektionsergebnis hat als der Wert V/cm. So ist im CT26-Tumor bei einer BALB/c-Maus bei Benutzung der Kaliper-Elektrode und einer Spannung von 320 V/Tumor eine sehr hohe Expression gefunden worden. Anscheinend wird für Tumorzellen eine höhere Spannung benötigt, um dieselbe Expression zu erreichen wie im Muskel (160 V/Muskel). In der A/J-Maus wurden die besten Ergebnisse mit der Elektroporation im Tumor und Muskel mit folgenden Parametern ermittelt:

Spannung: 350 V/Tumor, 120 V/Muskel; Pulsanzahl: 2; Pulsdauer: 25 ms; Frequenz: 10 Hz; DNS Menge: 50 µg für die Kaliper-Elektrode. Insbesondere im Transfektions-Experiment am Huh7-Tumor in SCID-Mäusen zeigte sich die Abhängigkeit der Expression von der angelegten Spannung pro Tumor. Dabei stellt sich heraus, dass nicht die Größe des Tumors der entscheidende Parameter für die angelegte Spannung ist, sondern die angewendete Spannung pro Tumor (unabhängig von der Tumorgröße). Während sich bei 180 V noch keine Expression zeigte, stieg diese bei 200 V/Tumor langsam an, um bei 270 - 360 V/Tumor das Expressionsmaximum zu erreichen. Würde man hier die angewendete Spannung in V/cm umrechnen, käme man zu keinem schlüssigen Ergebnis hinsichtlich der optimalen Spannung. Geht man mit der Spannung auf 400 V/Tumor, so erreicht man noch höhere Expression, aber bei mehrfacher Anwendung kommt es zu Verbrennungssymptomen der Haut. Dies ist bei 350 V nur sehr selten aufgetreten. Anscheinend ist eine kritische Mindestspannung notwendig, um überhaupt eine Porenbildung in den Zellmembranen zu erreichen (78). Allerdings liegt diese kritische Spannung in diesen Versuchen bei 200 V/Organ und nicht bei 200 V/cm wie von anderen Arbeitsgruppen publiziert (78). Im eingesetzten Spannungsbereich von 0 – 200 V/Tumor findet man nur eine geringe Expression. In Spannungsbereichen von 200 – 400 V/Tumor zeigt sich ein starker Anstieg in der Transgen-Expression, das Maximum wird bei ca. 400 V erreicht. Bei Spannungen deutlich über 400V/Tumor verringert sich nach Literaturangaben die erreichte Transgen-Expression, da durch die hohe Spannung die Zellen zerstört werden und keine Expression mehr möglich ist (79). Ab welcher Spannung es zu Gewebeschädigung kommt, hängt von der Art des Gewebes ab, z. B. sind Muskelzellen empfindlicher als Tumorzellen. Ob und wie man Gewebeschädigung verhindern kann, wird zur Zeit genauer untersucht, allerdings liegen noch keine klaren Ergebnisse vor (80;81). Daher ist die Empfehlung für zukünftige Experimente mit der Elektroporation mittels Kaliper-Elektrode folgende: für Tumore kleiner 5 mm sollte eine Spannung von 300 V/Tumor, und für größere Tumore eine Spannung von 350 V/Tumor bei 2 Pulsen mit einer Pulsdauer von 25 ms benutzt werden.

4.3 Tumor-Gentherapie mit TNF α -Gen

Je nach Art der Applikation des TNF α -Gens zeigte sich ein deutlicher Unterschied im therapeutischen Effekt. Während die systemischen Gentransfersysteme als erfolgreich einzustufen waren, war bei der lokal angewendeten Gentherapie mittels Elektroporation kein Therapieerfolg erreichbar. Bei der systemisch angewendeten Therapie ist allerdings letztlich nicht klar, auf welche Komponenten genau der Therapieerfolg zurückzuführen ist.

Transfektionskomplexe mit TNF α -Gen +/- Doxil[®]:

Sowohl die Behandlung mit Transfektionskomplexen die das Gen für TNF α enthielten alleine als auch mit Doxil[®] alleine zeigten eine Verzögerung des Tumorwachstums in dem ersten Experiment mit dem Gen für TNF +/- Doxil[®] in C57BL/6-Mäusen mit B16F10-Tumoren. Im Gegensatz dazu mussten einige Tiere der Kontrollgruppe bereits an Tag 17 eingeschlüpfert werden. Die Kombination von TNF α -Gentherapie und Doxil[®] ergab einen deutlichen synergistischen Effekt in Bezug auf Verzögerung des Tumorwachstums. Ähnliche synergistische Effekte wurden bereits bei der kombinierten Anwendung von TNF α -Protein und liposomalem Doxorubicin beobachtet (82). Jedoch zeigte sich auch, dass die Kombination von Doxil[®] mit Gentransferkomplexen, die lediglich das für Luziferase kodierende Plasmid enthielten, ebenfalls das Tumorwachstum deutlich verzögern konnte, so dass letztendlich kein Unterschied zwischen den Gruppen „TNF α + Doxil“ und „Luc + Doxil“ gefunden werden konnte. Einerseits ist es denkbar, dass die Expression des Fremdgens Luziferase (von Photinus Pyralis, Arthropode) zu einer Immunreaktion und Zerstörung von Tumorzellen führen kann. Andererseits kann es aber auch möglich sein, dass die Plasmid-DNS selbst für einen immunogenen Effekt verantwortlich ist. Bakterielle DNS enthält im Gegensatz zu eukaryonter DNS so genannte nichtmethylierte CpG-Sequenzen. In der Gruppe von Leaf Huang konnte gezeigt werden, dass die bakteriell produzierte Plasmid-DNS, die entweder mit kationischen Lipiden oder in sog. LPD-Partikel verpackt war, die Expression von Zytokinen hervorruft und Tumoreradikationen bewirken kann (83;84). Was die Häufigkeit der auftretenden Tumornekrosen betrifft, konnte in den mit der Kombinationstherapie Doxil + TNF α -Gen therapierten Tieren in 5 von 8 Mäusen

deutliche Tumornekrosen beobachtet werden, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden (50). Die Nekrosen traten jedoch nicht nur in der Gruppe auf, die das Gen für TNF α erhielt, sondern auch in der Kontrollgruppe, die das Gen für Luziferase injiziert bekam. Zumindest konnte mit diesem Versuch nachgewiesen werden, dass auch Tumore, die für die systemische Gentherapie schwer zugänglich sind, effektiv mit einer Kombinationstherapie behandelt werden können. Ein weiteres Tumormodell, in dem TNF α -Gentherapie erfolgreich angewendet wurde, ist das Neuro2A-Modell in A/J-Mäusen (50). Auch hier sollte untersucht werden, ob es einen synergistischen Effekt von TNF α -Gentherapie und Chemotherapie gibt. Da Luziferase stärker immunogen wirkt als das Gen für β -gal, wurde das Gen für Luziferase mit dem Gen für β -Galaktosidase ausgetauscht. Das Protein β -gal soll nach bisherigen Erfahrungen eine geringere immunaktivierende Wirkung besitzen (R. Kircheis, unveröffentlichte Beobachtungen). Doxil allein zeigte eine verzögernde Wirkung auf das Tumorwachstum, ebenfalls die alleinige TNF α -Gentherapie. Die Kombination aus diesen beiden Therapeutika zeigte eine starke synergistische Wirkung, die eine erhebliche Verzögerung des Tumorwachstums bewirkte. Da die beiden Gruppen TNF α + Doxil und β -gal + Doxil keinen Unterschied zeigten, ist die Wirkung anscheinend unabhängig vom dem eingesetzten Gen. Der Haupteffekt lag bei diesen Experimenten vermutlich wiederum an der immunogenen Wirkung der nichtmethylierten CpG-Sequenzen. Daher wäre es sinnvoll, ein solches Experiment in immundefizienten SCID-Mäusen durchzuführen, da in diesem Mausstamm kein immunstimulierender Effekt der unmethylierten CpG-Sequenzen gefunden wurde (84). Es wurden keine Tumornekrosen beobachtet, wie sie aus vorangegangenen Versuchen bekannt sind (50).

Lokale Anwendung der Gene für die Zytokine TNF α und IFN α :

Die lokale Anwendung von TNF α -Gen mit nachfolgender Elektroporation, zeigte nur eine sehr geringe Reduktion des Tumorwachstums. Die Gründe hierfür könnten beispielsweise in der Art der Applikation oder in den Eigenschaften von TNF α liegen. Wenn man das Gen für TNF α lokal intratumoral appliziert, gelangt das Gen in den meisten Fällen direkt in das Tumorgewebe und nicht in die Blutgefäße. TNF α zeigt seine Wirkung vor allem in der Zytotoxizität auf Endothelzellen und nicht so stark auf Tumorzellen. Da das TNF α erst gar nicht zu den Blutgefäßen gelangt, kann es somit

seine volle Wirkung nicht entfalten. Da die Tumore bei der ersten Behandlung doch schon eine Größe von ca. 5 mm in einer Richtung hatten, sind die Tumore für diese Art von Behandlung bereits zu groß. Lokal wurde an der Stelle der Applikation am nächsten Tag ein Rückgang der Tumorgöße gesehen, aber eben nur begrenzt auf den Bereich in dem das Gen appliziert wurde. Es ist daher sinnvoller, das TNF α -Gen entweder systemisch über das Blutgefäßsystem anzuwenden, oder lokal bei sehr kleinen Tumoren mittels der Elektroporation. Dabei wird allerdings die Handhabung der Elektroporation die Grenzen des Machbaren setzen. Ein weiterer Grund für die nur lokal begrenzte Wirkung von TNF α kann die relativ hohe Expression an TNF α sein, die durch Elektroporation bewirkt wird (siehe auch Expressionsstudien mit Luziferase-Gen und Elektroporation). Durch hohe Konzentrationen an TNF α kann die Expression von löslichen TNF α -Rezeptoren bewirkt werden, die an das Zytokin binden und es somit inaktivieren (85;86).

Die kombinierte Anwendung von IFN α -Gen (intratumoral mit Elektroporation) und TNF α -Gen (systemisch mit Polyplexen) zeigte weder einen additiven noch synergistischen Effekt. Es zeigte sich in den Versuchen eine Verzögerung des Tumorstwachstums, die aber eher auf die systemische Anwendung des Gens für TNF α zurückzuführen war, da zwischen beiden behandelten Gruppen („TNF α i.v.“ und „TNF α i.v. + EP mit IFN α “) keine deutlichen Unterschiede feststellbar waren. Die geringe Verzögerung des Tumorstwachstums kann auch durch die immunogene Wirkung von Plasmid-DNS alleine oder durch die nachfolgende Elektroporation hervorgerufen worden sein, da das Immunsystem durch beide Anwendungen bekanntlich aktiviert werden kann (87). In der Arbeit von Sun et al. (88) wurde eine erhebliche Tumorreduktion bei kombinierter Anwendung dieser beiden Zytokine mittels „Gene Gun“ im Renca-Tumormodell gezeigt. Dies konnte in dem Experiment in der vorliegenden Arbeit mit dem Neuro2A-Tumormodell nicht gezeigt werden. Auch die in der Literatur (53) beschriebene Tumorreduktion von 50% durch intratumorale Applikation von IFN α -Gen mit nachfolgender Elektroporation konnte hier nicht beobachtet werden. Auch in der Arbeit von Li et al. (89), welche ähnliche Parameter für die Elektroporation benutzten wie in dieser Arbeit, konnten die Ergebnisse nicht wiederholt werden. Allerdings wurde in beiden Fällen ein anderer Mausstamm mit einem anderen Tumormodell verwendet. Die direkte

immunstimulierende Wirkung der Plasmid-DNS wurde in den erwähnten Arbeiten jedoch nicht dargestellt. Yasuda et al. beschrieben bereits, dass es bei lokaler Injektion von unverpackter DNS zu einer Aktivierung des Immunsystems durch Entzündungsvorgänge kommt (90). Ist ein Entzündungsvorgang im Tumor vorhanden, könnten die antitumoralen Effekte auch dadurch bedingt sein.

4.4 Anwendung des GDEPT-Konzepts

Für die Kombination mit P450-Gentherapie wurde ein neuartiges, wöchentliches Applikationsschema für CPA gewählt (91). Im Gegensatz zum Standard-Hochdosisschema (annähernd maximal tolerierbare CPA-Dosis an zwei aufeinander folgenden Tagen) führte dieses Applikationsschema zu nur geringen Nebenwirkungen (Fellverlust) und zeigte zusätzlich eine antiangiogenetische Wirkung, die sich in verstärkter Apoptose von Endothelzellen äußert. Jounaidi et al. konnten zeigen, dass damit erfolgreich diese Tumorzellen zerstört werden konnten, welche das Gen für P450 überexprimierten (58). Die CPA-Titration zeigte, dass Huh7-Tumore bereits bei geringen Dosen an CPA (50 – 75 mg/kg) mit verzögertem Wachstum reagieren, es jedoch bei diesen Konzentrationen zu keiner Tumoreradikation kommt. Der Versuchsbeginn des nachfolgenden Elektroporationsexperiments war Tag 10, an dem die Tumore bereits für eine therapeutische Behandlung sehr groß (150 mm³) waren. Obwohl die Behandlungsgruppe „CPA“ keine Verzögerung des Tumorwachstums bewirkte, war in der Gruppe „EP + P450“ doch eine geringe Verzögerung des Tumorwachstums zu beobachten. Somit muss man feststellen, dass auch die Elektroporation + intratumorale Injektion von Plasmid einen, wenn auch geringen Einfluss auf das Tumorwachstum ausübt. Mögliche Erklärungen sind eine eventuell auftretende Gewebeschädigung durch die Elektroporation sowie unspezifische Effekte der Plasmid-DNS. Nichtsdestotrotz wurde mit der Kombination von Elektroporation mit P450-Gen und CPA-Behandlung die deutlichste Verzögerung des Tumorwachstums erreicht. Im anschließenden Versuch wurde die Behandlung bereits am Tag 8 begonnen, um ein größeres therapeutische Fenster zu schaffen und damit einen deutlicheren therapeutischen Effekt zu erzielen. In diesem Experiment (Abbildung 37) zeigte „CPA“, wie bereits in den Titrationsversuchen, eine leichte

Wachstumsverzögerung, die Kombination von Elektroporation mit dem P450-Gen und CPA-Behandlung eine sehr deutliche Verzögerung des Tumorwachstums. Da aber auch die Kombination von Elektroporation mit dem Kontrollgen (β -gal) und CPA einen Verzögerungseffekt zeigte, ist ein additiver Effekt von Elektroporation, intratumoraler Injektion von Plasmid-DNS und der durch körpereigene Enzyme aktivierten CPA-Wirkung anzunehmen. Wie sich in weiteren in vitro Versuchen herausstellte, besitzen Huh7 Tumorzellen eine relativ hohe intrinsische enzymatische Aktivität zur Aktivierung von CPA (Michael Günther & Manfred Ogris, Manuskript in Vorbereitung). Dies kann auch die Sensitivität der Huh7-Tumore auf CPA-Behandlung sowie den nur mäßig ausgeprägten Verstärkungseffekt der gewählten GDEPT-Kombination in diesem Tumormodell erklären. Ein weiterer Grund für den gering ausgeprägten GDEPT-Effekt kann zumindest im ersten Versuch der späte Beginn der Therapie sein. Die Applikation des Gens erfolgte lokal nur sehr begrenzt und kann ab einer bestimmten Tumorgröße nur noch kleine Teile des Tumors erreichen. Der Tumor wächst an anderer Stelle weiter. Daher ist es wichtig, bei der lokalen Therapie mit Elektroporation zu beginnen, wenn die Tumore nicht größer als 4 mm in einer Messrichtung sind.

Die Anwendung der P450/CPA-GDEPT-Therapie brachte in A/J-Mäusen mit Neuro2A-Tumoren viel versprechende Ergebnisse. Aus bereits vorliegenden Ergebnissen war bekannt, dass eine Dosis von 75 mg/kg CPA eine mäßige Verzögerung des Tumorwachstums bewirkt und somit für eine Kombinationstherapie mit dem Gen, kodierend für das P450 Enzym, geeignet ist (Lionel Wightman & Ernst Wagner, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Offensichtlich sind Neuro2A-Tumore sehr empfindlich gegenüber dem CPA alleine und der therapeutische Effekt konnte mit der lokalen Applikation des Cytochrom-P450-Gens und nachfolgender Elektroporation noch deutlich verstärkt werden. Die Tumorgröße in der therapeutischen Gruppe konnte mit dieser Therapieform selbst nach 70 Tagen noch auf der Anfangsgröße bei Therapiebeginn gehalten werden. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe bereits an Tag 20 ein so aggressives Tumorwachstum, dass die Tiere eingeschläfert werden mussten. Hier wurde eine Therapieform gefunden, die große Wirkung zeigte und mit nur wenigen Nebenwirkungen verbunden war. Auch die systemische Anwendung von P450-Gen mit Transfektionskomplexen zeigte viel

versprechende Ergebnisse. Dabei wurde die in Transfektionsversuchen mit Reporter gen ermittelte effizienteste Formulierung (Tf-PEI25br/PEI25lin-mel) eingesetzt. Auch mit dem systemischen Gentransfer konnte ein Wachstumsstopp der Tumore bewirkt werden. Leider musste diese Behandlungsgruppe aufgrund der an der Injektionsstelle aufgetretenen Nekrosen nach der dritten intravenösen Applikation vorzeitig eingeschläfert werden. Eine direkte Toxizität von Melittin auf das Gewebe ist nicht auszuschließen. Da aber die Nekrosen erst nach abwechselnder Applikation von Gentransferkomplexen mit P450-Plasmid und CPA auftraten, kann auch die hohe Transfektionseffizienz der Komplexe an der Applikationsstelle dafür verantwortlich sein. Aus früheren Arbeiten ist einerseits bekannt, dass die durch Polyplexe hervorgerufene Reporter genexpression an der Injektionsstelle oft erheblich ist (66). Zusätzlich können Melittin-Polyplexe sehr effizient Endothelzellen transfizieren (37). Die Nekrosen könnten somit dadurch hervorgerufen worden sein, dass lokal Endothelzellen mit P450-Gen transfiziert und diese nach Applikation von CPA zerstört wurden. Um die Ursache dieser Nekrosen zu ergründen, sollte in einem Kontrollversuch wieder Melittin-Polyplexe in Kombination mit CPA eingesetzt werden, allerdings sollte das therapeutische Gen, in dem Fall das für P450 kodierende Plasmid mit einem leeren, nicht kodierenden Plasmid ausgetauscht werden. Damit kann sichergestellt werden, ob die toxische Komponente von Melittin diese Nekrosen verursacht, oder ob es wirklich die hohe Transfektionseffizienz ist.

Beide Therapieformen, sowohl der systemische Gentransfer mittels Polyplexen als auch der lokale Gentransfer mittels Elektroporation, zeigten einen ähnlichen Therapieerfolg. Daher wäre es sinnvoll in weiteren Versuchen die Polyplexe bzw. deren Applikation dahingehend zu optimieren, die lokale Expression von P450 an der Injektionsstelle zu verringern und die P450-Expression im Tumor ähnlich effizient zu halten. Außerdem sollte diese Therapieform auch in anderen Tumor-Mausmodellen angewendet werden, um eine Vergleichbarkeit und eine generelle Anwendbarkeit zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Nichtvirale Gentransfersysteme haben im Vergleich zu viralen Vektoren den Vorteil, dass sie sicher und kaum immunogen sind. Diese Eigenschaften lassen sie als ausgezeichnete Kandidaten für den Einsatz als Vektoren in der Gentherapie erscheinen. Ihr größter Nachteil, die geringe Effizienz, kann dahingehend verbessert werden, indem man für den systemischen Gentransfer zielgerichtete Vektoren mit erhöhter Gewebespezifität und effizienter intrazellulärer Freisetzung entwickelt.

Die intravenöse Applikation von PEI22lin/DNS-Komplexen bewirkte eine hohe Genexpression in der Lunge, aber auch eine nicht unerhebliche Toxizität. Diesen Befund kann man durch die positive Ladung der Komplexe und einen Überschuss an freiem PEI erklären, der eine nachfolgende Aggregation mit Erythrozyten bewirkt. Wurden dagegen die PEI22lin-Komplexe durch Gelfiltration gereinigt, verringerte sich die Toxizität, dafür sank aber auch die Expressionseffizienz. Applizierte man gelfiltrierte PEI22lin-Komplexe tumortragenden Mäusen, kam es im Tumor im Vergleich zu nicht gelfiltrierten Komplexen sogar zu einer geringfügigen Erhöhung der Expression.

PEI22lin-Komplexe, deren positive Oberflächenladung mit Transferrin abgeschirmt wurde, zeigten keine erkennbare Toxizität mehr, dafür eine im Tumor massiv erhöhte und in der Lunge und anderen Organen erheblich reduzierte Genexpression im Neuro2A-Neuroblastom-Tumormodell der A/J-Mäusen, allerdings konnte diese Expressionsergebnisse in anderen Tumormodellen wie dem B16F10-Melanom-Tumormodell der C57BL/6-Maus und im CT26-Kolonkarzinom-Tumormodell der BALB/c-Maus nicht gefunden werden. Um die intrazelluläre Effektivität der Vektoren zu erhöhen, wurde an die vorher genannten, zielgerichteten Komplexe das endosomolytisch aktive Peptid Melittin gekoppelt. Damit konnte eine weitere Steigerung der Genexpression im Tumor im Neuro2A-Tumormodell der A/J-Maus erreicht werden.

Für den lokalen Gentransfer stellte sich die Elektroporation als eine sehr einfach zu handhabende Methode dar, um hohe Genexpression am elektroporierten Gewebe zu

erreichen. Während sich die invasive Nadel-Elektrode im Muskel als sehr praktikabel erwies, war für die Applikation im Tumor die nichtinvasive Kaliper-Elektrode besser geeignet. Der wichtigste Parameter für eine effektive Expression war die bei der Elektroporation angelegte Spannung. Die intratumorale Anwendung der Elektroporation mit dem therapeutischen Gen des Zytokins TNF α war wenig erfolgreich. Dagegen zeigte systemischer Gentransfer mit TNF α -Gen enthaltenden Transfektionskomplexen in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxil[®] eine deutliche synergistische Wirkung, die zu einer massiven Verzögerung des Tumorwachstums und zum Teil zur vollständigen Tumoreradikation führte.

Das Enzym Cytochrom-P450 metabolisiert das untoxische Chemotherapeutikum Cyclophosphamid (CPA) in seine aktive zytotoxische Form. In einem neuartigen, antiangiogenetischen Applikationsschema für CPA konnte in Kombination mit intratumoralen Gentransfer von P450 mittels Elektroporation im humanen Hepatozellulären-Karzinommodell Huh7 in SCID-Mäusen eine erhebliche Verzögerung des Tumorwachstums bewirkt werden. Im syngenem Neuro2A-Tumormodell in der A/J-Maus konnte mit dieser Methode sogar bei zwei Tieren eine vollständige Tumoreradikation erreicht werden. Auch bei systemisch applizierten Melittin-Transfektionskomplexen mit P450-Gen konnte in Kombination mit CPA in diesem Modell eine starke Wachstumsverzögerung des Tumors erreicht werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt neue Konzepte für eine effektive Krebstherapie auf, bei der durch die Kombination von Chemotherapeutika und nichtviraler Gentherapie deutliche synergistische Effekte *in vivo* gezeigt werden. Um die Effizienz dieser vielversprechenden therapeutischen Strategien zu steigern, bedarf es der Weiterentwicklung von nicht-viralen Gentransfersystemen mit höherer Gewebespezifität bei gleichzeitig verringerter Toxizität.

6 Summary

Non-viral gene transfer systems for tumor therapy in various mouse models

The advantages of non-viral gene transfer systems are safety and low immunogenicity, therefore they are well suited for use as vectors in gene therapy. The main disadvantage, namely their low gene-transfer-efficiency, can be improved through the development of systemic gene transfer systems using targeted vectors with high specificity and gene transfer efficiency.

The intravenous application of PEI22lin/DNS complexes leads to a high gene expression in the lung, but with high toxicity. This observation can be explained by the positive surface charge of the DNS complexes and the uncomplexed free PEI, which leads to aggregation of erythrocytes. DNS complexes can be isolated from free uncomplexed PEI by gel filtration. The systemic application of gel filtrated PEI22lin complexes to non-tumor bearing mice resulted in reduced toxicity however there was a decreased in gene expression compared to non-filtrated complexes. The same experiment was performed on tumor bearing mice and again reduced toxicity was observed and interestingly slightly higher gene expression found in the tumor compared to the non-filtrated complexes.

Shielding the positive surface charge of the PEI22lin complexes by transferrin led to increased gene expression in the tumor with reduced expression in the lung and other organs. The improved tumor targeted gene expression was associated with reduced systemic toxicity. Tumor targeted gene expression appears to be dependent on the tumor model as this observation was only found in neuro2A neuroblastoma tumor model in A/J mice and not in B16F10 melanoma tumor models of C57BL/6 mice and CT26 colon carcinoma tumor models of BALB/c mice. To enhance the intracellular efficiency of the vectors, the endosomolytic active peptide melittin was incorporated into the transferrin targeted complexes. This led to a further increase in gene expression in the Neuro2A tumor models in A/J mice.

For the local gene transfer, electroporation proved to be an easy to handle method to obtain a high gene expression in tissue. The non-invasive kaliper electrode was suitable for gene transfer to both muscle and tumor. The applied voltage showed to be the most important parameter in expression. The use of electroporation for intratumoral transfer of the therapeutic gene encoding for the cytokine TNF α was unsuccessful. However, systemic application of the TNF- α gene in transferrin targeted complexes in combination with the intraperitoneal application of the chemotherapeutic Doxil[®] showed a clear synergistic effect. A significant delay in the tumor growth and in some cases a complete regression of the tumor was observed.

The enzyme cytochrome P450 metabolizes the non toxic prodrug cyclophosphamide (CPA) into the cytotoxic drug. Electroporation of the cytochrome P450 gene into the tumor lead to its localized protein expression. When followed by the intraperitoneal application of CPA, a significant delay in the tumor growth of the human hepatocellular carcinoma Huh7 was observed in SCID mice. When applied to the Neuro2A tumor model in A/J mice, this application scheme showed a complete tumor regression in two animals. Furthermore the systemic application of the P450 gene in transferrin targeted complexes containing melittin in combination with CPA led to a strong delay in the tumor growth.

In summary, this work describes a new anti-cancer strategy using the combination of chemotherapeutics and non-viral gene delivery resulting in a synergistic therapeutic effect *in vivo*. This promising strategy will be more effective with the improvement of non-viral gene delivery systems which have better targeted gene expression with lower toxicity.

7 Referenzen

1. Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A., and Hoffman, S. L. (1998), Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNS vaccine, *Science* 282, 476-480
2. McCormick, F. (2001), Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?, *Nat.Rev.Cancer* 1, 130-141
3. Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., and Edelstein, R. M. (2004), Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview, *J Gene Med* 6, 597-602
4. Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., and Greenblatt, JJ. (1995), T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years, *Science* 270, 475-480
5. Hacein-Bey, S., Yates, F., de Villartay, J. P., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002), Gene therapy of severe combined immunodeficiencies: from mice to humans, *Neth.J Med* 60, 299-301
6. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint, B. G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003), LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science* 302, 415-419
7. Curiel, D. T. (1999), Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 886, 158-171
8. Kanerva, A. and Hemminki, A. (2004), Modified adenoviruses for cancer gene therapy, *Int.J Cancer* 110, 475-480
9. Fisher, K. D., Stallwood, Y., Green, N. K., Ulbrich, K., Mautner, V., and Seymour, L. W. (2001), Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies, *Gene Ther* 8, 341-348

10. Ponnazhagan, S., Curiel, D. T., Shaw, D. R., Alvarez, R. D., and Siegal, G. P. (2001), Adeno-associated virus for cancer gene therapy, *Cancer Res.* 61, 6313-6321
11. Pachori, A. S., Melo, L. G., Zhang, L., Loda, M., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (2004), Potential for germ line transmission after intramyocardial gene delivery by adeno-associated virus, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 313, 528-533
12. Mathiesen, I. (1999), Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo, *Gene Ther* 6, 508-514
13. Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S. W., Chen, M., Leung, L., Otten, G. R., Thudium, K., Selby, M. J., and Ulmer, J. B. (2000), Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo, *J Immunol* 164, 4635-4640
14. Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, M., and Fukui, H. (2000), Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun, *Gene Ther* 7, 1132-1136
15. Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B., and Plank, C. (2002), Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther* 9, 102-109
16. Zeira, E., Manevitch, A., Khatchatourians, A., Pappo, O., Hyam, E., Darash-Yahana, M., Tavor, E., Honigman, A., Lewis, A., and Galun, E. (2003), Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression, *Mol Ther* 8, 342-350
17. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987), Lipofection: A highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417
18. Kircheis, R., Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rossler, V., Kursu, M., and Wagner, E. (2001), Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application, *Gene Ther* 8, 28-40
19. Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P., and Behr, J. P. (2001), Towards synthetic viruses, *Adv Drug Deliv Rev.* 52, 245-253
20. De Smedt, S. C., Demeester, J., and Hennink, W. E. (2000), Cationic polymer based gene delivery systems, *Pharm Res.* 17, 113-126

21. Brown, M. D., Schatzlein, A. G., and Uchegbu, I. F. (2001), Gene delivery with synthetic (non viral) carriers, *Int J Pharm* 229, 1-21
22. Dunlap, D. D., Maggi, A., Soria, M. R., and Monaco, L. (1997), Nanoscopic structure of DNS condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Res* 25, 3095-101
23. Morimoto, K., Nishikawa, M., Kawakami, S., Nakano, T., Hattori, Y., Fumoto, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2003), Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver, *Mol Ther* 7, 254-261
24. Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. J., and Wagner, E. (1996), Activation of the complement system by synthetic DNS complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery, *Hum Gene Ther* 7, 1437-1446
25. Boussif, O., Zanta, M. A., and Behr, J. P. (1996), Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold, *Gene Ther* 3, 1074-1080
26. Abdallah, B., Hassan, A., Benoist, C., Goula, D., Behr, J. P., and Demeneix, B. A. (1996), A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine, *Hum Gene Ther* 7, 1947-1954
27. Goula, D., Benoist, D., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., and Demeneix, B. A. (1998), Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung, *Gene Ther.* 5, 1291-1295
28. Zou, S. M., Erbacher, P., Remy, J. S., and Behr, J. P. (2000), Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse, *J. Gene Med.* 2, 128-134
29. Finsinger, D., Remy, J. S., Erbacher, P., Koch, C., and Plank, C. (2000), Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery, *Gene Ther.* 7, 1183-1192
30. Clamme, J. P., Azoulay, J., and Mely, Y. (2003), Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNS Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophys.J.* 84, 1960-1968
31. Chollet, P., Favrot, M. C., Hurbin, A., and Coll, J. L. (2002), Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNS complexes, *J Gene Med.* 4, 84-91
32. Regnstrom, K., Ragnarsson, E. G., Koping-Hoggard, M., Torstensson, E., Nyblom, H., and Artursson, P. (2003), PEI - a potent, but not harmless,

- mucosal immuno-stimulator of mixed T-helper cell response and FasL-mediated cell death in mice, *Gene Ther* 10, 1575-1583
33. Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., and Ogris, M. (2004), Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer, *J Gene Med* 6, 1102-1111
 34. Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., and Birnstiel, M. L. (1992), Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNS complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 7934-7938
 35. Kursa, M., Walker, G. F., Roessler, V., Ogris, M., Roedl, W., Kircheis, R., and Wagner, E. (2003), Novel Shielded Transferrin-Polyethylene Glycol-Polyethylenimine/DNS Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer, *Bioconjug.Chem.* 14, 222-231
 36. Boeckle, S., Wagner, E., and Ogris, M. (2002) Transmembrane Targeting of DNS with Membrane Active Peptides. In *Biomedical Aspects of Drug Targeting*, Muzykantov, V. R. and Torchilin, V. P., editors,. Kluwer Academic Publishers
 37. Ogris, M., Carlisle, R. C., Bettinger, T., and Seymour, L. W. (2001), Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors, *J Biol Chem* 276, 47550-47555
 38. Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J. J., Gilbert, R. A., Heller, R., Jaroszeski, M. J., and Malone, R. W. (2000), Theory and in vivo application of electroporative gene delivery, *Mol Ther* 2, 178-187
 39. Satkuskas, S., Bureau, M. F., Puc, M., Mahfoudi, A., Scherman, D., Miklavcic, D., and Mir, L. M. (2002), Mechanisms of in vivo DNS electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNS electrophoresis, *Mol Ther* 5, 133-140
 40. Gehl, J., Sorensen, T. H., Nielsen, K., Raskmark, P., Nielsen, S. L., Skovsgaard, T., and Mir, L. M. (1999), In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution, *Biochim.Biophys.Acta* 1428, 233-240
 41. Zhang, L., Nolan, E., Kreitschitz, S., and Rabussay, D. P. (2002), Enhanced delivery of naked DNS to the skin by non-invasive in vivo electroporation, *Biochim.Biophys.Acta* 1572, 1-9
 42. Glasspool-Malone, J., Somiari, S., Drabick, J. J., and Malone, R. W. (2000), Efficient nonviral cutaneous transfection, *Mol Ther* 2, 140-146

43. Babiuk, S., Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M., Storms, M., Rabussay, D., Widera, G., and Babiuk, L. A. (2002), Electroporation improves the efficacy of DNS vaccines in large animals, *Vaccine* 20, 3399-3408
44. Drabick, J. J., Glasspool-Malone, J., King, A., and Malone, R. W. (2001), Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization, *Mol Ther* 3, 249-255
45. Heller, R., Jaroszeski, M. J., Glass, L. F., Messina, J. L., Rapaport, D. P., DeConti, R. C., Fenske, N. A., Gilbert, R. A., Mir, L. M., and Reintgen, D. S. (1996), Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy, *Cancer* 77, 964-971
46. Heller, R., Gilbert, R., and Jaroszeski, M. J. (1999), Clinical applications of electrochemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35, 119-129
47. Gothelf, A., Mir, L. M., and Gehl, J. (2003), Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation, *Cancer Treat. Rev.* 29, 371-387
48. Glass, L. F., Fenske, N. A., Jaroszeski, M., Perrott, R., Harvey, D. T., Reintgen, D. S., and Heller, R. (1996), Bleomycin-mediated electrochemotherapy of basal cell carcinoma, *J Am. Acad. Dermatol.* 34, 82-86
49. Glass, L. F., Pepine, M. L., Fenske, N. A., Jaroszeski, M., Reintgen, D. S., and Heller, R. (1996), Bleomycin-mediated electrochemotherapy of metastatic melanoma, *Arch. Dermatol.* 132, 1353-1357
50. Kircheis, R., Ostermann, E., Wolschek, M. F., Lichtenberger, C., Magin-Lachmann, C., Wightman, L., Kurs, M., and Wagner, E. (2002), Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- α induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity, *Cancer Gene Ther* 9, 673-680
51. Sanlioglu, A. D., Aydin, C., Bozcuk, H., Terzioglu, E., and Sanlioglu, S. (2004), Fundamental principals of tumor necrosis factor- α gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma, *Lung Cancer* 44, 199-211
52. Ten Hagen, T. L., Van Der Veen, A. H., Nooijen, P. T., Van Tiel, S. T., Seynhaeve, A. L., and Eggermont, A. M. (2000), Low-dose tumor necrosis factor- α augments antitumor activity of stealth liposomal doxorubicin (DOXIL) in soft tissue sarcoma-bearing rats, *Int. J. Cancer* 87, 829-837
53. Li, S., Xia, X., Zhang, X., and Suen, J. (2002), Regression of tumors by IFN- α electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array, *Gene Ther* 9, 390-397

54. Zhang, G. H., Tan, X. F., Shen, D., Zhao, S. Y., Shi, Y. L., Jin, C. K., Sun, W. G., Guo, Y. H., Chen, K. H., and Tang, J. (2003), Gene expression and antitumor effect following im electroporation delivery of human interferon alpha 2 gene, *Acta Pharmacol.Sin.* 24, 891-896
55. Baldwin, A., Huang, Z., Jounaidi, Y., and Waxman, D. J. (2003), Identification of novel enzyme–prodrug combinations for use in cytochrome P450-based gene therapy for cancer, *Arch Biochem Biophys* 409, 197-203
56. Chen, L. and Waxman, D. J. (2002), Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer, *Curr.Pharm.Des* 8, 1405-1416
57. Chiocca, E. A. and Waxman, D. J. (2004) Cytochrome P450-Based Gene Therapies for Cancer. In *Suicide Gene Therapy, Methods in Molecular Medicine*, Springer, C. J., editor,. Humana Press
58. Jounaidi, Y. and Waxman, D. J. (2001), Frequent, moderate-dose cyclophosphamide administration improves the efficacy of cytochrome P-450/cytochrome P-450 reductase-based cancer gene therapy, *Cancer Res* 61, 4437-44
59. Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Mechtler, K., and Wagner, E. (1992), Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNS complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand, *Bioconjug Chem* 3, 533-539
60. MacGregor, G. R. and Caskey, C. T. (1989), Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 17, 2365
61. Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., and Quaglia, F. (2003), Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 31, 143-149
62. Brattain, M. G., Strobel-Stevens, J., Fine, D., Webb, M., and Sarrif, A. M. (1980), Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties, *Cancer Res.* 40, 2142-2146
63. Olmsted, J. B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., and Rosenbaum, J. (1970), Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 65, 129-136
64. Fidler, I. J. (1973), Selection of successive tumour lines for metastasis, *Nat.New Biol.* 242, 148-149

65. Bosma, G. C., Custer, R. P., and Bosma, M. J. (1983), A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse, *Nature* 301, 527-530
66. Kircheis, R., Schuller, S., Brunner, S., Heider, K., Zauner, W., and Wagner, E. (1999), Polycation-Based DNS Complexes for Tumor-Targeted Gene Delivery *in vivo*, *J Gene Med* 1, 111-120
67. Verbeke, G. and Molenberghs, G. (1997) *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*, 1st Ed., Springer,
68. Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., and Wagner, E. (2001), Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo*, *J.Gene Med.* 3, 362-372
69. Alvarez, R. D. and Curiel, D. T. (1997), A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated delivery of an anti-erbB-2 single-chain (sFv) antibody gene for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients, *Hum Gene Ther* 8, 229-42
70. Goula, D., Becker, N., Lemkine, G. F., Normandie, P., Rodrigues, J., Mantero, S., Levi, G., and Demeneix, B. A. (2000), Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNS complexes, *Gene Ther.* 7, 499-504
71. Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., and Wagner, E. (1999), PEGylated DNS/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther* 6, 595-605
72. Smrekar, B., Wightman, L., Wolschek, M. F., Lichtenberger, C., Ruzicka, R., Ogris, M., Rodl, W., Kursa, M., Wagner, E., and Kircheis, R. (2003), Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors *in vivo*, *Gene Ther.* 10, 1079-1088
73. Bigey, P., Bureau, M. F., and Scherman, D. (2002), *In vivo* plasmid DNS electrotransfer, *Curr.Opin.Biotechnol.* 13, 443-447
74. Bureau, M. F., Naimi, S., Torero, I. R., Seguin, J., Georger, C., Arnould, E., Maton, L., Blanche, F., Delaere, P., and Scherman, D. (2004), Intramuscular plasmid DNS electrotransfer: biodistribution and degradation, *Biochim.Biophys Acta* 1676, 138-148
75. Liu, F. and Huang, L. (2002), A syringe electrode device for simultaneous injection of DNS and electrotransfer, *Mol Ther* 5, 323-328
76. Durieux, A. C., Bonnefoy, R., Manissolle, C., and Freyssenet, D. (2002), High-efficiency gene electrotransfer into skeletal muscle: description and

- physiological applicability of a new pulse generator, *Biochem Biophys Res. Commun.* 296, 443-450
77. Bureau, M. F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L. M., and Scherman, D. (2000), Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNS electrotransfer, *Biochim. Biophys Acta* 1474, 353-359
 78. Wells, D. J. (2004), Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods, *Gene Ther* 11, 1363-1369
 79. Muramatsu, T., Nakamura, A., and Park, H. M. (1998), In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review), *Int. J Mol Med* 1, 55-62
 80. Durieux, A. C., Bonnefoy, R., Busso, T., and Freyssenet, D. (2004), In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNS on the occurrence and extent of muscle damage, *J Gene Med* 6, 809-816
 81. McMahon, J. M., Signori, E., Wells, K. E., Fazio, V. M., and Wells, D. J. (2001), Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage, *Gene Ther* 8, 1264-1270
 82. Brouckaert, P., Takahashi, N., Van Tiel, S. T., Hostens, J., Eggermont, A. M., Seynhaeve, A. L., Fiers, W., and Ten Hagen, T. L. (2004), Tumor necrosis factor-alpha augmented tumor response in B16BL6 melanoma-bearing mice treated with stealth liposomal doxorubicin (Doxil) correlates with altered Doxil pharmacokinetics, *Int. J Cancer* 109, 442-448
 83. Whitmore, M. M., Li, S., Falo, L., Jr., and Huang, L. (2001), Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses, *Cancer Immunol Immunother* 50, 503-514
 84. Whitmore, M., Li, S., and Huang, L. (1999), LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth, *Gene Ther* 6, 1867-1875
 85. Curnis, F., Sacchi, A., and Corti, A. (2002), Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration, *J Clin. Invest* 110, 475-482
 86. Xanthoulea, S., Pasparakis, M., Kousteni, S., Brakebusch, C., Wallach, D., Bauer, J., Lassmann, H., and Kollias, G. (2004), Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases, *J Exp. Med* 200, 367-376

87. Heller, L. C. and Coppola, D. (2002), Electrically mediated delivery of vector plasmid DNS elicits an antitumor effect, *Gene Ther* 9, 1321-1325
88. Sun, W. H., Burkholder, J. K., Sun, J., Culp, J., Turner, J., Lu, X. G., Pugh, T. D., Ershler, W. B., and Yang, N. S. (1995), In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 2889-2893
89. Li, S., Zhang, X., Xia, X., Zhou, L., Breau, R., Suen, J., and Hanna, E. (2001), Intramuscular electroporation delivery of IFN-alpha gene therapy for inhibition of tumor growth located at a distant site, *Gene Ther* 8, 400-407
90. Yasuda, K., Ogawa, Y., Yamane, I., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2005), Macrophage activation by a DNS/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways, *J Leukoc.Biol.* 77, 71-79
91. Browder, T., Butterfield, C. E., Kraling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (2000), Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer, *Cancer Res.* 60, 1878-1886
92. Schillinger, U. (2003), *Verschiedene Applikationsformen nicht-viraler Genvektoren im Tiermodell unter besonderer Berücksichtigung des lokalen Gentransfers*. Hieronymus, München. ISBN: 3-89791-277-5

8 Abkürzungsverzeichnis

CPA	Cyclophosphamid
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
DAPI	4',6'-Diamindino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMEM-Medium	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
FKS	Fötale Kälberserum
GDEPT	gene-directed enzym/prodrug therapy
GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein
HBG	HEPES-gepufferte Glucose
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanesulfonsäure)
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
IFN α	Interferon alpha
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LPD	Lipid-Polykation-DNS
Luc	Luziferase
Mel	Melittin
mRNS	messenger Ribonukleinsäure

n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
N/P	Molares Verhältnis von PEI-Stickstoff zu DNS-Phosphat
p	Plasmid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PEI22lin	lineares Polyethylenimin mit Molekulargewicht 22kDa
PEI25br	verzweigtes Polyethylenimin mit Molekulargewicht 25kDa
PEI25lin	lineares Polyethylenimin mit Molekulargewicht 25kDa
P450	Cytochrom P450
CMV	Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer
RES	Retikulo-Endotheliales-System
RLU	Relative Lichteinheiten
Tf	Transferrin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
SCID	severe combined immunodeficiency
siRNS	small interfering Ribonkleinsäure
SPDP	<i>N</i> -Succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]-propionamid
w/v	Gewicht/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
β -gal	beta-Galaktosidase

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
I.E.	Internationale Einheiten
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromolar
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
sec	Sekunde
V	Volt
%	Prozent

9 Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. vet. E. Wolf danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Prof. Ernst Wagner für die Überlassung des Themas, die gute Atmosphäre, und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Des weiteren möchte ich mich bei Dr. Manfred Ogris für die Betreuung und Unterstützung hinsichtlich der Experimente und der Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. Hans Fritz möchte ich mich ganz herzlich für die Korrektur dieses Manuskripts bedanken.

Für die Einführung in die Versuchstierkunde und die Vermittlung dieser Doktorarbeit, möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. vet. med. Ulrike Schillinger und Dr. vet. med. Christiane Michaelis bedanken.

Für die statistische Beratung und Auswertung möchte ich Prof. Dr. H. Küchenhoff ein schönes Dankeschön sagen.

Für die Hilfe bei Computerproblemen möchte ich Dr. Sabine Böckle von ganzem Herzen bedanken, da sie mir jederzeit und mit viel Geduld zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Carsten Culmsee für die Beratung hinsichtlich der Tierversuche, und für die Verbesserungsvorschläge zum Manuskript bedanken.

Ich möchte Julia Fahrmeir und Carolin Fella für ihre Verbesserungsvorschläge zum Manuskript und für die gute Unterstützung von ganzem Herzen bedanken.

Ein ganz tolles Dankeschön möchte ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre Unterstützung und für die sehr gute Stimmung sagen.

Ganz lieb danken will ich meinem Freund Marc Tiebout, der mir immer geduldig zur Seite stand und mich in nicht so tollen Zeiten zum Weitermachen ermutigte.

Meinen Eltern möchte ich in aller Liebe danken, dass sie mir die Ausbildung und damit diese Arbeit ermöglichten.

10 Lebenslauf

Name: Silke van der Piepen

Geboren: 04.07.1973 in Pretoria

Schule: 1990-1994 Gisela Gymnasium in München

Abitur: 1994

Universität: 1995-2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: September 2001

Approbation: November 2001

Jan – Juni 2002 Assistenztierärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. Wenninger

Seit Dez. 2002 Anstellung und Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie

Seit April 2003 Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München