

**Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**



Immunologische, zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen an Tumoren des Zentralnervensystems und am Neuroblastom

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Ariane Söling
geb. am 7.11.1959 in Freiburg im Brsg.

Verteidigung: 05.02.2008

Probevorlesung: 04.03.2008

Beschlussdatum: 15.04.2008

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Gabriele Schackert
2. Prof. Dr. med. Ulrich Bogdahn
3. Prof. Dr. med. Michael Weller

urn:nbn:de:gbv:3-000013389

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013389>]

Kurzreferat

Zur Entwicklung verbesserter gentherapeutischer Verfahren für die Behandlung maligner Gliome wurden Fusionen des Suizidgens Herpes simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase (HSV-TK) mit fluoreszierenden Proteinen bzw. Glühwürmchen-Luciferase hinsichtlich ihrer Eignung als Reporter für das optische Monitoring der zytotoxischen Aktivität der HSV-TK untersucht. Für die Fusionskonstrukte von HSV-TK mit Fluoreszenzproteinen konnte gezeigt werden, dass der Typ des angehängten Fluoreszenzproteins maßgeblich über Lokalisation, Persistenz und Aktivität des therapeutischen Transgens entscheidet. Mithilfe des Biolumineszenz-Imaging demonstrierten wir, dass Luciferase ein geeigneter optischer Reporter für die Quantifizierung des therapeutischen Effekts der HSV-TK gegenüber humanen Glioblastomzellen in Zellkultur und in vivo im Nacktmausmodell ist.

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Kombination des Alkylans Temozolomid mit den Ribonukleotidreduktasehemmern Didox und Trimidox synergistische zytotoxische Effekte bei verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien bewirkt.

Das für die DNA-Replikation essentielle Protein „Minichromosome Maintenance Protein 3“ wurde von uns als immunogenes Tumor-assoziiertes Antigen und negativer prognostischer Faktor bei Patienten mit diffusem Astrozytom identifiziert. Wir zeigten, dass das „universelle“ Tumor-spezifische Antigen Survivin in Meningeomen und Gliomen überexprimiert wird und bei Patienten mit diesen Tumoren eine hochtitrige IgG-Immunantwort auslösen kann. Die Expression von mindestens einem der Tumor-spezifischen „Cancer-Testis“-Antigene MAGE-1, MAGE-3 und NY-ESO-1 wurde von uns mittels RT-PCR in 72% der Neuroblastome nachgewiesen. Der Expression dieser Antigene kam dabei kein prognostischer Wert zu.

Bibliografie

Söling, Ariane: „Immunologische, zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen an Tumoren des Zentralnervensystems und am Neuroblastom“. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Habilitationsschrift, 63 Seiten, Erscheinungsjahr: 2007

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Biologie der Gliome	2
2.2 Molekularbiologie der Gliome	3
2.3 Klassifikation der Gliome gemäß Weltgesundheitsorganisation (WHO)	6
2.4 Therapie maligner Gliome	8
2.5 Bildgebungsmethoden in der Krebsforschung	11
3. Ergebnisse und Diskussion	15
3.1 Fluoreszenzproteine als Fusionspartner des Suizidgens Herpes simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase (HSV-TK)	15
3.2 Evaluation einer Herpes simplex Virus Typ 1- Thymidinkinase-Gentherapie von Glioblastomen mithilfe des Biolumineszenz-Imaging	21
3.3 Chemotherapie maligner Gliome	25
3.4 Tumor-assoziierte Antigene bei Tumoren des ZNS und beim Neuroblastom	27
4. Ausblick	41
5. Literaturverzeichnis	43
6. Anlagen	55
6.1 Liste thematisch relevanter eigener Publikationen	55
6.2 Thesen	56
6.3 Erklärungen	58
6.4 Lebenslauf	59
6.5 Danksagung	60

1. Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit malignem Gliom ist auch bei Anwendung eines multimodalen aggressiven Behandlungsregimes, bestehend aus Tumorresektion, Radio- und Chemotherapie, schlecht. Die Weiterentwicklung bereits etablierter Therapien, aber auch die Erforschung alternativer Behandlungsverfahren, wie z.B. Immun- und Gentherapie, erscheint daher vordringlich.

Zur Entwicklung verbesserter genterapeutischer Verfahren wurden Fusionen des Suizidgens Herpes simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase (HSV-TK) mit fluoreszierenden Proteinen bzw. Glühwürmchen-Luciferase hinsichtlich ihrer Eignung als Reporter für das optische Monitoring der zytotoxischen Aktivität der HSV-TK untersucht. Für die Fusionskonstrukte von HSV-TK mit Fluoreszenzproteinen konnten wir zeigen, dass der Typ des angehängten Fluoreszenzproteins maßgeblich über Lokalisation, Persistenz und Aktivität des therapeutischen Transgens entscheidet, fluoreszierende Fusionspartner demnach sehr sorgfältig ausgewählt werden sollten. Mithilfe des Biolumineszenz-Imaging demonstrierten wir, dass Luciferase ein geeigneter optischer Reporter für die Quantifizierung des therapeutischen Effekts der HSV-TK gegenüber humanen Glioblastomzellen in Zellkultur und in vivo im Nacktmausmodell ist.

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Kombination des Alkylans Temozolomid mit den Ribonukleotidreduktasehemmern Didox und Trimidox synergistische zytotoxische Effekte bei verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien bewirkt.

Tumor-spezifische Antigene können prognostische Marker, aber auch Zielstrukturen für eine Vakzination gegen Krebs darstellen. Im Rahmen des Immunoscreenings einer humanen Glioblastom-cDNA-Bank mit Seren von Patienten mit malignem Gliom identifizierten wir das für die DNA-Replikation essentielle Protein „Minichromosome Maintenance Protein 3“ als Tumor-assoziiertes Antigen. Dieses kann bei Patienten mit Hirntumoren eine Krebs-restringierte humorale Immunantwort auslösen und ist ein negativer prognostischer Faktor für Patienten mit diffusem Astrozytom.

Wir zeigten, dass das „universelle“ Tumor-spezifische Antigen Survivin in Meningeomen und Gliomen überexprimiert wird und bei Patienten mit diesen Tumoren eine hochtitrige IgG-Immunantwort auslösen kann. Da B-Lymphozyten durch CD4+-T-Helferzellen aktiviert werden, wurde damit auch indirekt nachgewiesen, dass Survivin bei Hirntumorpatienten eine T-Zellantwort induzieren kann.

Die Expression von mindestens einem der Tumor-spezifischen „Cancer-Testis“-Antigene MAGE-1, MAGE-3 und NY-ESO-1, die sämtlich bereits in Vakzinationsprotokollen gegen Krebs eingesetzt werden, wurde von uns mittels RT-PCR in 72% der Neuroblastome nachgewiesen. Der Expression dieser Antigene kam dabei kein prognostischer Wert zu.

2. Einleitung

2.1 Biologie der Gliome

Gliome umfassen mehr als 50% aller Hirntumore. Sie sind die häufigsten primären Hirntumore bei Erwachsenen; ihre Inzidenz liegt bei 5-10/ 100.000 (1,2). Gliome umfassen vorwiegend 3 Gruppen: Astrozytome (60-70%; Tabelle 1), Oligodendrogliome (10-30%) und gemischte Oligoastrozytome (10-20%). Sie sind refraktär gegenüber konventionellen Therapien, einschließlich chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie. Patienten mit Gliom fallen initial häufig durch Krampfanfälle, motorische Defizite, Kopfwere und Gedächtnisverlust auf.

WHO Grad	Bezeichnung	histologische Kriterien	assoziierte genetische Alterationen
1	pilozytisches Astrozytom		
2	niedriggradiges Astrozytom	1 Kriterium, meist nukleäre Atypie	mutiertes p53, LOH 17p
3	anaplastisches Astrozytom	2 Kriterien, meist nukleäre Atypie und mitotische Aktivität	mutiertes p53, LOH 17p, LOH 19q
4	Glioblastome multiforme	3 Kriterien, meist nukleäre Atypie, Mitosen, endotheliale Proliferation und/ oder Nekrose	mutiertes p53, LOH 17p, LOH 19q, LOH 10, EGFR-Amplifikation

Abkürzungen: LOH, loss of heterozygosity; EGFR, epidermal growth factor receptor

Die Klassifizierung der Gliome gemäß Weltgesundheitsorganisation (WHO) basiert auf der Beschreibung der histologisch bösartigsten Region. Die Einordnung berücksichtigt hierbei die nukleäre Atypie, die Anzahl der Mitosen, die mikrovaskuläre Proliferation und das Auftreten von Nekrosen, die von dicht gepackten Tumorzellkernen („Pseudopalisaden“) umgeben sind. Die Tumorzellen invadieren charakteristischerweise in das den Tumor umgebende Hirnparenchym und migrieren entlang der Bahnen der weißen Substanz (3).

Bisher wurde allgemein angenommen, dass die Gliomgenese auf der malignen Transformation bereits differenzierter Gliazellen beruht. Nachdem sich in jüngster Zeit im Gehirn von Erwachsenen sowohl neurale Stammzellen als auch gliale Progenitorzellen nachweisen ließen, die phänotypisch und hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters Gliomzellen ähneln, werden inzwischen auch diese Zellen als Ursprungszellen zumindest für bestimmte Subtypen von Gliomen diskutiert (4). Phillips et al. konnten kürzlich Subtypen maligner Gliome identifizieren, deren unterschiedliches Genexpressionsprofil verschiedenen Stadien der Neurogenese entsprach (5). Astrozytome leiten sich wahrscheinlich von astrozytären, Oligodendrogliome von oligodendrozytischen Vorläuferzellen ab.

Einige der Signalwege, die die Differenzierung und Proliferation glialer Progenitorzellen regulieren, sind bei Gliomzellen gestört. In vitro kann der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), nicht jedoch der Plättchen-assoziierte Wachstumsfaktor (PDGF), die Proliferation neuraler Stammzellen stimulieren, aus denen Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hervorgehen können. Adulte neurale Stammzellen exprimieren den Astrozytenmarker „gliales fibrilläres saures Protein“ (GFAP), so dass postuliert wird, dass sich aus diesen Gliome entwickeln könnten. Diffuse Gliome könnten auch aus neuroektodermalen Stammzellen hervorgehen, die lebenslang existieren. Progenitorzellen, bei denen der Tumorsuppressor p53 mutiert, differenzieren in Richtung Astrozyten, Progenitorzellen, bei denen ein Verlust von Chromosom 1p und 19q auftritt, zeigen dagegen einen oligodendroglialen Phänotyp.

In jüngster Zeit wurde eine Vielzahl molekularer Veränderungen, die der Entstehung von Gliomen zugrunde liegen, beschrieben. Es zeigte sich, dass keiner der Tumore auf lediglich einer genetischen Veränderung basierte, ebenso ließ sich keine der beschriebenen Mutationen bei *allen* Tumoren eines bestimmten WHO-Grads nachweisen. Ihr häufiges Vorkommen und die Assoziation bestimmter Mutationen mit dem histologischen Grad spricht jedoch dafür, dass die Gliomgenese an die Veränderung *spezifischer* Signalkaskaden gekoppelt ist (Abb. 1).

Tumorgenese und -progression bei Gliomen sind mit 2 funktionellen Kategorien assoziiert: Zum Einen mit einem Verlust der Zellzykluskontrolle, zum Anderen mit einer vermehrten Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen). Beide Veränderungen sind auch bei vielen anderen Tumoren zu finden, demnach nicht Gliom-spezifisch. Welche Art Tumor entsteht, hängt davon ab, in welcher Ursprungszelle die genetischen Veränderungen auftreten und wie der Differenzierungsgrad der Zelle zum Zeitpunkt der genetischen Schädigung ist. Circa 25% der niedriggradigen Gliome weisen Mutationen auf, die die Regulierung des Zellzyklusarrests in der G₁-Phase betreffen. Bei anaplastischen Astrozytomen können diese Mutationen bei 66% der Tumore nachgewiesen werden, bei Glioblastomen sogar bei fast allen Tumoren.

2.2 Molekularbiologie der Gliome

p53-Signalweg

Eine der Signalkaskaden, die bei Tumoren am häufigsten beeinträchtigt sind, ist der p53-Signalweg (Abb. 1). Der Tumorsuppressor p53 (Chromosom 17p) reguliert als kurzlebiger Transkriptionsfaktor die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress, die sich entweder in Zellzyklusarrest bzw. DNA-Reparatur oder in der Einleitung der Apoptose widerspiegelt. Die Inaktivierung von p53 bewirkt genomische Instabilität und anaplastische Transformation und führt zur Resistenz der Zelle gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung (6). P53-

Mutationen sind besonders bei kindlichen und niedriggradigen Gliomen sowie bei sekundären Glioblastomen zu finden. Da der Verlust der p53-Funktion sowohl bei niedrig- als auch bei höhergradigen Gliomen auftritt, scheinen p53-Veränderungen ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorigenese darzustellen.

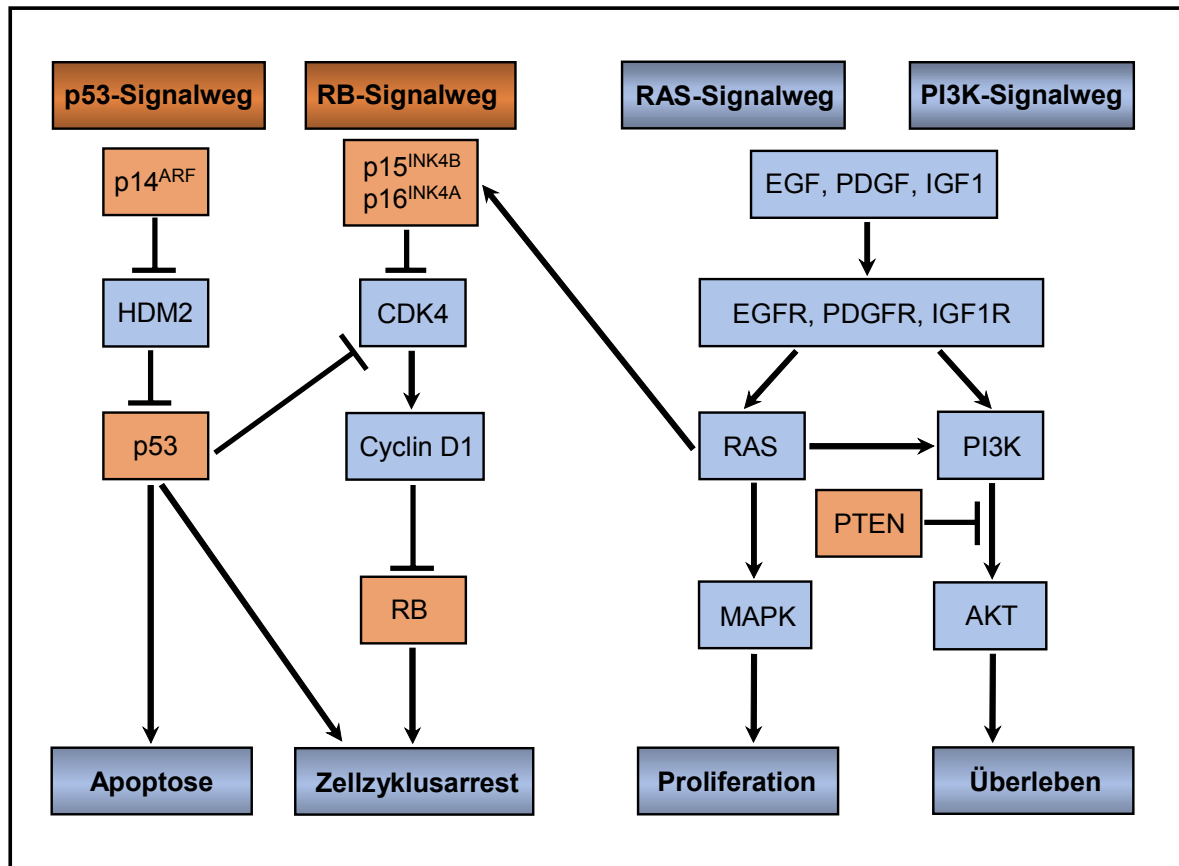


Abb.1 Signalwege, die bei Gliomen beeinträchtigt sind (vereinfachte Darstellung). Rot unterlegte Faktoren sind häufig durch Deletion, Mutation oder Promotormethylierung inaktiviert. Blau unterlegte Faktoren werden durch Überexpression, Amplifikation und Mutation aktiviert. Nicht eingezeichnet sind die Stimulation von HDM2 und CyclinD1 durch AKT sowie der Telomerase-Signalweg, der bei Gliomen ebenfalls aktiviert ist. CDK4, Cyclin-abhängige Kinase 4; EGF(R), Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor); HDM2, „human double-minute 2“; IGF1(R), Insulinartiger Wachstumsfaktor(rezeptor); MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PDGF(R), Plättchen-assoziiertes Wachstumsfaktor(rezeptor); PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; PTEN, „Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert von Chromosom 10“; RB, „retinoblastoma susceptibility“ Protein. (In Anlehnung an 7)

Bei primären, „de novo“ Glioblastomen finden sich Störungen eher bei übergeordneten Regulatoren der p53-Aktivität, wie z.B. „Human double minute 2“ (HDM2), das an p53 bindet und dadurch dessen Aktivität hemmt. Amplifikationen von HDM2 finden sich bei einer geringen Anzahl maligner Gliome. P14^{ARF} inhibiert HDM2, wodurch der intrazelluläre Abbau von p53 verhindert und Apoptose induziert wird. P14^{ARF} ist bei malignen Gliomen häufig deletiert bzw. methyliert und damit inaktiviert. Auffällig ist, dass maligne Gliome jeweils nur eine Mutation im Bereich der p14^{ARF}/ HDM2/ p53-Kaskade aufweisen (7).

Zwischen dem p53- und dem „retinoblastoma susceptibility“ Protein (RB)-Signalweg bestehen Interaktionen: P53 inhibiert die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 4, was wiederum zu einer verminderten RB-Phosphorylierung und damit ebenfalls zu Zellzyklusarrest führt.

RB-Signalweg

Das RB-Protein reguliert den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Normalerweise bindet unphosphoryliertes RB an die E2F-Transkriptionsfaktoren und blockiert dadurch deren Fähigkeit zur Aktivierung der Gentranskription (Abb. 1). Als Folge davon kommt es zu einem Arrest des Zellzyklus am Übergang G1-/S-Phase. Cyclin/ CDK-Komplexe (hyper-) phosphorylieren RB, wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf die E2F-Transkriptionsfaktoren aufgehoben wird und die Zelle in den Zellzyklus eintreten kann. Zusätzlich werden zelluläre Prozesse wie DNA-Reparatur, Differenzierung und Apoptose über RB reguliert (7). Verlust von Wildtyp-RB, wie er bei zahlreichen Tumoren zu finden ist, führt zu einer ungehinderten Aktivierung der E2F-Transkriptionsfaktoren. Mutationen von Komponenten der RB-Signalkaskade sind bei niedriggradigen Gliomen selten, bei höhergradigen Gliomen dagegen häufig. Bei sekundären Glioblastomen ist neben einem Verlust von RB eine Amplifikation von CDK4 beschrieben. Bei primären Glioblastomen finden sich dagegen oft Deletionen bzw. eine Promotorhypermethylierung (und damit Inaktivierung) bei CDK-Inhibitoren wie p16^{INK4A} (CDKN2A) und p15^{INK4B} (CDKN2B).

PI3K/ AKT-Signalweg

Der Tumorsuppressor „Phosphatase und Tensin Homolog deletiert von Chromosom 10“ (PTEN) ist ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). PTEN-Mutationen bzw. ein Funktionsverlust von PTEN finden sich fast ausschließlich bei primären Glioblastomen, was zu einer Überstimulierung von PI3K und als Folge davon zur Aktivierung der Serin-/ Threoninkinase AKT führt (8). Auch eine anhaltende Stimulierung von Wachstumsfaktorrezeptoren führt zu einer Hochregulierung des PI3K/ AKT-Signalwegs (Abb. 1). PI3K/ AKT stimulieren Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz von Gliomzellen. Die Aktivierung des PI3K/ AKT-Signalwegs ist bei Gliomen signifikant gekoppelt mit höherem Tumorgad, verminderter Apoptose, Angiogenese, Invasion und schlechterer Prognose (7,9). AKT stimuliert auch Cyclin D1 und HDM2 und greift dadurch zusätzlich in den p53- und RB-Signalweg ein. Folge sind auch hier gesteigerte Zellproliferation und Apoptoseinhibition.

Rezeptoren für Wachstumsfaktoren/ Rezeptortyrosinkinasen

Bei malignen Gliomen lässt sich häufig eine Überexpression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren im Sinne einer auto- und parakrinen Überstimulierung nachweisen. Dies betrifft unter anderem EGF, PDGF, den vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF),

den Insulin-artigen Wachstumsfaktor 1 (IGF1), den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF/SF). Die durch die Rezeptoraktivierung ausgelösten zellulären Effekte wie Proliferation, Apoptoseresistenz, Motilität, Invasion und Neoangiogenese sind auf die Aktivierung intrazellulärer Kinasen zurückzuführen (Abb. 1). So wird z.B. der RAS/ PI3K/ AKT/ Proteinkinase B-Signalweg stimuliert, ebenso der RAS/ PI3K/ RAC/ Rho-Signalweg und der Phospholipase (PLC) γ / Proteinkinase C-Signalweg (7). Zusätzlich aktiviert RAS auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Interessanterweise wurden Mutationen am ras-Gen selbst bei malignen Gliomen bisher nicht beschrieben.

2.3 Klassifikation der Gliome gemäß Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Diffuse astrozytische Gliome umfassen Gliome der WHO Grade 2-4. Beim pilozytischen Astrozytom oder Gliom WHO Grad 1 handelt es sich wahrscheinlich um eine separate Erkrankung. Aufgrund ihrer geringen Tendenz zu invasivem Wachstum sind diese Tumore im Allgemeinen durch operative Resektion heilbar (3). Über 80% der Patienten mit Gliom WHO Grad 1 überleben >20 Jahre nach Diagnosestellung (7).

Niedriggradige Gliome

Niedriggradige Gliome (WHO Grad 2) umfassen Astrozytome, Oligodendrogliome und gemischte Gliome, bei denen Astrozyten und Oligodendrozyten zu jeweils mindestens 25-30% vorliegen. Sie bestehen aus gut differenzierten Zellen, die relativ langsam wachsen, aber diffus in das Gehirn invadieren und treten überwiegend bei jungen Menschen auf: Das mediane Alter bei Patienten mit Astrozytom beträgt 35 Jahre, bei Patienten mit Oligodendrogliom 45 Jahre. Patienten mit einem Gliom WHO Grad 2 haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von 10-15 Jahren (3). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Astrozytom WHO Grad 2 liegt bei 37%, von Patienten mit Oligodendrogliom WHO Grad 2 bei 70% und für Patienten mit gemischtem Gliom WHO Grad 2 bei 56% (10).

Niedriggradige Astrozytome weisen als erstes eine Überexpression von PDGFR sowie in über 60% der Fälle eine Veränderung im p53-Gen auf. Mindestens 50% der niedriggradigen Astrozytome zeigen eine Progredienz in Richtung anaplastisches Astrozytom (11).

Maligne Gliome

Maligne Gliome umfassen die Gliome der WHO Grade 3 (ca. 20%) und 4 (ca. 80%). Gesicherte ungünstige prognostische Faktoren sind hohes Alter, schlechter funktioneller Status präoperativ, undifferenzierte Histologie und unvollständige Tumorsektion (12,13). Wie andere aggressive Tumore sind auch Gliome der WHO Grade 3 und 4 gekennzeichnet durch starke Proliferation, Apoptoseresistenz, Neoangiogenese, Invasivität und Resistenz gegenüber externer Wachstumskontrolle und Immunregulation. Die Dichte an Mikrogefäßen

wurde bei Gliomen als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert. Ein weiteres Kennzeichen maligner Gliome, auf dem sich letztlich auch ihre Therapieresistenz begründet, ist die starke histologische und genetische intra- und intertumorale Heterogenität (1). Zusätzlich scheinen kürzlich identifizierte CD133+ tumorigene neurale Stammzellen eine andere Empfindlichkeit gegenüber etablierten Therapien aufzuweisen als das Kompartiment der „Nicht-Stammzell“-Tumorzellpopulation (4,14-16).

Das mediane Alter von Patienten mit anaplastischem Astrozytom liegt bei 40 Jahren, von Glioblastompatienten bei 53 Jahren (6). Das Verhältnis Mann zu Frau beträgt ca. 1,5:1 (6). Die mediane Überlebenszeit liegt für Patienten mit malignem Gliom WHO Grad 3 bei 2-3 Jahren, für Patienten mit Glioblastom bei <1 Jahr (17). Diese Tumore zeigen so gut wie nie eine systemische Metastasierung, meist jedoch eine lokoregionale Streuung von Tumorzellen und seltener (bei ca. 10-20%) eine leptomeningeale Aussaat. In 5% der Fälle liegen bei Diagnose multifokale Gliome vor. Tumorrezidive treten bei über 80% der Patienten innerhalb von 2-3 cm des ursprünglichen Tumorrands auf (18).

Anaplastische Astrozytome

Etwa 10% der Gliome sind anaplastische Astrozytome. Diese weisen typischerweise Störungen im Bereich des p53- und des RB-Signalwegs auf, meist bedingt durch Deletion von p14^{ARF} bzw. p16^{INK4A}. Der RAS-Signalweg ist überstimuliert, allerdings ohne dass sich Mutationen am ras-Gen selbst nachweisen ließen. Zusätzlich findet sich eine Reaktivierung der Telomerase (7).

Glioblastome

Glioblastome repräsentieren etwa ein Drittel aller diagnostizierten Hirntumore und umfassen ca. 50% aller Gliome. Die mediane Überlebensrate liegt bei <1 Jahr, nach 6 Monaten leben noch 42,4%, nach 12 Monaten 17,7% und nach 2 Jahren 3,3% der Glioblastompatienten (19,20). Eine neuere Studie belegt, dass durch kombinierte Anwendung von Temozolomid und Radiotherapie das Überleben dieser Patienten, wenn auch moderat, verbessert werden kann (21).

Das diffuse Wachstum der Glioblastome wird besonders dadurch deutlich, dass Rezidive nach Totalexstirpation des Tumors in 90% der Fälle unmittelbar bzw. innerhalb weniger cm neben der Resektionshöhle auftreten. Dies wird auf einzelne invasive Zellen mit hohem migratorischem Potential zurückgeführt.

Glioblastome können de novo entstehen, aber auch sekundär im Rahmen progressiver Veränderungen aus niedriggradigen oder anaplastischen Astrozytomen. Primäre und sekundäre Glioblastome treten bei unterschiedlichen Altersgruppen auf und basieren auf

unterschiedlichen genetischen Veränderungen, die jedoch die selben zellulären Signalwege beeinflussen (22).

Primäre Glioblastome

Fünfundneunzig Prozent der Glioblastome treten primär auf, das mediane Alter der Patienten liegt bei ca. 62 Jahren. Typischerweise finden sich ein Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 10 (PTEN-Verlust, 69%), eine EGFR-Amplifikation bzw. -Überexpression (ca. 50-60%) und Mutationen am PTEN-Gen (<30%). Deletionen des für p14^{ARF} und p16^{INK4A} kodierenden Gens CDKN2A lassen sich bei ca. 40% der Patienten nachweisen, eine Amplifikation von HDM2 ist eher selten. Diese Veränderungen führen zu Störungen aller 4 oben beschriebenen Signalwege (p53, RB, PI3K/AKT, RAS). P53-Mutationen treten mit ca. 10-30% eher selten auf (10,23). Etwa 40% der Glioblastome, bei denen der EGFR amplifiziert ist, exprimieren auch die mutante konstitutiv aktive EGFR-Variante EGFRvIII oder Δ EGFR (24).

Sekundäre Glioblastome

Sekundäre Glioblastome sind relativ selten und treten eher bei jüngeren Patienten auf (medianes Alter 45 Jahre). Sie zeigen als Erstes häufig p53-Mutationen (65%), aber auch RB-Mutationen, eine PDGFR-Amplifikation oder -Überexpression und LOH von Chromosom 10q (63%; PTEN-Verlust). Eine homozygote Deletion von CDKN2A (p14^{ARF}, p16^{INK4A}) und eine CDK4-Amplifikation sind ebenfalls beschrieben worden, aber mit je ca. 4% wesentlich seltener als beim primären Glioblastom (20,25,26). Diese Veränderungen bewirken in der Summe letztendlich eine unkontrollierte Progression von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus. Veränderungen am EGFR treten bei sekundären Glioblastomen eher selten auf. Interessanterweise scheinen EGFR-Genamplifikation und Mutationen im p53-Gen bzw. Verlust von Chromosom 17p einander auszuschließen (27). Der Verlust der Heterozygotie von Chromosom 10q erwies sich bei Gliompatienten als die einzige genetische Veränderung, die unabhängig von klinischen Faktoren mit einer negativen Prognose einherging (20).

2.4 Therapie maligner Gliome

Die beiden Säulen der Therapie maligner Gliome sind die möglichst vollständige operative Tumorentfernung und die Bestrahlung, die jedoch nur zu einer palliativen Verlängerung der Überlebenszeit führen (28,29). Auch ein Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie konnte bis vor Kurzem nicht belegt werden. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine schlechte intratumorale Anreicherung der Chemotherapeutika sowie die bekannte Heterogenität der Tumore zurückzuführen. Obwohl die Bluthirnschranke an Orten makroskopisch erkennbarer Tumorinfiltration oftmals durchlässig ist, ist dies in Bereichen diffuser Tumorzellinvasion nicht

der Fall, so dass gerade diese Regionen für Chemotherapeutika unzugänglich sind (7,30). Zusätzlich behindert ein erhöhter interstitieller Druck im Tumor deren intratumorale Verteilung.

Kultivierte Gliomzellen scheinen den extrinsischen Todesrezeptor-abhängigen Apoptoseweg (z.B. Fas, Tumornekrosefaktorrezeptor) als Antwort auf Bestrahlung oder Zytostatika nicht zu aktivieren. Eine starke Expression von Mitgliedern der „Inhibitor of apoptosis“ (IAP)-Proteinfamilie sowie die präferentielle Expression von antiapoptotisch wirksamen Mitgliedern der BCL2-Proteinfamilie könnte dafür verantwortlich sein, dass Gliomzellen Caspasen als Antwort auf proapoptotische Stimuli nicht aktivieren.

Neue Therapieverfahren sollten die große intra- und intertumorale Heterogenität der Gliome berücksichtigen und daher gegen mehr als eine Zielstruktur gerichtet sein.

Gentherapie maligner Gliome

Eine Gentherapie bei malignen Gliomen könnte besonders deshalb eine Alternative zu konventionellen Behandlungsverfahren darstellen, da Gliomzellen im Zentralnervensystem (ZNS) rasch proliferieren vor einem Hintergrund teilungsinaktiver umgebender Zellen und Tumormetastasen außerhalb des ZNS praktisch nicht vorkommen. Dies ermöglicht es, Gentherapeutika intratumoral bzw. in die Umgebung des Tumors zu applizieren und das Risiko einer systemischen Toxizität gering zu halten.

Im Tierexperiment konnten Mäuse mit Gliom durch eine Therapie mit dem Suizidgen/ Prodrug-System Herpes simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase/ Ganciclovir (HSV-TK/GCV) geheilt werden (31,32). Dagegen waren die Ergebnisse klinischer Studien bei Patienten mit malignem Gliom, denen replikationsdefiziente *Retroviren* in Kombination mit HSV-TK intracerebral verabreicht wurden, bisher eher enttäuschend (33-35). Eine kürzlich publizierte randomisierte Studie (36), bei der Patienten mit malignem Gliom replikationsdefiziente *Adenoviren* in Kombination mit HSV-TK erhielten, zeigte dagegen einen signifikanten Überlebensvorteil für diese Patienten im Vergleich zu konventionell mit Operation und Bestrahlung behandelten Kontrollpatienten (70,6 versus 39 Wochen).

Die immer noch relativ geringe Effizienz der HSV-TK-Gentherapie bei Gliompatienten ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die geringe Transduktionsrate der Tumorzellen zurückzuführen (37). So wurde *in vitro* eine minimale Transduktionsrate von 10% der Tumorzellen für eine erfolgreiche Gentherapie mit HSV-TK festgelegt (38). *In vivo* (Mausmodell) müssen mindestens 50% der Zellen eines subkutanen Tumors HSV-TK exprimieren, damit der Tumor durch GCV-Gabe eliminiert werden kann (39). Nach erfolgter HSV-TK/GCV-Therapie bei Gliompatienten wurden jedoch in den wenigen bisher *ex vivo* untersuchten menschlichen Tumoren deutlich geringere Transduktionsraten von <0,002 bis 2,6% gefunden (33). Eine verbesserte Wirksamkeit ließ sich durch die Kombination der HSV-TK/GCV-Therapie mit

anderen Suizidgenen und lokaler Strahlentherapie erreichen (40). Die limitierte Transduktionseffizienz replikationsdefizienter Viren führte in den letzten Jahren dazu, dass vermehrt an der Entwicklung replikationsfähiger onkolytischer Viren gearbeitet wird (39).

Suizidgentherapie

Suizidgene kodieren für Prodrug-aktivierende Enzyme. Diese können nichttoxische Vorstufen von Medikamenten (Prodrugs) zu lokal hochkonzentrierten toxischen Metaboliten umwandeln, wodurch systemische Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden. Zusätzlich macht sich diese Therapie den sogenannten „Bystander“-Effekt zunutze, indem toxische Metabolite über „gap junctions“ auch in benachbarte Zellen gelangen und diese abtöten können.

Die Wirksamkeit des bei weitem am Besten untersuchten Prodrug-aktivierenden Systems HSV-TK/GCV wurde im Tiermodell mehrfach belegt (41,42). Ganciclovir ist ein acyclisches Analogon des natürlichen Nucleosids 2'-Desoxyguanosin. Im Vergleich zur Säuger-TK monophosphoryliert HSV-TK GCV 50- bis 100-fach effizienter (Abb. 2). Monophosphoryliertes GCV wird von zellulären Kinasen weiter zu toxischem GCV-Triphosphat phosphoryliert, das in die DNA eingebaut wird (Abb. 2). Dies führt durch Hemmung von DNA-Polymerasen zum DNA-Kettenabbruch (43). Da die Wirkung von GCV auf DNA beschränkt ist, kann diese Therapie nur bei replizierenden Zellen greifen.

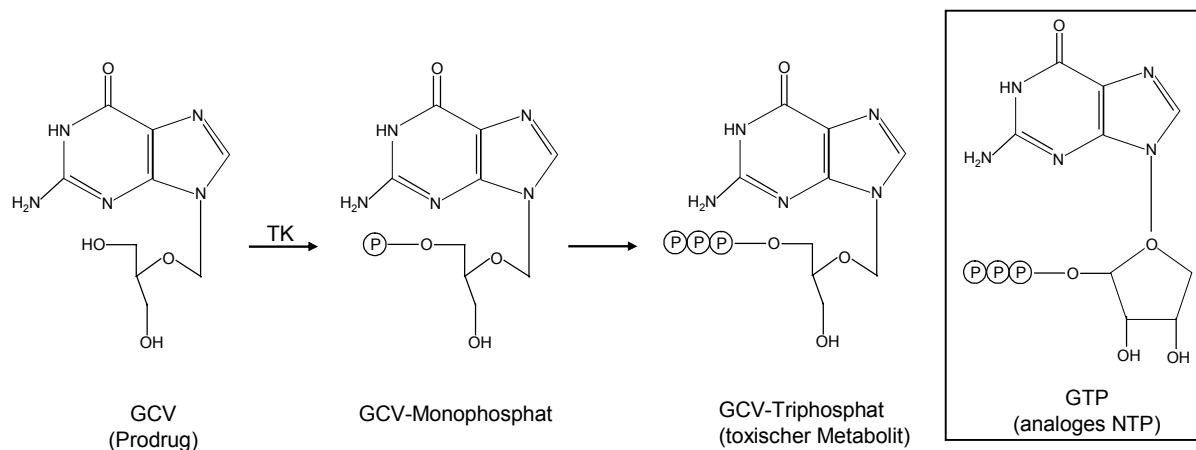


Abb.2 Aktivierung des Prodrugs Ganciclovir (GCV) zu GCV-Monophosphat durch Thymidinkinase (TK) und anschließende Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen zum toxischen Metaboliten GCV-Triphosphat. Zum Vergleich: Das analoge Nucleotid Guanosintriphosphat.

In Tumorzellen, die mit dem HSV-TK-Gen transduziert werden, werden auf diese Weise antiherpetische Medikamente wie GCV zu zytotoxischen Metaboliten umgewandelt. Herpes simplex Virus Typ 1-TK/GCV wirkt zusätzlich antiangiogen durch direkte toxische Wirkung auf Endothelzellen, erhöht die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Bestrahlung und induziert eine Anti-Tumor-Immunantwort (44,45).

Für die Optimierung der im Tiermodell sehr effizienten HSV-TK/GCV-Gentherapie erschien es sinnvoll, eine Bildgebungsmethode zu entwickeln, mit der Lokalisierung, Aktivität und Persistenz der HSV-TK in Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfasst werden können. Hierfür scheint die *Fusion* eines fluoreszierenden oder biolumineszenten Reporters an die HSV-TK ein geeignetes Verfahren zu sein, da nur bei einem derartigen Konstrukt sicher davon ausgegangen werden kann, dass Reporter und therapeutisches Gen äquimolar vorhanden sind. Zu diesem Zweck fusionierte ich die HSV-TK sowohl mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen (Publikation 1) als auch mit dem Glühwürmchen-Enzym Luciferase (Publikationen 2 und 3). Die mit diesen Konstrukten durchgeführten Untersuchungen werden unten näher dargestellt.

2.5 Bildgebungsmethoden in der Krebsforschung

Die Standardmethode zur Quantifizierung der Expression therapeutischer Transgene im Tiermodell beruhte bisher auf der *ex vivo* Analyse explantierten Tumorgewebes (37,41,46). Um Zeitverlauf und Dauer der Transgenexpression zu erfassen, musste demnach eine Vielzahl von Tieren pro Untersuchungszeitpunkt getötet werden. In den letzten Jahren wurden für das zeitliche und räumliche Monitoring von Transgenexpression und therapeutischem Erfolg zunehmend nichtinvasive Bildgebungstechniken wie z.B. Positronenemissionstomografie (PET), Magnetresonanz-Imaging (MRI), Fluoreszenz und Biolumineszenz verwendet, wobei nur die beiden letzteren Verfahren ohne größere Expertise und Logistik zu bewältigen sind (47-49).

Während optische Bildgebungsverfahren wie Biolumineszenz und Fluoreszenz mithilfe von Reporterproteinen bisher keinen Eingang in die klinische Routine gefunden haben, haben sie die präklinische Krebsforschung am Maus- und Rattenmodell erheblich vorangebracht. Beide Verfahren beruhen auf der Lichtemission fluoreszierender Proteine oder Farbstoffe bzw. biolumineszentes Licht produzierender Enzyme (Luciferasen). Das emittierte schwache Licht wird von hochsensitiven gekühlten „Charge-coupled device“ (CCD)-Kameras als planares (zweidimensionales) Bild aufgezeichnet.

Im Organismus hängt die Stärke der Lichtemission im Wesentlichen vom Ausmaß der Lichtabsorption im Gewebe sowie der Streuung des Lichts ab, die beide wellenlängenabhängig sind. Die stärksten Lichtabsorber im Körper sind Hämoglobin, Lipide und Wasser. Hämoglobin absorbiert vor allem blaues und grünes Licht, während Lipide und Wasser eher infrarotes Licht absorbieren. Licht im Nahinfrarot-Bereich (650-900 nm) wird demnach deutlich weniger von Gewebe absorbiert, ebenso ist die Autofluoreszenz in diesem Bereich geringer. Die Quantifizierung biologischer Prozesse über die Lichtemission *in vivo* ist demnach im Nahinfrarot-Bereich am verlässlichsten. Alle Bestrebungen hinsichtlich der

Entwicklung neuer Reporter für die Bildgebung gehen folglich dahin, Reportermoleküle zu generieren, die nahinfrarotes Licht emittieren.

Biolumineszenz-Imaging

Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* katalysiert in lebenden Zellen die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin in Gegenwart von O₂ und ATP. Bei Rückkehr des angeregten Oxyluciferins in seinen Ausgangszustand wird Licht emittiert (λ_{\max} = 562 nm), die Effizienz liegt hierbei nahe ein Photon pro umgesetztem Molekül Oxyluciferin. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts liegt bei 510–650 nm, wobei vor allem das Lichtsegment >600 nm entscheidend ist, da dieses Licht weniger stark von Gewebe und Hämoglobin absorbiert wird. Bei Biolumineszenz handelt es sich um ein sehr schwaches Licht. Die CCD-Kameras für das Biolumineszenz-Imaging (BLI) werden daher im Allgemeinen auf -120°C gekühlt, da sich hierdurch das thermische Rauschen deutlich reduzieren lässt.

Neben Glühwürmchen-Luciferase wird auch häufig die strukturell nicht verwandte Luciferase der Weichkoralle *Renilla reniformis* für das BLI verwendet. Diese setzt das Substrat Coelenterazin um und emittiert Licht im blauen Bereich (λ_{\max} = 480 nm). Da Coelenterazin nach intraperitonealer Gabe eine starke Autolumineszenz verursacht und das emittierte blaue Licht in erheblichem Maß von Gewebe absorbiert wird, ist Renilla-Luciferase eher weniger für das BLI geeignet. Allerdings ermöglicht der simultane Einsatz beider Luciferasen angesichts deren strikter Substratspezifität die parallele Untersuchung zweier unterschiedlicher biologischer Prozesse in ein und demselben Tier.

Die Lichtemission nimmt um den Faktor 10 ab pro cm Gewebe, den das Licht durchdringen muss. Eine biolumineszente Lichtquelle kann bis zu einer Tiefe von 2 cm innerhalb eines Organismus (Ratte, Maus) extern mit der CCD-Kamera detektiert werden (49). Aufgrund der Lichtstreuung ist die Auflösung bei Biolumineszenz mit 3-5 mm relativ niedrig. Mithilfe des BLI können *in vivo* über einen längeren Zeitraum Genexpression, Protein-Protein-Interaktionen, Tumorwachstum und Metastasenbildung, Onkogenese, Apoptose und die Migration von Immun- und Stammzellen untersucht sowie therapeutische Verfahren evaluiert werden (50 und Publikation 3). Dank der kurzen Halbwertszeit des Reporters ($t_{1/2}$ =3h bei 37°C) sind repetitive Untersuchungen am *selben* Tier auch engmaschig und in Echtzeit möglich. Dies verringert die statistische Variabilität im Vergleich zur Untersuchung jeweils unterschiedlicher Gruppen von Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten erheblich. Biolumineszenz-Imaging unter Verwendung der Glühwürmchen-Luciferase als Reporter hat gegenüber anderen Imaging-Methoden mehrere Vorteile: [1] die Technik ist hochsensitiv (Nachweisgrenze *in vivo*: 10^{-15} - 10^{-17} Mol Luciferase/L) und entdeckt Tumorzellen in einem Stadium, in dem sie mit Radiografie bzw. PET nicht detektiert werden können (51,52), [2] es wird, anders als bei PET und MRI, keine große technische Expertise benötigt und [3] BLI ist

schneller und billiger als die meisten anderen Imaging-Techniken. Im Vergleich zum Fluoreszenz-Imaging, bei dem die Autofluoreszenz mit dem zu untersuchenden Signal massiv interferieren kann, ist der Hintergrund bei Biolumineszenz vernachlässigbar (49). Derzeit werden große Anstrengungen unternommen, ein dreidimensionales BLI mit rotierenden CCD-Kameras zu entwickeln. Dies würde eine bessere räumliche Zuordnung des emittierten Lichtsignals ermöglichen.

Fluoreszenz

Optische Bildgebung mit Fluoreszenz stellt eine Alternative zum BLI dar. Anders als bei diesem muss hier kein Substrat zugeführt werden. Auf der anderen Seite wird für das Verfahren eine externe Lichtquelle zur Anregung des Reporters benötigt. Sowohl das zur Anregung verwendete (meist blaue) Licht als auch das vom Reporter emittierte Licht müssen Gewebe penetrieren und können dadurch in ihrer Intensität abgeschwächt werden, was die Quantifizierung der Lichtemission erheblich erschwert. Ein weiteres Problem ist die hohe Autofluoreszenz, die durch endogene Fluorophore wie Nicotinamid, Collagen und Flavine verursacht wird und eine genaue Quantifizierung und Lokalisation der Lichtemission oft unmöglich macht (53).

Fluoreszenzproteine als Reporter zu verwenden, hat den Vorteil, dass diese auch durch Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können, so dass zusätzliche Methoden für die Validierung von Versuchsergebnissen zur Verfügung stehen. In den letzten Jahren wurden mehrere rotes Licht emittierende Fluoreszenzproteine (red fluorescent proteins, RFPs) generiert, deren Lichtemission deutlich weniger durch Hämoglobin und Autofluoreszenz beeinflusst wird als die des klassischen „Green Fluorescent Protein“ (GFP, λ_{\max} 508 nm) aus der Qualle *Aequorea Victoria* (54,55). Bei längerer Lichtanregung neigen alle Fluoreszenzproteine zu Photobleichung, allerdings in erheblich unterschiedlichem Ausmaß. Auch dies kann die Quantifizierung der Lichtemission erschweren.

Wie bereits oben erwähnt, ist das Nahinfrarot-Spektrum (700-900 nm) besonders für das Imaging tieferer Gewebsschichten geeignet. Inzwischen wurden hierfür durch Kopplung an Peptide gequenchte Fluorochrome entwickelt, die durch Nahinfrarot-Licht aktiviert werden können (56). Nachteil dieser Art von Reportern ist, dass sie extern zugeführt werden müssen, demnach also bei einmaliger Gabe durch Zellteilung und Abbau ein Auswascheffekt entsteht. Die neu entwickelte Fluoreszenz-vermittelte Tomografie im Nahinfrarot-Bereich erlaubt dank besserer Gewebegängigkeit des Lichts in diesem Wellenlängenbereich inzwischen sogar das Imaging ganzer Tiere und Organe.

Quantum dots

Unter „Quantum dots“ verstand man bis vor kurzem ausschließlich neu entwickelte nanometergroße fluoreszierende Partikel, die an Peptide bzw. Makromoleküle wie z.B. Antikörper gekoppelt für das in vivo Imaging verwendet werden konnten (57). Die große Auswahl an unterschiedlich farbigen (inkl. nahinfraroten) Quantum dots erlaubt ein simultanes Imaging verschiedener biologischer Prozesse, wobei eine externe Lichtanregung weiter notwendig ist. Da hierfür wie oben dargestellt blauwelliges Licht verwendet wird, bleiben Probleme wie hoher Hintergrund (Autofluoreszenz) und Lichtabsorption weiter bestehen.

Seit kurzer Zeit existieren nun auch biolumineszente „self-illuminating“ Quantum dots für das In-vivo-Imaging (58). Hierfür wurden fluoreszierende Quantum dots an Renilla-Luciferase gekoppelt und das Phänomen des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET) ausgenutzt: Bei Umsatz des Substrats Coelenterazin setzt die Luciferase Energie frei, mit der benachbarte Fluorophore zur Lichtemission angeregt werden. Vorteil dieser Quantum dots ist, dass keine externe Lichtquelle zur Anregung notwendig ist.

Positronenemissionstomografie

Die Positronenemissionstomografie (PET) bildet diejenige γ -Strahlung tomografisch ab, die von zerfallenden Isotopen bei Abgabe eines Positrons freigesetzt wird. Im Gegensatz zur optischen Bildgebung mit Fluoreszenz und Biolumineszenz hat die PET bereits breite Anwendung in der Klinik gefunden. Die Sensitivität dieses Verfahrens wird mit ca. 1×10^{-11} – 1×10^{-12} Mol/L Reporterprobe angegeben, die Auflösung liegt bei 2 mm (49).

Das nichtinvasive Imaging der HSV-TK-Aktivität mithilfe der PET und Radionukliden wie z.B. ^{124}I -FIAU (2'-Fluoro-2'-Desoxy-1 β -D-Arabinofuranosyl-5-Jod-Uracil) wurde inzwischen publiziert, erfordert jedoch teure Spezialgeräte, große Expertise und aufgrund des raschen Isotopenzerfalls ein Zyklotron vor Ort (59). Ray et al. verglichen die beiden Imaging-Methoden BLI und PET unter Verwendung eines aus HSV-TK und Renilla-Luciferase bestehenden Fusionsproteins (60). Untersucht wurden subkutan in Mäuse implantierte Neuroblastomzellen, die stabil das Fusionsprotein exprimierten. Die Korrelation beider Reporteraktivitäten war gut ($r^2=0,89$), das BLI erwies sich jedoch als wesentlich sensitiver bei der Entdeckung kleiner Tumore: Die durch PET detektierbare minimale Anzahl von Tumorzellen lag um mehrere Log-Stufen höher als bei BLI.

MRI

Die Kernspintomografie (MRI) misst die Veränderungen der Resonanzfrequenz von Wasserstoffatomen, die in ein starkes Magnetfeld eingebracht werden. Sie besitzt mit 25 – 100 μm eine hohe räumliche Auflösung und hat inzwischen breiten Eingang in die Klinik

gefunden (49). Für Tierexperimente wurden Micro-MRI-Systeme entwickelt, aber hohe Anschaffungs- und Betriebskosten, die notwendige große Expertise und lange Imaging-Zeiten erlauben nur wenigen Zentren die Anwendung dieser Technik. Das Magnetresonanz-Imaging weist mit $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-5}$ Mol/L detektierbarer Reporterprobe eine deutlich geringere Sensitivität als PET und BLI auf (49). Rehemtulla et al. verglichen MRI und BLI von intracerebral in Ratten implantierten Luciferase-markierten Gliomen (61). Das durch MRI bestimmte Tumolvolumen und die mittels BLI detektierte Lichtemission korrelierten zunächst gut ($r^2 = 0,83$). Nach einer antitumoralen Therapie zeigte sich allerdings eine deutlich geringere Korrelation von Biolumineszenz- und Magnetresonanzbild. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass BLI nur lebende Tumorzellen detektiert, während sich im MRI auch infiltrierende Wirtszellen, Ödem, Nekrose und Hämorrhagien darstellen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Fluoreszenzproteine als Fusionspartner des Suizidgens Herpes simplex Virus

Typ 1-Thymidinkinase (HSV-TK)

Das HSV-TK-Gen kodiert für ein Protein von 375 Aminosäuren, das mehrere nukleäre Lokalisierungssignale enthält und wahrscheinlich einen Homodimer bildet (62). Da nur HSV-TK-Dimere in der Lage sind, ein spezielles nukleäres Lokalisierungssignal auszubilden, werden aller Wahrscheinlichkeit nach auch nur diese zum Kern transportiert (63).

“Enhanced“ GFP (EGFP, 27 kD) ist eine mutierte Form des GFP, die 35-fach intensiver fluoresziert als GFP (64). Zum Zeitpunkt der hier dargestellten Untersuchungen (Publikation 1) war das rot fluoreszierende Protein (RFP) DsRed soeben aus der Koralle *Discosoma* kloniert und kommerziell als DsRed1 verfügbar gemacht worden (65). Das 28 kD schwere Protein DsRed wird bei 558 nm angeregt, hat sein Emissionsmaximum bei 583 nm und emittiert einen bedeutenden Anteil an Licht im Bereich >600 nm. Während GFP monomer ist und relativ rasch nach seiner Synthese fluoresziert, bildet DsRed1 ein kompaktes Tetramer (ca. 115 kD), dessen Chromophorreifung bis zu 48 Stunden benötigt (66). DsRed besitzt eine ca. 24%ige Sequenzhomologie zu GFP und ist diesem strukturell sehr ähnlich. Die Fusion von DsRed mit anderen Proteinen kann Einfluss auf deren Funktion und Lokalisation haben, aller Wahrscheinlichkeit nach bedingt durch die Ausbildung von Tetrameren bzw. Aggregaten höherer Ordnung (67-69). Dabei begünstigen N-terminal gelegene basische Reste von DsRed die Ausbildung von Salzbrücken zwischen benachbarten Tetrameren und dadurch die Aggregation. Yanushevich et al. generierten bei DsRed durch Einführung von 3 Mutationen im Bereich dieser basischen Reste (R2A, K5E, K9T) ein Protein (DsRed2) mit deutlich geringerer Tendenz zur Aggregation (70). Eine weitere DsRed-Variante (dsdrFP616), deren Lichtemission durch Mutagenese in Richtung noch rotwelligeres Licht

verschoben wurde, wurde von Fradkov et al. beschrieben (71). DsdrFP616 wird bei 583 nm angeregt, λ_{\max} der Lichtemission liegt bei 616 nm. DsdrFP616 weist eine 96%ige Homologie zu DsRed2 auf, besitzt jedoch, anders als DsRed2, keine N-terminal mutierten Sequenzen.

Unsere Studie beschreibt Aktivität und subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen bestehend aus dem Suizidgen HSV-TK (TK) und den Fluoreszenzreportern EGFP, DsRed1, DsRed2 und dsdrFP616, die wir für das Monitoring der HSV-TK-Aktivität in Gliomzellen generiert hatten. Mit Ausnahme von EGFP-TK befindet sich die HSV-TK jeweils am N-Terminus der unten beschriebenen Fusionsproteine.

Nach transienter Transfektion von *unfusioniertem* DsRed1, DsRed2, dsdrFP616 und EGFP in humane Glioblastom-, HEK293 (humane embryonale Nierenzellen), NIH3T3 Zellen (embryonale Mausfibroblasten) und Rattenhepatozyten fluoreszierten sowohl Zytoplasma als auch Nukleus homogen. Bei Zellen, die TK-DsRed2- und TK-dsdrFP616-Fusionsproteine exprimierten, fanden sich reichlich fluoreszierende Aggregate innerhalb von 30 h nach Transfektion (Abb. 3). Obwohl der HSV-TK-Anteil beider Fusionsproteine identische nukleäre Lokalisationssignale enthielt, waren fluoreszierende TK-DsRed2-Aggregate vorwiegend nukleär sichtbar, wohingegen TK-dsdrFP616 sich zu massiven polymorphen Aggregaten im Zytoplasma angehäuft hatte, ohne jegliche Anfärbung des Zellkerns (Abb. 3).

Zellen, die das TK-DsRed1-Fusionsprotein exprimierten, fluoreszierten ebenfalls überwiegend im Zytoplasma, die Aggregatbildung war jedoch deutlich geringer als bei TK-dsdrFP616 (Abb. 4). Die bekannte Tendenz von dsdrFP616 aus Lösungen auszufallen (71), könnte für die beobachtete intrazelluläre Verteilung von TK-dsdrFP616 verantwortlich sein. DsdrFP616 alleine neigt sogar stärker als DsRed1 zur Aggregatbildung, während bei N-terminal mutiertem DsRed (=DsRed2) keine Aggregate auftreten. Wie bei DsRed2 (s.o.) führten Mutationen des N-Terminus auch bei dsdrFP616 zu einer verminderten Aggregatbildung (70). Der Fusionspartner DsRed2, der N-terminal mutiertem DsRed(1) entspricht, scheint den nukleären Transport von Proteinen, die nukleäre Lokalisationssequenzen enthalten, zu begünstigen, aller Wahrscheinlichkeit nach aufgrund der verminderten Aggregatbildung (Abb. 3).

Während die Fluoreszenz bei mit EGFP-TK transfizierten Zellen homogen und auf den Zellkern begrenzt war, fluoreszierten bei mit TK-EGFP transfizierten Zellen sowohl Zytoplasma als auch Zellkern (Abb. 4). Offensichtlich ist für den intrazellulären Transport eines Proteins die *genaue* Position der nukleären Lokalisierungssignale entscheidend. Genau wie TK-EGFP und EGFP-TK konnte auch TK-DsRed2 die nukleären Poren passieren (Abb. 3). Da jedoch TK-DsRed2, im Gegensatz zur mit EGFP fusionierten HSV-TK, intranukleär präzipitiert, reichen wahrscheinlich die N-terminal bei DsRed2 eingeführten Mutationen (s.o.) nicht aus, um die nukleäre Aggregation des Fusionsproteins zu verhindern.

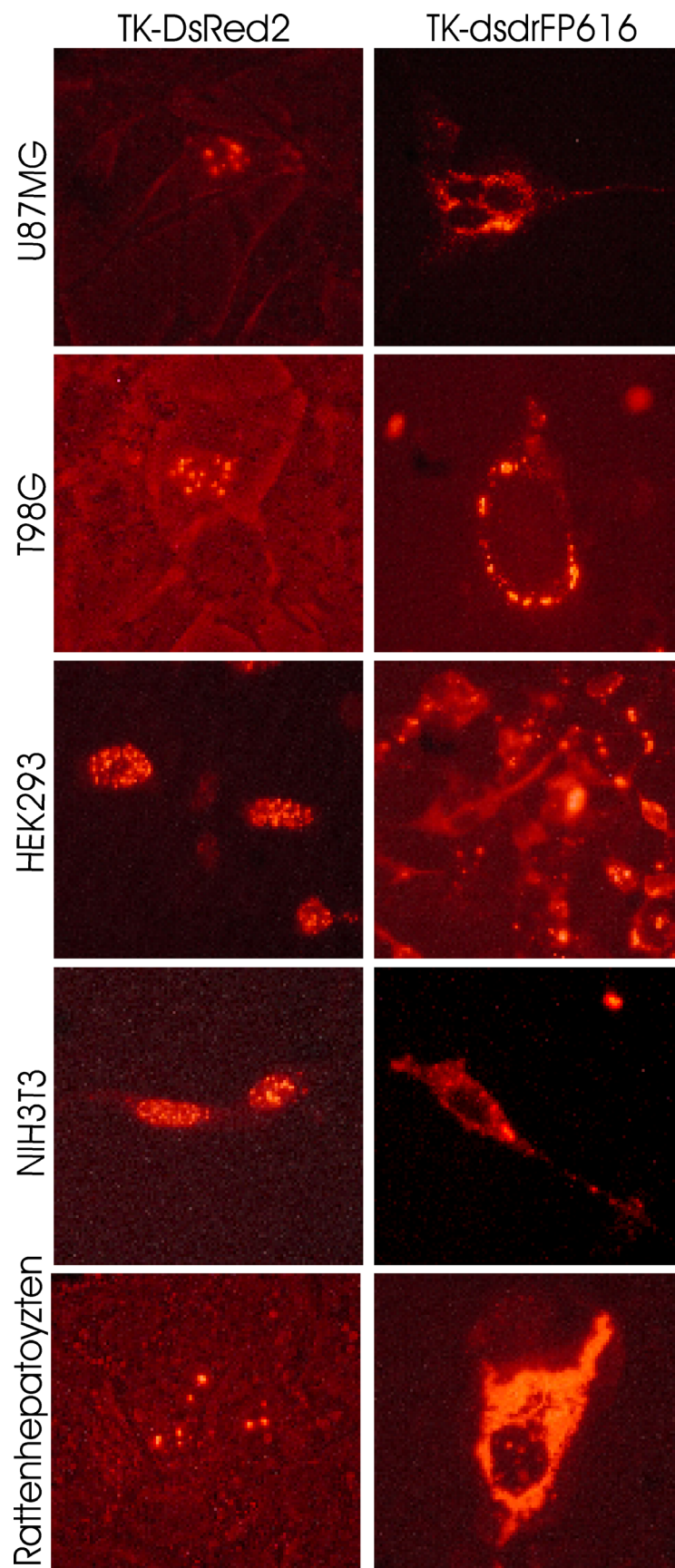


Abb.3 Expression von TK-dsdrFP616 und TK-DsRed2 in verschiedenen Zelllinien. Während TK-DsRed2 in uniformen Aggregaten nukleär lokalisiert ist, lagert sich TK-dsdrFP616 in massiven polymorphen Aggregaten im Zytosol aller getesteten Zelllinien ab. (Publikation 1)

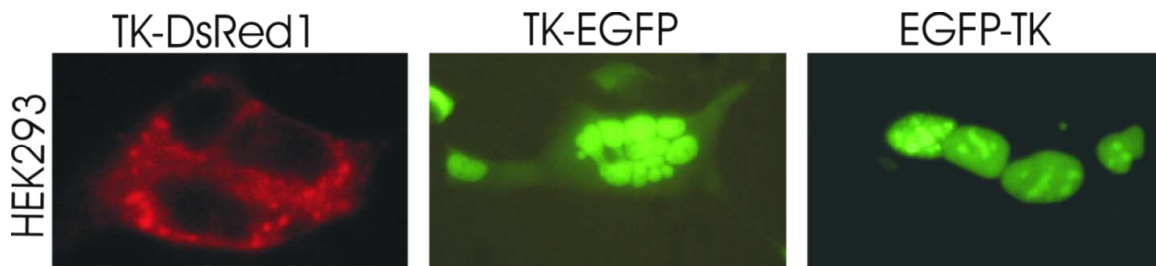


Abb.4 Expression von TK-DsRed1, TK-EGFP und EGFP-TK in HEK293 Zellen. TK-EGFP und EGFP-TK sind nukleär lokalisiert, während TK-DsRed1 in polymorphen Aggregaten im Zytosol unter Aussparung des Zellkerns zu finden ist. Die homogenen intranukleären Signalanreicherungen bei EGFP-TK entsprechen „nuclear bodies“ wie sie auch auftreten, wenn unfusioniertes EGFP mit einer nukleären Lokalisierungssequenz versehen wird. (Publikation 1)

Rettung (“rescue”) von HSV-TK-RFP-Fusionsproteinen

Lauf et al. hatten ein “Rescue“-Verfahren beschrieben, durch das die perinukleäre Aggregation von an DsRed1 gekoppelten Connexinen verhindert werden konnte (69). Normalerweise bilden Connexine oligomere “gap junction“-Kanalproteine in Plasmamembranen. Die korrekte Lokalisation der DsRed-markierten Proteine konnte erreicht werden, indem unfusionierte oder an EGFP fusionierte Connexin-cDNA kotransfiziert wurde. Dieser Effekt nahm mit steigender Dosis an kotransfizierter cDNA zu.

Uns interessierte, ob diese Rettungsstrategie auch im Falle unserer TK-RFP-Konstrukte hilfreich war. Dazu kotransfizierten wir TK-DsRed1, TK-DsRed2 und TK-dsdrFP616 mit EGFP, HSV-TK oder TK-EGFP in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:1 und 1:3) in humane U87MG Gliom- und HEK293 Zellen. Kotransfektion von TK-DsRed1 und TK-dsdrFP616 mit EGFP resultierte in einer homogeneren Anfärbung des Zytoplasmas, wohingegen eine nukleäre Fluoreszenz nur gelegentlich bei Zugabe hoher Dosen EGFP zu beobachten war (Abb. 5). Dieser Effekt war bei TK-DsRed1 stärker ausgeprägt als bei TK-dsdrFP616. Durch Kotransfektion von TK-DsRed2 und EGFP ließ sich der Anteil an Zellen mit homogen fluoreszierenden Zellkernen deutlich erhöhen und war umso höher, je mehr EGFP kotransfiziert wurde (Abb. 5).

Ausgehend davon, dass EGFP und DsRed die selbe Faltung aufweisen und der vermuteten Fähigkeit von RFPs zu heterooligomerisieren (72,73), weisen unsere Untersuchungen darauf hin, dass EGFP RFPs bei der Oligomerbildung ersetzen kann und dadurch Tetramerisierung und Ausbildung von Aggregaten höherer Ordnung verhindert werden. Kotransfiziertes (unfusioniertes) EGFP fördert den *nukleären* Transfer RFP-markierter HSV-TK offensichtlich nicht, da es die HSV-TK-Dimerisierung nicht unterstützt. Diese Dimerisierung ist jedoch die Voraussetzung für den nukleären Transfer der Fusionsproteine (63,74). Kotransfektion der 3 HSV-TK-RFP-Fusionskonstrukte mit HSV-TK alleine hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die homogene intrazelluläre Verteilung roter Fluoreszenz, der aber geringer war als bei Kotransfektion von EGFP (Abb. 5). Möglicherweise erlaubt die Dimerisierung RFP-markierter HSV-TK mit unfusionierter HSV-TK dem RFP-Teil immer noch die Ausbildung von

Oligomeren bzw. größeren Aggregaten. Andererseits begünstigt die Kotransfektion von HSV-TK, im Gegensatz zu EGFP, bei einem molaren Verhältnis von 1:3 (TK-RFP:HSV-TK) den nukleären Transfer von HSV-TK-RFP-Fusionsproteinen (Abb. 5), vermutlich aufgrund der Dimerbildung von HSV-TK mit den HSV-TK-RFPs.

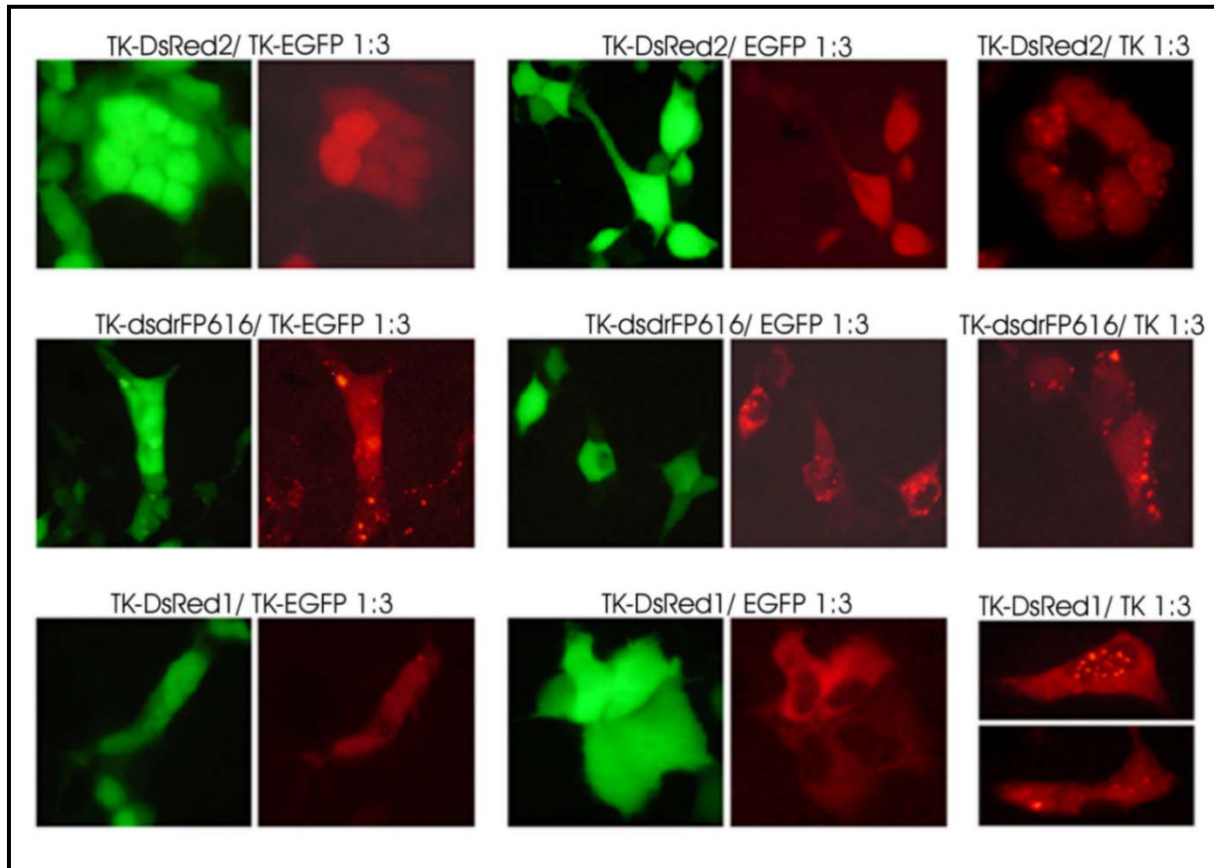


Abb.5 Kotransfektion von mit DsRed2, DsRed1 oder dsdrFP616 fusionierter HSV-TK mit HSV-TK, EGFP oder TK-EGFP in HEK293 Zellen (molares Verhältnis 1:3). Der stärkste Effekt auf die Löslichkeit RFP-markierter HSV-TK wird durch Kotransfektion von TK-EGFP erreicht. (Publikation 1)

Der stärkste und eindrucksvollste Effekt auf die Löslichkeit und nukleäre Transferrate von HSV-TK-RFP-Fusionsproteinen wurde durch Kotransfektion von TK-EGFP erzielt (Abb. 5). Er war sowohl in humanen U87MG Glioblastom- als auch in HEK293 Zellen zu beobachten und nahm mit steigender Menge an kotransfizierter TK-EGFP-cDNA zu. TK-DsRed2 war nun homogen im Kern praktisch aller kotransfizierten Zellen verteilt (Abb. 5). Bei TK-DsRed1 und TK-dsdrFP616 führte kotransfiziertes TK-EGFP ebenfalls zu einer erheblich verbesserten Löslichkeit und zu einem deutlich gesteigerten nukleären Transfer der Fusionsproteine. Aufgrund deren starker Neigung zur Aggregatbildung (71) ließ sich jedoch keine vollständig homogene Anfärbung der Zellen erreichen (Abb. 5). TK-EGFP scheint die positiven Effekte auf Löslichkeit und intrazelluläre Verteilung RFP-markierter HSV-TK, die jeweils mit kotransfizierter HSV-TK bzw. EGFP alleine beobachtet werden, zu vereinen: Während der EGFP-Anteil die Löslichkeit der RFP-Fusionsproteine erhöht, fördert der HSV-TK-Anteil weniger die RFP-Löslichkeit als vielmehr den Transport des TK-RFP-Heterodimers in den

Zellkern. Da bei TK-EGFP-Kotransfektion intranukleär keine rot fluoreszierenden Riesenaggregate auftraten, scheint Heterodimerisierung die Quervernetzung von TK-RFP-Fusionsproteinen zu Aggregaten höherer Ordnung zu verhindern.

DsRed ist in Lösung ein obligater Tetramer (66). Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen war jedoch unklar, ob Oligomerisierung eine Voraussetzung für die Fluoreszenz des Proteins ist. Unsere dargestellten Befunde legten nahe, dass rote Fluoreszenz auch von Oligomeren emittiert werden kann, die weniger als 4 RFPs enthalten. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse von Lauf et al. (s.o.; 69) in Bezug auf ihre Kotransfektionsexperimente mit DsRed-markiertem Connexin gestützt.

Stabile Expression von HSV-TK-RFP-Fusionsproteinen

Während humane Glioblastomzellklone, die stabil DsRed1, DsRed2, EGFP, dsdrFP616 und TK-EGFP exprimierten, problemlos etabliert werden konnten, war es bei mehreren humanen Glioblastomzelllinien nicht möglich, *stabil* mit DsRed1, TK-DsRed2 oder TK-dsdrFP616 transfizierte Klone zu generieren.

Bei HEK293 Zellen konnte lediglich ein Klon, der TK-DsRed2 stabil exprimierte, etabliert werden. Auch bei diesem Klon waren fluoreszierende Aggregate sichtbar, diese Zellen besaßen jedoch HSV-TK-Aktivität und wurden durch GCV abgetötet. U87MG Glioblastomzellen, die HSV-TK bzw. TK-EGFP stabil exprimierten, waren ebenfalls sensitiv gegenüber GCV. HEK293 Zellen, die unfusionierte HSV-TK exprimierten, waren weniger sensitiv gegenüber GCV als HSV-TK exprimierende U87MG Gliomzellen. Dies liegt wahrscheinlich in Zelltyp-spezifischen Eigenschaften begründet, da dieser Effekt unabhängig davon auftrat, ob fusionierte oder unfusionierte HSV-TK exprimiert wurde (Publikation 1).

Mit dieser Arbeit haben wir einen wichtigen Beitrag zur zellbiologischen Forschung geleistet, der unter anderem von Roger Tsien, dem Mentor der RFP-Forschung, in einem Übersichtsartikel gewürdigt wurde (75). Proteintransport und Proteininteraktionen innerhalb einer Zelle werden häufig unter Verwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzproteine als Fusionspartner studiert. Hierbei wird sehr oft nicht berücksichtigt, dass alleine schon der Typ des angehängten Fluoreszenzproteins Lokalisation und Funktion des Kandidatenproteins sowie dessen Wechselwirkung mit anderen Molekülen beeinflussen kann.

Weiterhin erhärteten unsere Befunde die Vermutung, dass die Ausbildung einer Tetramerstruktur nicht Bedingung für die Fluoreszenz der RFPs ist. Dies wurde später von der Gruppe von Roger Tsien bestätigt, der es durch Mutagenese gelang, ein *monomeres* RFP zu erzeugen, das fluoreszierte, wenn auch relativ schwach (76).

Wir demonstrierten, dass HSV-TK-RFP-Fusionsproteine für gentherapeutische Studien in humanen Gliomzellen genutzt werden können. Der erfolgreiche Einsatz dieser Reporter setzt

allerdings voraus, dass deren Neigung zu Aggregation minimiert wird. Dies kann entweder durch Verwendung von (mutierten) RFPs mit geringer Tendenz zu Oligomerisierung oder durch Koexpression anderer Proteine geschehen.

3.2 Evaluation einer Herpes simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase-Gentherapie von Glioblastomen mithilfe des Biolumineszenz-Imaging

Die folgende Studie (Publikation 2) belegt erstmals im Sinne eines "proof of concept", dass die Bildgebung mit Biolumineszenz für die noninvasive In-vivo-Evaluation einer Suizidgentherapie mit HSV-TK/GCV geeignet ist. Hierzu konstruierte ich ein chimäres Fusionsprotein bestehend aus dem Biolumineszenz-Reporter (Glühwürmchen-)Luciferase und HSV-TK. Wir konnten anhand eines Mausmodells eines menschlichen Glioms erstmals nachweisen, dass ein HSV-TK-Luciferase-Fusionsprotein in Verbindung mit GCV-Gabe Gliome vollständig eliminieren und gleichzeitig als Reporter für das noninvasive Imaging und die Quantifizierung der Transgenaktivität (und damit indirekt der Tumortoxizität) eingesetzt werden kann. Die von uns entwickelte Methode stellt somit ein attraktives Werkzeug dar, um gentherapeutische Strategien bzw. Transgenexpression verlässlich und repetitiv über einen längeren Zeitraum zu quantifizieren.

Das HSV-TK-Luciferase-Fusionskonstrukt

Um eine strikt stoichiometrische Koexpression von therapeutischem Transgen (HSV-TK) und Reporter (Luciferase) zu garantieren, wurden die korrespondierenden cDNAs aneinander fusioniert. Dieser Ansatz wurde von uns bevorzugt, da bei Koexpression zweier *separater* Transgene, ausgehend von entweder einem oder 2 Promotoren, die korrelierte Expression der beiden Proteine stark beeinträchtigt sein kann. Ursachen hierfür können eine ineffiziente „internal ribosomal entry site“ (IRES)-Translation, Promotorinterferenz oder unterschiedliche Halbwertszeiten der Proteine sein (71,77,78).

Das Fusionskonstrukt, bei dem die HSV-TK N-terminal lag, war in ersten Tests deutlich effektiver als das Konstrukt, bei dem sich Luciferase am N-Terminus befand. Für die im Folgenden dargestellten Versuche verwendeten wir daher ausschließlich das HSV-TK-Luciferase (HSV-TK-Luc)-Konstrukt. Dieses sowie die für HSV-TK und Luciferase kodierenden cDNAs wurden *in vitro* äquimolar in unterschiedlichen Mengen transient und stabil in menschliche U87MG Gliomzellen transfiziert. Die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten wurden miteinander verglichen. In *transient* mit HSV-TK-Luc transfizierten Zellen korrelierten zytotoxische (HSV-TK-) Aktivität und Lichtemission (Luciferase-Aktivität) eng miteinander ($R^2 = 0.99$; $p < 0.0001$), was die Grundvoraussetzung für die Verwendung der Luciferase als In-vivo-Reporter für den zytotoxischen Effekt des HSV-TK/GCV-Systems ist.

Im Vergleich zu unfusionierter HSV-TK besaß das Fusionskonstrukt ca. 60% deren zytotoxischer Aktivität. Die Luciferase-Aktivität des Fusionsproteins betrug ca. 22% der Aktivität unfusionierter Luciferase.

Wir stellten zusätzlich *stabil* HSV-TK-Luc-exprimierende U87MG-Zellklone her. Der Klon mit der höchsten sowohl zytotoxischen als auch Luciferase-Aktivität wies im Vergleich zu den aktivsten nur HSV-TK bzw. Luciferase exprimierenden U87MG-Zellklonen ca. 84% deren HSV-TK-Aktivität und ca. 41% deren Lichtemission auf. Lichtemission und Zellzahl korrelierten bei diesem HSV-TK-Luc-markierten U87MG-Zellklon über mindestens 5 Größenordnungen ($R^2 = 0.99$; $p < 0.001$), aber auch im MTT-Zytotoxizitätsassay in Abhängigkeit von der applizierten Dosis an GCV ($R^2 = 0.94$; $p = 0.029$).

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse führten wir mit dem oben charakterisierten HSV-TK-Luc-exprimierenden U87MG-Zellklon Xenograftexperimente in Nacktmäusen durch. Dazu wurden pro Maus je 4 HSV-TK-Luc U87MG-Tumore gesetzt (Abb. 6). Bei einem Tumordurchmesser von ca. 5 mm (ca. Tag 7-9) wurde die GCV-Therapie initiiert und diese über 14 Tage fortgeführt ($n = 7$ Tiere). Kontrolltiere ($n=3$) erhielten eine Salzlösung.

Serielle parallele Messungen von Lichtemission (CCD-Kamera) und Tumolvolumen (Schieblehre) wurden miteinander verglichen (Abb. 7) und zeigten eine sehr gute Korrelation ($R^2 = 0.93$; $p = 0.008$). Innerhalb der 2 Wochen GCV-Behandlung zeigte sich bei den therapierten Mäusen ein mittlerer Abfall der Lichtemission von $92 \pm 7\%$ (Abb. 7A) bei gleichzeitiger Verringerung des Tumolvolumens von im Mittel $65 \pm 19\%$ (Abb. 7B). Alle GCV-behandelten Mäuse überlebten; Tumorrezidive traten bis Tag 90 (Ende der Studie) nicht auf. Auch bei den 3 Kontrollmäusen, die alle bis zu Woche 6 wegen massiven Tumorwachstums getötet werden mussten, bestand bis zu Tag 35 eine sehr gute Korrelation zwischen Lichtemission und Tumolvolumen ($R^2 = 0.98$; $p = 0.01$; Abb. 6B). Lediglich bei sehr großen Tumoren ($>12-15$ mm \varnothing) nahm das Tumolvolumen wesentlich stärker zu als die Lichtemission, was auf die Ausbildung intratumoraler Nekrosen und Blutungen zurückgeführt wurde: An großen explantierten Tumoren der Kontrollmäuse konnten wir mithilfe des BLI bestätigen, dass hämorrhagische und nekrotische Areale eine deutlich geringere Lichtemission aufwiesen als vitales Tumorgewebe. Immunohistochemisch ließ sich eine verringerte Expression von Luciferase in diesen Arealen darstellen.

Die Tatsache, dass Mäuse mit HSV-TK-Luc exprimierenden U87MG Gliomen durch GCV-Gabe vollständig geheilt wurden, wohingegen die selben U87MG Gliomzellen *in vitro* auch durch hohe Dosen (10 $\mu\text{g/ml}$) GCV nicht vollständig eliminiert werden konnten, könnte auf eine Rolle des Immunsystems für die Elimination der Tumorzellen *in vivo* hinweisen. Es wurde mehrfach gezeigt, dass HSV-TK-exprimierende Tumorzellen Ziel einer cytotoxischen „Natural Killer“ (NK) –Zellantwort bei GCV-behandelten Mäusen (auch Nacktmäusen) sein können (79,80).

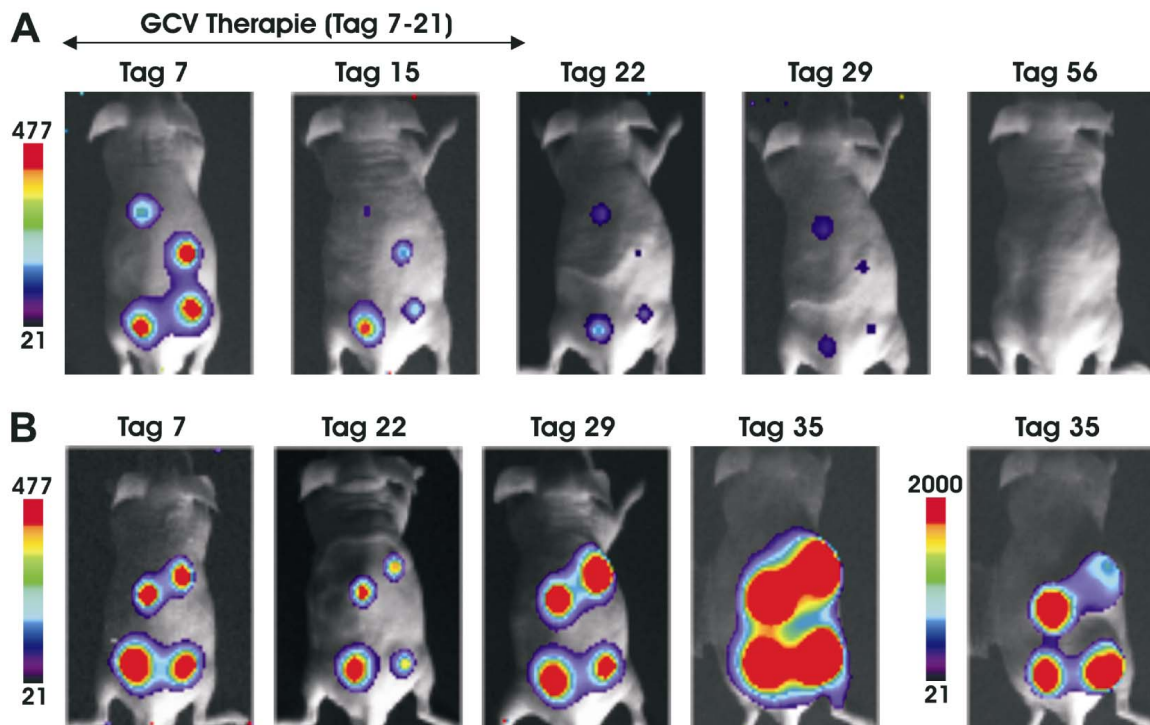


Abb.6 Biolumineszenz-Imaging von Nacktmäusen, denen jeweils vier HSV-TK-Luciferase exprimierende U87MG-Gliome subkutan implantiert worden waren. A, Maus, die 14 Tage lang Ganciclovir intraperitoneal erhielt. B, Kontrollmaus, die unbehandelt blieb und wegen massiven Tumorwachstums nach der letzten Aufnahme getötet werden musste. (Publikation 2)

Die bei unserem HSV-TK-Luc Fusionskonstrukt festgestellten im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen reduzierten Aktivitäten können einerseits auf sterischer Behinderung beruhen, andererseits könnte die von uns immunhistochemisch nachgewiesene prädominante Lokalisation des HSV-TK-Luc-Fusionsproteins im Zytosol eine Rolle spielen, da unfusionierte HSV-TK als Homodimer überwiegend nukleär lokalisiert ist (s.o.). Auch Ray et al. (60) berichteten von einer um 80% reduzierten HSV-TK Aktivität nach Fusion des Enzyms an Renilla-Luciferase. Neuroblastomzellen, die das Fusionsprotein exprimierten, konnten sowohl mittels BLI als auch mittels PET (HSV-TK als Reporter) nachgewiesen werden, die zytotoxische Aktivität der HSV-TK wurde allerdings nicht untersucht. Die Renilla-Luciferase-Aktivität lag bei dem Fusionskonstrukt 6- bis 8-fach höher im Vergleich zu unfusionierter Renilla-Luciferase. Da Renilla-Luciferase mit 36 kD deutlich kleiner als Glühwürmchen-Luciferase (62 kD) und mit dieser strukturell nicht verwandt ist, können diese Daten nur eingeschränkt mit unseren Ergebnissen verglichen werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass der Versuch der Autoren, HSV-TK und *Glühwürmchen*-Luciferase zu fusionieren zu einem nur schwach aktiven („poorly active“) Fusionsprotein führte.

Nach Abschluss unserer Arbeiten berichteten mehrere Gruppen über von ihnen konstruierte Tripelfusionsproteine, die aus einer Luciferase, einem Fluoreszenzprotein und HSV-TK bestanden (81,82) und für das simultane Imaging mit Biolumineszenz, Fluoreszenz und PET verwendet wurden. Die zytotoxische, also therapeutische Aktivität des HSV-TK-Anteils wurde

in diesen Studien nicht evaluiert. Der von Ray et al. (81) nach transienter Transfektion von HEK293 Zellen durchgeführte Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von 4 Fusionskonstrukten mit denen der unfusionierten Enzyme zeigte, dass die Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität 22–63% der Aktivität unfusionierter Luciferase betrug, was unsere bei U87MG Zellen erhobenen Befunde bestätigte. Bei einem der 4 Fusionskonstrukte entsprach die HSV-TK-Reporteraktivität in der PET der von unfusionierter HSV-TK, die übrigen 3 Konstrukte wiesen um 39 bis 70% reduzierte Enzymaktivitäten im Vergleich zu HSV-TK auf. Auch diese Daten passen zu unseren Befunden bei U87MG Zellen. Da die verminderten enzymatischen Aktivitäten im Fusionskonstrukt wahrscheinlich vor allem auf sterischer Behinderung beruhen (die Verbindungssequenz zwischen HSV-TK und Luciferase besteht aus 11 Aminosäuren), könnten längere Linkersequenzen bzw. die Einführung eines flexiblen Polyglycinlinkers eine Steigerung der Enzymaktivitäten bewirken (60,83).

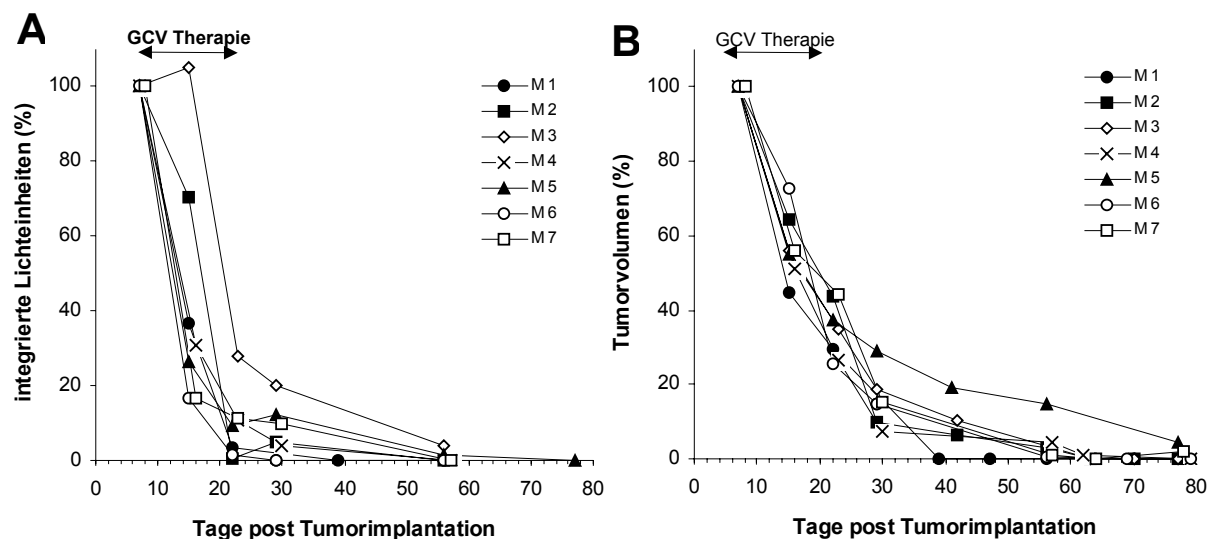


Abb.7 Vergleich von Photonenemission (A) und Tumolvolumen (B) bei den 7 mit Ganciclovir (GCV) behandelten Mäusen mit HSV-TK-Luciferase exprimierenden humanen U87MG-Gliomen. Ganciclovir (60 mg/ kg pro Tag) wurde von Tag 7 bis Tag 21 intraperitoneal verabreicht. Tumolvolumen und Lichtemission bei Therapiebeginn (Tag 7) wurden als 100% gesetzt. Publikation 2.

Zusammengefasst hat unsere Studie erstmals gezeigt, dass Glühwürmchen-Luciferase als sensitiver Reporter für die Wirksamkeit des Prodrug-aktivierenden Systems HSV-TK/GCV *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden kann. Um näher an der klinischen Situation zu sein, wurde das Fusionskonstrukt inzwischen in einen adenoviralen Vektor ligiert. Untersuchungen an U87MG Gliomzellen in Kultur belegen, dass HSV-TK- und Luciferase-Aktivität nach Transduktion dieses adenoviralen Konstrukts ebenfalls dosisabhängig miteinander korrelieren. Die Sicherheit eines derartigen Vektors bei Anwendung *in vivo* könnte durch die Verwendung gewebs- bzw. tumorspezifischer Promotoren (z.B. GFAP-, Survivin-, Nestin-Promotor) weiter erhöht werden (84,85).

3.3 Chemotherapie maligner Gliome

Maligne Gliome gelten im Allgemeinen als wenig sensibel gegenüber Chemotherapeutika. Die Wertigkeit fast aller großen Therapiestudien ist allerdings limitiert, da bei ihnen anaplastische Gliome (WHO Grad 3) und Glioblastome (WHO Grad 4) meist zusammengefasst wurden. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise dafür, dass anaplastische Astrozytome WHO Grad 3 eine höhere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika aufweisen als Glioblastome (86).

Die Standardtherapie bei Gliomen basiert vor allem auf dem Mechanismus der DNA-Schädigung z.B. durch Bestrahlung oder alkylierende Substanzen wie z.B. Carmustin (BCNU), die Tripelkombination Procarbazin, Cisplatin, Vincristin (PCV) oder Temozolomid (TMZ). Chemotherapeutika können *in vitro* die Apoptose von Gliomzellen induzieren. Dies wird über die Aktivierung von Caspasen unabhängig vom Todesrezeptor-Signalweg sowie über die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien vermittelt (87,88).

Bei einer Subpopulation von Patienten mit malignem Astrozytom und bei Patienten mit Oligodendrogliom wurde der Verlust der Chromosomen 1p/ 19q in Verbindung mit einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie gebracht (89). Ebenso scheint der Methylierungsstatus des O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (MGMT) -Promotors ein prädiktiver Marker für die Wirksamkeit der Chemotherapie zu sein (90,91).

Temozolomid

Temozolomid ist ein oral verabreichbares Alkylans, das gut die Bluthirnschranke penetriert. Es können Liquorkonzentrationen von bis zu 40% des Plasmaspiegels erreicht werden. Nebenwirkungen sind Myelotoxizität, Infektionen, gastrointestinale Beschwerden, Exanthem und Müdigkeit. Temozolomid (TMZ) war bisher vor allem erfolgreich in der Behandlung *rekurrenter* anaplastischer Astrozytome und Glioblastome eingesetzt worden (92). Kürzlich konnte im Rahmen einer großen Studie (21) an 573 Glioblastompatienten gezeigt werden, dass die Kombination von Bestrahlung und TMZ zu einer signifikanten, wenn auch nur moderaten Lebensverlängerung führte: Das mediane Überleben von Patienten, die nur radiotherapiert worden waren, lag bei 12,1 Monaten gegenüber 14,6 Monaten bei Patienten, die die kombinierte Therapie erhielten ($p < 0,001$). Zwei Jahre nach kombinierter Radio-/ TMZ-Therapie hatten 26,5% der behandelten Patienten überlebt, wohingegen in der Gruppe, die nur Radiotherapie erhielt, zu diesem Zeitpunkt 10,4% der Patienten am Leben waren. Patienten mit hoher MGMT-Aktivität im Tumor zeigten eine geringere Sensitivität gegenüber TMZ und überlebten kürzer als Patienten, deren Tumor einen methylierten MGMT-Promotor aufwies (13 versus 22 Monate mediane Überlebenszeit; 21,91).

Möglicherweise könnten durch einen „molekularen Fingerabdruck“ Gliompatienten identifiziert werden, die besonders gut auf eine Therapie mit TMZ ansprechen. So konnte

z.B. für die Gruppe der anaplastischen Oligodendrogliome (WHO Grad 3) gezeigt werden, dass die chromosomalen Deletionen 1p und 19q mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber PCV einhergehen (93,94). Wemmert et al. (95) wiesen kürzlich nach, dass Glioblastome mit Deletionen in den Chromosomen 9p und 10q signifikant besser auf eine Therapie mit TMZ ansprechen als Glioblastome, bei denen diese Deletionen nicht nachweisbar waren. Dies ist umso bemerkenswerter als diese Deletionen bei Patienten mit Glioblastom eigentlich mit einer schlechten Prognose verknüpft sind (95).

Mechanismen der DNA-Reparatur

Die antitumorale Aktivität von Alkylantien wird durch die Bildung verschiedener DNA-Addukte vermittelt, was zu einer gestörten DNA-Replikation und Zelltod führt. So wird durch TMZ unter anderem auch die O⁶-Position von Guanin alkyliert. Ein entscheidender prädiktiver Faktor für die Sensitivität gegenüber TMZ ist demnach die MGMT. Die MGMT ist ein Reparaturprotein, das spezifisch die promutagenen Alkylgruppen von der O⁶ Position des Guanins in der DNA entfernt (96). Dadurch schützt MGMT die Zelle vor der Karzinogenität alkylierender Agentien. Die Reparatur von O⁶-Alkyladdukten durch die Tumorzellen trägt zur Resistenz gegenüber der durch alkylierende Chemotherapeutika vermittelten Zytotoxizität bei. Die MGMT-Expression variiert stark intra- und intertumoral. Bei Patienten mit malignem Gliom ging der Verlust der MGMT-Expression durch Promotor-Hypermethylierung mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temozolomid (97) und einem besseren Überleben einher (91). Hierbei scheint eine protrahierte TMZ-Verabreichung (1x täglich über 21 Tage) auch niedriger Dosen besonders geeignet zu sein, um die Reaktivierung des MGMT-Gens zu verhindern (98). Die Autoren schlussfolgern, dass Glioblastompatienten, bei denen der MGMT-Promotor nicht methyliert vorliegt, gar nicht bzw. nur marginal von einer TMZ-Therapie profitieren (91).

Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren

Ribonucleotidreduktase (RR) reduziert Ribonukleosiddiphosphate zu Desoxyribonukleosiden und ist das Geschwindigkeits-limitierende Enzym der DNA-Synthese. Für zahlreiche Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass deren proliferative Kapazität eng mit der RR-Aktivität assoziiert ist (99). Das Enzym stellt daher ein attraktives Angriffsziel für die Chemotherapie von Krebserkrankungen dar. Hydroxyurea, das sich insbesondere bei myeloproliferativen Erkrankungen bewährt hat, ist sicher der bekannteste RR-Inhibitor.

Trimidox (3,4,5-Trihydroxy-benzohydroxamidoxim) und Didox (3,4-Dihydroxy-benzohydroxaminsäure) sind zwei relativ neue spezifische Inhibitoren der RR, deren Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzellen wie z.B. Leukämie-, Colonkarzinom-, Brustkrebs- und Ovarialkarzinomzellen bereits in vitro und in vivo belegt wurde (100-102).

Ihre inhibitorische Wirkung auf die RR üben Didox und Trimidox vor allem durch das Abfangen freier Radikale, aber auch die Bindung von Eisen aus, da Eisen Kofaktor der R2-Untereinheit der RR ist. Weiterhin wirken beide RR-Hemmer proapoptotisch durch Induktion der Cytochrom C-Freisetzung und Aktivierung von Caspasen (103,104).

Wir setzten beide Medikamente alleine und in Kombination mit TMZ bei verschiedenen malignen humanen Gliomzelllinien ein (Publikation 4). Ziel unserer Untersuchungen war, herauszufinden, inwieweit die Medikamente synergistisch auf Glioblastomzellen wirken und die kombinierte Behandlung von TMZ mit RR-Hemmern eine Dosisreduktion der einzelnen Wirkstoffe erlaubt.

Alle 3 Substanzen wirkten gegenüber den getesteten Glioblastomzellen cytotoxisch, wobei Didox sich als besonders potent erwies. In allen Zelllinien ließen sich synergistische Effekte für die Kombination von RR-Hemmern mit TMZ nachweisen, die folglich bei kombinierter Gabe eine deutliche Dosisreduktion der Einzelkomponenten erlauben würden. In Abhängigkeit von der gewählten Dosierung der Medikamente und der getesteten Zelllinie ließen sich vereinzelt auch additive und (bei sehr hohen Dosen) sogar antagonistische Effekte nachweisen. Zytotoxische Wirkung und Synergismus waren unabhängig vom p53-Status der Zelle (Wildtyp, mutiertes oder deletiertes p53). Der synergistische Effekt der RR-Hemmer könnte auf deren Fähigkeit beruhen, den für die Reparatur der Temozolomid-induzierten DNA-Schäden benötigten Vorrat an dNTPs zu reduzieren und an der DNA-Reparatur beteiligte Gene herunterzuregulieren (105).

3.4 Tumor-assoziierte Antigene bei Tumoren des ZNS und beim Neuroblastom

Das Zentralnervensystem (ZNS) galt lange Zeit als immunologisch privilegiert. Hierfür wurden neben der Bluthirnschranke vor allem der Mangel an lymphatischem Gewebe, eine niedrige Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) im Hirnparenchym und immunregulatorische Faktoren verantwortlich gemacht. Inzwischen ist gesichert, dass bei Erkrankungen des ZNS (Tumor, Entzündung, Infarkt etc.) die MHC-Expression hochreguliert wird und cytotoxische T-Lymphozyten, aber auch andere Immunzellen, sehr wohl die Bluthirnschranke überwinden und eine effektive Immunantwort induzieren können (106). Für Gliome konnte allerdings gezeigt werden, dass sie durch verschiedene Mechanismen der Immunüberwachung entgehen und letztlich eine T-Zellanergie bewirken können. Unter anderem exprimieren sie immunmodulatorische „Human Leukocyte Antigen“ (HLA)-G Moleküle und sezernieren immunsuppressive Faktoren wie z.B. TGF- β oder Prostaglandin E₂. Entfernung des Tumors kann eine zumindest partielle Reaktivierung cytotoxischer T-Lymphozyten bewirken (106).

Molekulare Marker bei Hirntumoren

Die Etablierung neuer Tumormarker ermöglicht die Identifikation von Zielstrukturen für eine (immun)therapeutische Intervention und die Erstellung molekularer „Tumorprofile“. In Verbindung mit klinischen Parametern könnten derartige Profile helfen, für jeden Patienten eine maßgeschneiderte Therapie zu entwickeln. Dies erscheint insbesondere bei Gliomen sinnvoll, da diese eine starke inter- und intratumorale Heterogenität in Bezug auf die Expression Tumor-assoziiierter Antigene aufweisen. Derartige Antigene können hilfreiche Werkzeuge für die Detektion, Typisierung und Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen darstellen und zusätzlich dabei helfen, das Ansprechen auf bestimmte Therapien vorherzusagen. Auf der anderen Seite können Patienten-eigene, gegen diese Tumor-assoziierten Antigene gerichtete Autoantikörper ebenfalls als sensitive Sonden für Diagnose und Verlauf einer Krebserkrankung dienen (107).

Tumor-assoziierte Antigene, die eine cytotoxische Anti-Tumorantwort auslösen können, sollten im Idealfall mithilfe in vitro generierter autologer T-Zellen identifiziert werden können (108). Diese sogenannte T-Zell-Epitopklonierung gelang auch in einzelnen Fällen, insbesondere beim relativ leicht zu kultivierenden und als besonders immunogen geltenden Melanom (108). Wie bereits für zahlreiche andere Tumore gezeigt, ist es jedoch äußerst schwierig, primäre Tumorzellen und T-Zellen von Gliompatienten in vitro über einen längeren Zeitraum zu kultivieren (109,110).

Um biologisch und/ oder prognostisch relevante Tumormarker, aber auch Zielstrukturen für Immuntherapien bei Hirntumoren zu identifizieren, etablierten wir in unserer Gruppe das serologische Immunoscreening (111,112) rekombinanter in *E. coli* exprimierter Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit Seren von Gliompatienten. Die RNA zur Herstellung dieser Banken hatten wir aus menschlichem Glioblastomgewebe gewonnen. Diese Methode der Antigensuche hat die Identifizierung Tumor-assoziiierter Antigene bedeutend vorangebracht, da hierfür die (meist diffizile) Etablierung primärer Tumor- bzw. T-Zelllinien nicht erforderlich ist. Nachteil von aus humanen Geweben hergestellten und in *E. coli* exprimierten cDNA-Banken ist, dass *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder Disulfidbrückenbildung vornehmen, so dass folglich nicht alle Tumor-assoziierten Antigene in der *E. coli*-Expressionsbank repräsentiert sind. Wir haben daher inzwischen in unserem Labor zusätzlich das serologische Immunoscreening von zweidimensional über Gele aufgetrennten und auf Polyvinylidenfluorid-Membranen transferierten Gliom- bzw. Gliomzelllinienproben etabliert.

Die in *E. coli* exprimierte cDNA-Bank wird auf Nitrocellulosefilter transferiert, die Filter werden anschließend mit Patientenserum inkubiert und gebundenes IgG wird mithilfe eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörpers und einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Da uns autologes Serum nicht zur Verfügung stand, führten wir das serologische

Immunoscreening der in *E. coli* exprimierten Glioblastom-cDNA-Expressionsbank mit insgesamt 9 allogenen Seren von Patienten mit Glioblastom (n=8) bzw. anaplastischem Astrozytom (n=1) durch. Screening von 1×10^6 Plaques führte zur Identifikation von insgesamt 20 mit Serum von Hirntumorpatienten reagierenden Plaques. Fünf der Plaques repräsentierten cDNAs, die für den Replikationsinitiationsfaktor „Minichromosome maintenance“ (MCM) Protein 3 kodierten (Publikation 5). Damit konnten wir erstmals zeigen, dass Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie immunogen für Krebspatienten sind.

MCM3

Bei Eukaryonten findet die DNA-Replikation asynchron an verschiedenen Stellen des Genoms während der S-Phase des Zellzyklus statt. In der G₁-Phase des Zellzyklus formieren sich der Origin recognition complex (ORC), die „cell division cycle 6/18“ (Cdc6/Cdc18) Proteine, das „cell division cycle 10-dependent transcript 1“ (Cdt1) Protein, sowie die „Minichromosome maintenance“ (MCM) Proteine 2-7 zum Präreplikationskomplex, der auf die DNA geladen wird. Die Helicase-Aktivität dieses Komplexes führt zur Abwicklung der DNA und dadurch zur Lizenzierung des Chromatins, so dass Komponenten der Elongationsmaschinerie (z.B. DNA-Polymerasen) an diese Replikationsgabel binden können (Abb. 8). Die anschließende Dissoziation des Komplexes von der DNA in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus stellt sicher, dass die DNA nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird.

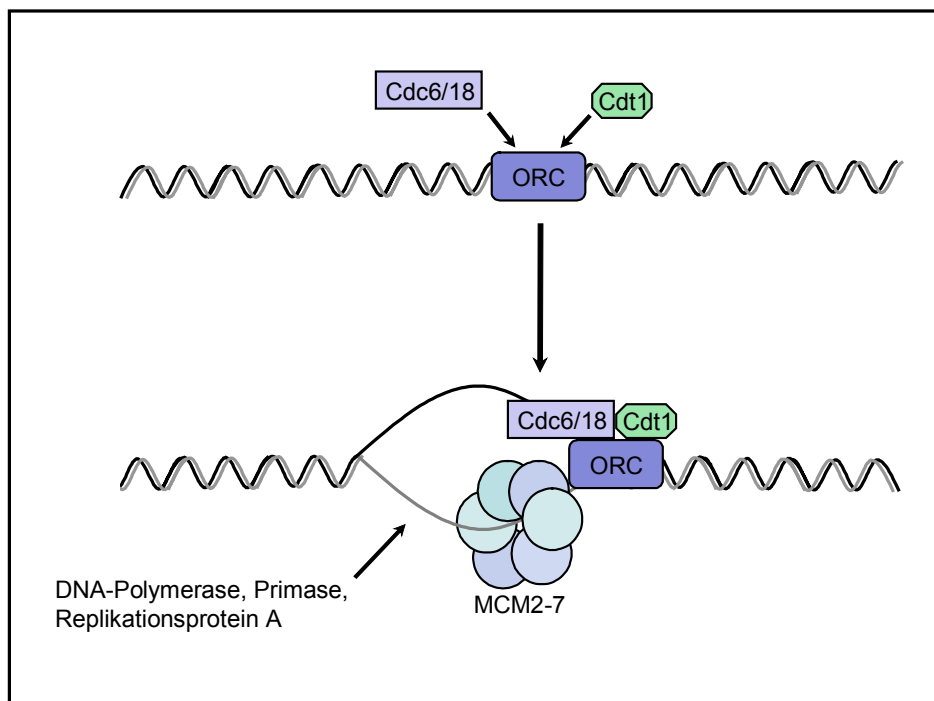


Abb.8 Initiation der DNA-Replikation. Der an den „DNA-Origin“ gebundene „Origin Erkennungs-komplex“ ORC rekrutiert die „cell division cycle 6/18“ Proteine (Cdc6/18) und das „cell division cycle 10-dependent transcript 1“(Cdt1) Protein. Dieser Komplex leitet die Bindung des MCM2-7-Hexamers an Chromatin ein und damit die Bildung des Präreplikationskomplexes. Nachdem der aktivierte MCM-Proteinkomplex mittels seiner Helicase-Aktivität die DNA abgewickelt hat, erfolgt die DNA-Replikation.

Die MCM-Proteine sind zueinander stark homolog und weisen alle eine konservierte Nukleotid-bindende Domäne von ca. 200 Aminosäuren auf. MCM-Proteine finden sich in sich teilenden, nicht jedoch in differenzierten bzw. seneszenten Zellen. Für verschiedene MCM-Proteine konnte gezeigt werden, dass deren Expression das proliferative Kompartiment eines Tumors häufig sehr viel besser erfasst als etablierte Proliferationsmarker wie z.B. Ki67 oder „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) und bei vielen Krebserkrankungen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist (113).

MCM3 (105 kD) kodiert für ein nukleäres Protein von 808 Aminosäuren. Das Protein ist hochreguliert in proliferierenden Zellen, während es in seneszenten bzw. differenzierten Zellen kaum vorkommt (114). Endl et al. wiesen nach, dass sowohl MCM3 als auch der in der histologischen Routinediagnostik verwendete Proliferationsmarker Ki67 in den Keimzentren humaner Tonsillen, aber nicht in deren nicht proliferierender Mantelzone vorkommen (115). Zusätzlich fand sich MCM3, im Gegensatz zu Ki67, in der intermediären, nicht proliferierenden Epithelschicht der Tonsillen, was den Schluss zulässt, dass MCM3 nicht nur sich aktiv teilende Zellen markiert, sondern auch Zellen, die gerade erst den Zellzyklus verlassen haben, aber immer noch fähig sind, wieder in diesen einzutreten. Die MCM3-Expression in dysplastischen, prä malignen und neoplastischen Geweben spiegelt daher wahrscheinlich deren proliferative Kapazität besser wider als Ki67, das nur aktiv sich teilende Zellen markiert. Williams et al. demonstrierten, dass bei Cervixdysplasien 80–100% der Zellen MCM5 exprimieren, jedoch nur 3 bis 8% der Zellen mit Ki67 bzw. PCNA markiert sind (116).

MCM3 induziert eine humorale Immunantwort bei Patienten mit Hirntumor

Wir überprüften insgesamt 89 Seren von Astrozytompatienten und 8 Seren von Patienten mit anderen Hirntumoren sowie 30 Seren von gesunden Probanden in einer Verdünnung von 1:300 hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber MCM3 im Plaque-Assay (Abb. 9).

Während Kontrollseren und Seren von Patienten mit Astrozytomen der WHO Grade 2 und 3 (n=34) keine MCM3-spezifischen Antikörper aufwiesen, reagierten 7 von 55 (12,7%) Seren von Glioblastompatienten mit MCM3. Zusätzlich fanden sich MCM3-spezifische IgGs bei einem Patienten mit ZNS-Lymphom und einem Patienten mit Hirnmetastasen bei Lungenkarzinom. Zwei der Seren von Glioblastompatienten reagierten auch bei einer Serumverdünnung von 1:1.000 bzw. 1:25.000 mit MCM3. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Tumore dieser beiden Patienten deutlich mehr als 50% MCM3-positive Tumorzellen enthielten (Tabelle 2).

Bei 51 Patienten mit Astrozytom lagen sowohl der serologische Test als auch eine MCM3-Immunhistochemie des Tumors vor. Keiner der 7 Patienten, bei denen $\leq 10\%$ der Tumorzellen MCM3-positiv waren, entwickelte anti-MCM3-Antikörper, was vermuten lässt,

dass ein gewisses Niveau an intratumoraler MCM3-Expression notwendig ist, um eine Immunantwort auszulösen. Umgekehrt hatten nur 4 von 21 (19%) Patienten mit >50% MCM3-positiven Tumorzellen MCM3-spezifische Antikörper, so dass sich schlussfolgern lässt, dass eine hohe Antigenexpression per se nicht zwangsläufig zur Antikörperbildung führt.

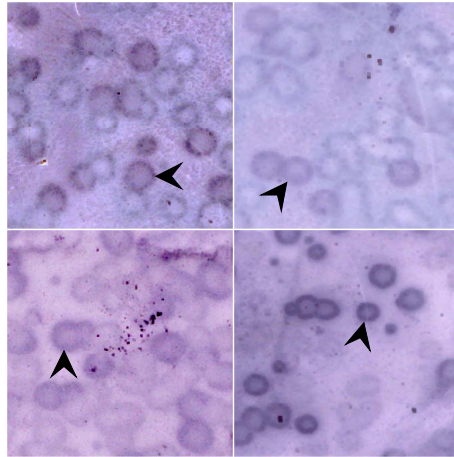


Abb.9 Beispiel für 4 positive Plaque-Assays. *E. coli* wurden mit einem Gemisch aus Phagen, die MCM3-cDNA enthielten und Kontrollphagen ohne cDNA-Insert infiziert und auf Agarplatten ausplattiert. Nach Blotten der Platten auf Nitrocellulosemembranen wurden kleine Filterstücke (ca. 3x3 cm) mit Seren von Gliompatienten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Dargestellt sind Filter von 4 verschiedenen Patienten. Die Pfeile markieren jeweils einen seropositiven MCM3-haltigen Plaque (dunkle Kreise).

Da die Expression der DNA-Replikationsmaschinerie Zellzyklus- und damit Proliferations-abhängig ist, interessierte uns die Frage, inwieweit MCM3 ein prognostischer Marker bei Astrozytomen sein könnte. Wir untersuchten deshalb 142 primäre Astrozytome (WHO Grad 2 (n=27), anaplastische Astrozytome (n= 50), Glioblastome (n=65)) immunhistochemisch hinsichtlich der Expression von MCM3 und korrelierten die Ergebnisse mit klinischen Parametern (Publikation 5). Die MCM3-Expression korrelierte mit dem Alter der Patienten ($p < 0,001$) und dem Tumor-Grad gemäß WHO ($p < 0,001$), nicht jedoch mit dem Geschlecht des Patienten ($p = 0,800$). In Normalhirn ließ sich MCM3 so gut wie nicht nachweisen.

Bei 114 Patienten mit Astrozytomen der WHO-Grade 2-4 lagen uns Überlebensdaten vor. Die Regressionsanalyse nach Cox ergab, dass eine hohe MCM3-Expression sowohl univariat als auch multivariat (unter Einbeziehung der Parameter Geschlecht, Alter und Histologie) einen negativen Prognosefaktor darstellt ($p < 0,001$; Abb. 10). Während bei Patienten mit malignem Astrozytom und >10% MCM3-positiven Tumorzellen im Tumor nur 31,9% mehr als ein Jahr überlebten, waren nach einem Jahr noch 73,9% derjenigen Patienten am Leben, deren Tumor <10% MCM3-positive Tumorzellen aufwies.

Wenn die Überlebensanalyse für Patienten mit anaplastischem Astrozytom (n=31) bzw. Glioblastom (n=54) getrennt erfolgte, trat ein bemerkenswerter Befund zutage (Abb. 11): Eine hohe MCM3-Expression im Tumor erwies sich als signifikanter negativer Prognosefaktor bei Patienten mit anaplastischem Astrozytom ($p = 0,006$), nicht jedoch bei

Glioblastompatienten ($p= 0,430$), obwohl der mittlere MCM3-Markierungsindex (LI) mit $54 \pm 3,8\%$ (Bereich 5-90%) bei Glioblastompatienten deutlich über dem von Patienten mit anaplastischem Astrozytom lag ($30,3 \pm 4,7\%$, Bereich 0-70%). Für Ki67 konnte dagegen bei keiner der beiden Subgruppen eine prognostische Bedeutung nachgewiesen werden.

Tabelle 2 Liste der Patienten mit Anti-MCM3-Antikörpern im Serum

Nr.	Diagnose	maximaler Seruntiter mit MCM3-positiver Immunreaktion	MCM3-positive Tumorzellen (%) ^a	Intensität der MCM3-Färbung im Tumor ^a
1	Glioblastom	1:25.000	75-90	stark
2	Glioblastom	1:1000	51-75	stark
3	Glioblastom	1:100	51-75	stark
4	Glioblastom	1:100	50-60	stark
5	Glioblastomrezidiv	1:100	25-50	mittel
6	Glioblastom	1:100	10-25	mittel
7	Glioblastom	1:100	n.v. ^b	n.v. ^b
8	ZNS-Lymphom	1:100	15-25	stark
9	Hirnmetastase (Adenokarzinom d. Lunge)	1:100	25-35	stark

^a Die MCM3-Immunohistochemie erfolgte an Tumoren, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme reseziert wurden. ^b n.v. = nicht verfügbar.

Ausgehend davon, dass MCM3 das proliferative Kompartiment eines Tumors besser erfasst als Ki67 (115), lässt sich schlussfolgern, dass Tumorwachstum für Patienten mit anaplastischem Astrozytom ein wichtigeres prognostisches Merkmal darstellt als für Patienten mit Glioblastom.

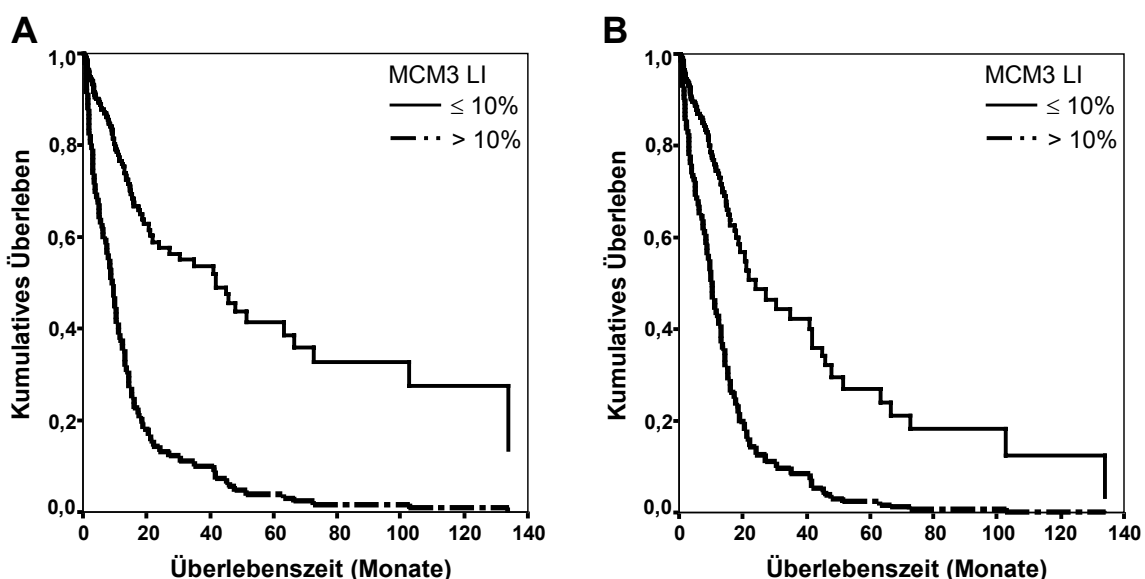


Abb.10 Univariate (A) und multivariate (B) Cox-Reggressionsanalyse des Überlebens von Patienten mit Astrozytom der WHO Grade 2-4, deren Tumor $\leq 10\%$ oder $> 10\%$ MCM3-positive Tumorzellen enthält. In die multivariate Analyse (B) wurden die Parameter Geschlecht, Alter und histologischer Tumorgrad eingeschlossen. LI, Markierungsindex. (Publikation 5)

Bei diesen scheinen vor allem Charakteristika wie invasives und migratorisches Verhalten der Tumorzellen, Angiogenese und Apoptoseresistenz entscheidende Prognosefaktoren zu sein. Dazu passt auch, dass für invasiv wachsende Gliomzellen gezeigt werden konnte, dass diese eine verminderte Teilungsfähigkeit und eine erhöhte Apoptoseresistenz aufweisen im Vergleich zu nichtwandernden Gliomzellen (117).

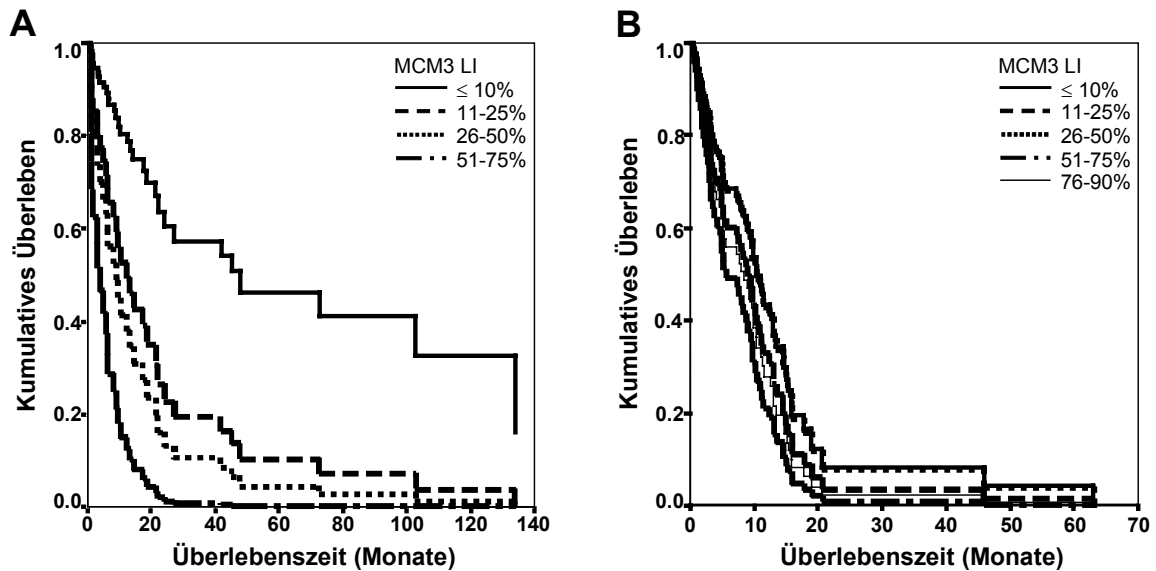


Abb.11 Univariate Cox-Regressionsanalyse der Überlebenszeit von Patienten mit anaplastischem Astrozytom (A) und Glioblastom (B) stratifiziert nach unterschiedlichem MCM3-Markierungsindex (LI) der Tumore. MCM3 erwies sich als signifikanter negativer prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit anaplastischem Astrozytom ($p=0,006$), nicht jedoch von Patienten mit Glioblastom ($p=0,430$; Publikation 5).

Für den Vergleich der Expression des in der Routine üblicherweise verwendeten Proliferationsmarkers Ki67 mit der Expression von MCM3 standen uns 91 primäre Astrozytome zur Verfügung (WHO Grad 2: $n=19$, WHO Grad 3: $n=29$, WHO Grad 4: $n=43$). Die Expression beider Proteine korrelierte signifikant miteinander ($p<0,001$), es waren jedoch bei allen 3 histologischen Graden signifikant mehr Tumorzellen durch MCM3 als durch Ki67 markiert. Auch diese Befunde unterstützten die Vermutung, dass MCM3 (noch) teilungsfähige Tumorzellen besser identifiziert als Ki67. In der univariaten Analyse erwies sich eine hohe Ki67-Expression als negativer prognostischer Marker für Überleben ($p<0,001$). In der multivariaten Analyse unter Einbeziehung von Geschlecht, Alter, Histologie (\pm MCM3-Expression) konnte für Ki67, im Gegensatz zu MCM3, kein prädiktiver Wert nachgewiesen werden ($p=0,385$).

Eine hohe MCM3-Expression war bei Patienten mit malignem Astrozytom der WHO Grade 3 ($n=19$) und 4 ($n=37$) auch signifikant mit dem früheren Auftreten eines Rezidivs verbunden (univariat: $p=0,010$; multivariat (unter Einbeziehung von Geschlecht, Alter und Histologie): $p=0,011$; Trennwert $\leq 50\%$ MCM3-positive Tumorzellen). Patienten ($n=42$) mit einem Rezidiv innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung hatten im Mittel $45,8 \pm 4,5\%$ MCM3-

positive Tumorzellen, während Patienten (n=14), deren Tumor später als 1 Jahr rezidierte, im Mittel $26,8 \pm 4,5\%$ MCM3-positive Tumorzellen aufwiesen (p=0,006).

MCM3 wurde bei anderen Krebserkrankungen bisher nicht hinsichtlich seiner Eignung als prognostischer Marker untersucht. Dagegen liegen immunhistochemische Studien zu MCM2, MCM5 und MCM7 bei zahlreichen Krebsarten wie z.B. Brust-, Lungen-, Blasen- und Nierenkrebs vor. Diese Untersuchungen bestätigen im Allgemeinen unsere Befunde: Die Expression von MCM-Proteinen ist positiv assoziiert mit histologischer Dedifferenzierung, Tumorgrad, Ki-67-Markierungsindex, mitotischem Index, erhöhter Rezidivneigung und schlechter Prognose (118-120).

Unter Berücksichtigung der essentiellen Bedeutung der Replikationsmaschinerie für die Zellteilung könnten MCM-Proteine geeignete Zielstrukturen für eine Antikrebstherapie darstellen. Feng et al. konnten zeigen, dass die Inhibition von MCM2 bei verschiedenen Krebszelllinien (z.B. hepatozelluläres Karzinom, Zervix- und Nasopharyngealkarzinom) Wachstumsstopp und Apoptose induzierte, wohingegen normale L-02 Leberzellen zwar in der G₁-Phase arretiert wurden, funktionell jedoch nicht beeinträchtigt waren (121).

Ein von mir konzipiertes Forschungsprojekt, das sich mit der Unterdrückung der MCM3-Expression durch RNA-Interferenz in Gliomzellen beschäftigt, wurde in diesem Jahr (2006) von der Deutschen Krebshilfe zur Förderung angenommen und wird derzeit bei uns bearbeitet.

Immunreaktion von Hirntumorpatienten auf das Tumor-assoziierte Antigen Survivin

In der im Folgenden dargestellten Studie (Publikation 6) untersuchten wir die humorale Immunantwort auf das Tumor-assoziierte Antigen Survivin bei Patienten mit Meningeom bzw. malignem Gliom, da das Monitoring der Immunantwort auf ein Tumor-assoziiertes Antigen ein wertvolles Instrument für Diagnose und Verlaufskontrolle einer Krebserkrankung sein kann (107). Das Vorhandensein einer spezifischen humoralen Immunantwort ist ausserdem ein überzeugender Hinweis dafür, dass das betreffende Antigen auch eine zelluläre Immunantwort ausgelöst hat, da die Aktivierung von B-Lymphozyten, ebenso wie die Aktivierung cytotoxischer CD8+-T-Lymphozyten, durch CD4+-T-Helferzellen vermittelt wird (122). Eine Vakzinierung gegen Krebs z.B. mit dem universellen Tumorantigen Survivin kann nur dann erfolgreich sein, wenn das Impfantigen eine zelluläre Immunantwort induzieren kann. Im Rahmen unserer Untersuchungen wiesen wir erstmals nach, dass Patienten mit Hirntumor hochtitrige Autoantikörper gegen Survivin bilden können.

Meningeome

Meningeome entwickeln sich aus meningoethelialen (arachnoidalen) Zellen der Meningen. Symptomatische Meningeome repräsentieren ca. 13-26% der primären intrakraniellen Tumore, die Inzidenz liegt bei ca. 6 pro 100.000 (123,124). Die Prävalenz für Meningeome ist bei Frauen doppelt so hoch wie Männern und am höchsten in der fünften bis achten Lebensdekade. Meningeome werden histologisch gemäß der WHO Grade 1 bis 3 aufgeteilt, wobei 80% der Meningeome als gutartige, langsam wachsende WHO Grad 1 Tumore klassifiziert werden. Knapp 20% der Meningeome sind atypische WHO Grad 2 Meningeome, weniger als 2% gehören zu den anaplastischen Meningeomen WHO Grad 3. Atypische und anaplastische Meningeome treten häufiger bei Männern auf, zeigen ein aggressives Wachstum und sind mit einer erhöhten Rezidivneigung und einer schlechteren Prognose assoziiert (125). Meningeome weisen häufig einen Verlust von Chromosom 22 auf. Auf Chromosom 22 findet sich das Neurofibromatose Typ 2 Gen (NF2, Merlin), das bei ca. 50% der sporadischen Meningeome mutiert ist. Die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen wie z.B. Verlust von 1p, 6q, 10q, 14q und 18q geht einher mit der Progression zum atypischen bzw. anaplastischen Meningeom.

Die Standardtherapie bei Meningeomen besteht aus chirurgischer Resektion, bei Rezidivtumoren bzw. malignen Meningeomen ggf. auch in Verbindung mit Bestrahlung. Die Langzeitprognose von Patienten mit Meningeom ist gut, wobei selbst bei Entfernung des Tumors, der umgebenden Dura und des betroffenen Knochens Rezidivquoten von bis zu 20% innerhalb von 10 Jahren beschrieben wurden (126).

Survivin

Apoptoseresistenz ist ein hervorstechendes Merkmal von Krebszellen und wird unter anderem durch die Familie der "Inhibitor of apoptosis" Proteine (IAP) vermittelt. Das 16,5 kD schwere Protein Survivin ist Mitglied der IAP-Familie und inhibiert unter anderem die Caspasen 3, 7 und 9. Inzwischen sind 4 alternative Survivinspleißvarianten bekannt, deren Bedeutung für die Onkogenese jedoch noch weitgehend ungeklärt ist (127,128). Survivin blockiert sowohl die über Todesrezeptoren als auch die über Mitochondrien vermittelten Apoptose-Signalkaskaden und ist zusätzlich in die Regulation der Mitose eingeschaltet. Survivin wird in der G₂/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und interagiert mit der mitotischen Spindel während der Zellteilung. Die Überexpression von Survivin begünstigt die Überwindung bestimmter Mechanismen der Zellzykluskontrolle („checkpoints“) und dadurch ein verlängertes Überleben transformierter bzw. anderweitig geschädigter Zellen, was wiederum zu Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung führt (129). Survivin ist hochreguliert in fötalen Geweben sowie in zahlreichen Krebsgeweben wie z.B. Brust-, Lungen-, Ovarial- und Prostatakarzinom und stellt bei vielen Krebsentitäten einen negativen

Prognosefaktor dar. Dagegen kann Survivin in normalen differenzierten Geweben so gut wie nicht nachgewiesen werden (129). Survivin gilt daher heutzutage als vielversprechende universelle Zielstruktur für eine Krebsvakzinierung.

Meningeome und Gliome weisen eine starke Survivinexpression auf (130-139). Für Meningeome konnte eine prognostische Bedeutung von Survivin bisher nicht belegt werden (130-132), für Gliome ist der prognostische Wert von Survivin umstritten (133-139).

Von Proteinen, die bei der Onkogenese bzw. der Dysregulation des Zellzyklus eine Rolle spielen wie z.B. p53 (140), HER-2/neu (141) oder Cyclin B1 (142) ist bekannt, dass sie eine humorale Immunantwort bei Krebspatienten induzieren können. Für Survivin konnten humorale und zelluläre (zytotoxische) Immunantworten bei Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen werden (143). Derartige Untersuchungen lagen für Patienten mit Hirntumor bisher nicht vor.

Untersucht wurden Seren von 43 Patienten mit Meningeom (n=36 (WHO Grad 1), n=3 (WHO Grad 2), n=4 (ohne Operation)) und 35 Patienten mit malignem Gliom (n=10 (WHO Grad 3), n=25 (WHO Grad 4)) hinsichtlich des Vorhandenseins von Anti-Survivin-Antikörpern. Die Untersuchungen erfolgten mittels ELISA (n=300 Kontrollseren) und Immunblot (n=56 Kontrollseren) in Kooperation mit PD Dr. Marc Schmitz (Inst. für Immunologie, TU Dresden). Zwei der 78 Patientenseren wurden jeweils nur mit ELISA bzw. Immunoblot untersucht. Bei 37 Meningeom- und 26 Gliompatienten konnten ergänzend Survivin-Immunhistochemien der entsprechenden Tumore angefertigt werden.

Im Immunblot (Abb.12, Tabelle 3) reagierten 5 von 42 (11,9%) Seren von Meningeompatienten und 3 von 35 (8,6%) Seren von Gliompatienten bei einer Verdünnung von 1:100 mit aufgereinigtem Survivin. Seren von 56 gesunden Probanden zeigten keine Reaktion.

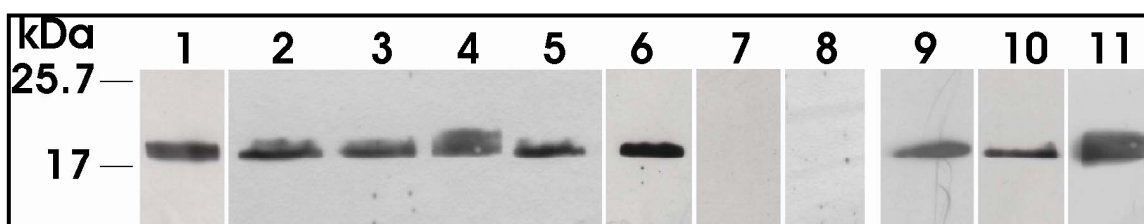


Abb.12 Immunreaktion der 1:100 verdünnten Seren von Meningeom- und Gliompatienten gegenüber rekombinant hergestelltem Survivin (5 µg/ Spur). 1, Positivkontrolle = affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchen-Anti-Survivin-Antikörper AF 886 (R&D); 2-7, Seren von 6 verschiedenen Meningeompatienten; 8, gesunder Proband; 9-11, Seren der 3 Gliompatienten, die immunreaktiv gegenüber Survivin waren.

Im ELISA, der ansich die Standardmethode für derartige Untersuchungen darstellt, wurde mit keinem der Seren, einschließlich der 300 Kontrollseren von gesunden Probanden, ein positives Signal detektiert. Möglicherweise unterscheiden sich die beiden Assays durch Präsentation unterschiedlicher Epitope des Survivinantigens: Während Survivin nach Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen für den ELISA wenigstens partiell

rückgefaltet wurde, wurde für den Immunblot denaturiertes Survivin verwendet. Ein weiterer Grund für die divergenten Befunde kann in dem von uns gewählten hohen Trennwert („cutoff“) des ELISA liegen, den wir als „Mittelwert der Kontrollseren plus 3 Standardabweichungen“ (MW+3 SD) festlegten. Tan et al. (142,144) untersuchten Autoantikörper gegen insgesamt 7 Tumor-assoziierte Antigene bei Krebspatienten mittels ELISA und verglichen hierbei den Trennwert „MW+2 SD“ mit „MW+ 3 SD“. Sie wiesen nach, dass bei stringenterem Trennwert die Spezifität deutlich ansteigt, während die Sensitivität erheblich abnimmt. Schließlich könnten die im Allgemeinen niedrigen IgG-Spiegel von Patienten mit benignen und malignen Hirntumoren, die auf die mangelnde Stimulation von B-Lymphozyten durch CD4+-T-Helferzellen zurückgeführt werden (145), dazu beitragen, dass sehr niedrige Survivin-Antikörpertiter mit unserem ELISA nicht erfasst werden.

Wenn die 8 im Immunblot positiv reagierenden Seren weiter verdünnt wurden, ließ sich bei einer Verdünnung von 1:1000 nur noch für das Serum eines Glioblastompatienten eine Survivin-spezifische Reaktion belegen. Diese war bei einer 1:10.000 Verdünnung nicht mehr nachweisbar (Tabelle 3).

Tabelle 3 Liste der Patienten mit Anti-Survivin-Antikörpern im Serum

Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter (Jahre)	Survivin-positive Tumorzellen (%) ^a	maximaler Serumtiter mit Survivin-positiver Immunreaktion
1	fibroblastisches Meningeom WHO G1	weiblich	64	80-90	1:100
2	meningotheliales Meningeom WHO G1	männlich	55	51-75	1:100
3	psammomatöses Meningeom WHO G1	weiblich	66	60-70	1:100
4	Meningeom (unbekannte Histologie)	männlich	73	n.v. ^b	1:100
5	angiomatöses Meningeom WHO G1 (Rezidiv)	männlich	81	20	1:100
6	Glioblastom	männlich	43	>90	1:1000
7	Glioblastom (Rezidiv)	weiblich	60	25-30	1:100
8	Anaplastisches Astrozytom	weiblich	74	n.v. ^b	1:100

^a Die Survivin-Immunhistochemie erfolgte an Tumoren, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme reseziert wurden. ^b n.v. = nicht verfügbar.

Vier von 35 (11,4%) Patienten mit primärem Meningeom und einer von 7 (14,3%) Patienten mit Meningeomrezidiv wiesen Anti-Survivin-Antikörper auf. Das Auftreten dieser Antikörper war nicht an eine bestimmte Histologie gekoppelt: Bei 4 der 5 Patienten lagen uns Tumorproben vor, die histologisch jeweils als meningothelial, fibroblastisch, psammomatös und angiomatös klassifiziert wurden (Tabelle 3).

Wir konnten keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Anti-Survivin-Antikörpern und dem Ausmaß der Survivinexpression im Tumor feststellen ($p=0,530$). Von den 37 Meningeomen, die uns für die Immunhistochemie zur Verfügung standen, waren 31 (83,8%) positiv für Survivin. Sechszwanzig (70,3%) Tumore enthielten $>10\%$ und 20 (54%) Tumore $>50\%$ Survivin-positive Tumorzellen. Tumore von Patienten, die eine humorale Immunantwort aufwiesen, zeigten zwischen 20 und 90% Survivin-positive Tumorzellen (Tabelle 3, Abb. 13). Patienten, deren Tumor keine Survivinexpression zeigte (6 von 37, 16,2%), entwickelten auch keine humorale Immunantwort gegenüber Survivin. Umgekehrt ließen sich auch bei 10 von 11 (90,9%) Patienten mit 51-75% und 7 von 8 (87,5%) Patienten mit $>75\%$ Survivin-positiven Tumorzellen keine Anti-Survivinantikörper nachweisen.

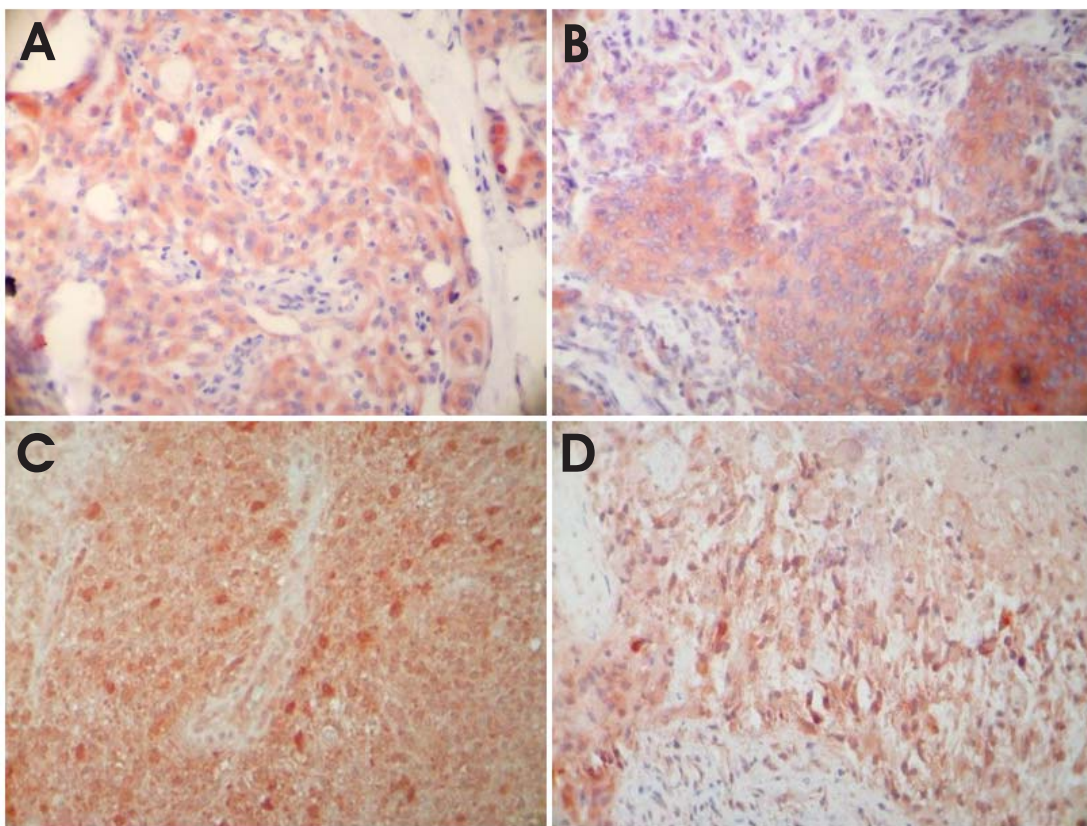


Abb.13 Survivin-Immunhistochemie bei Meningeomen und malignen Gliomen (Vergrößerung: x400). A und B, meningotheliale Meningeome WHO Grad 1; C und D, Glioblastome. Patienten mit den in A und C abgebildeten Tumoren entwickelten Autoantikörper gegen Survivin.

Gegen Survivin gerichtete Antikörper fanden sich auch bei 1 von 10 (10%) Patienten mit anaplastischem Astrozytom, 1 von 21 (4,8%) Patienten mit primärem Glioblastom und 1 von 4 (25%) Patienten mit Glioblastomrezidiv (Tabelle 3, Abb. 12). Alle 26 malignen Gliome, die für eine Immunhistochemie zur Verfügung standen, exprimierten Survivin, nur ein Tumor wies weniger als 10% Survivin-positive Tumorzellen auf. Bei 17 (65,3%) Tumoren waren mehr als 50% der Tumorzellen Survivin-positiv. Bei den 3 Patienten mit Anti-Survivin-Antikörpern konnten 2 Tumore immunhistochemisch untersucht werden (Tabelle 3, Abb. 13).

Auffällig war, dass der Tumor des Glioblastompatienten mit der stärksten Anti-Survivin-Antikörperantwort über 90% Survivin-markierte Tumorzellen aufwies (Abb. 13C), während im anderen Tumor, einem Glioblastomrezidiv, 25-30% der Tumorzellen Survivin-positiv waren. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Tumore derjenigen Hirntumorpatienten, die eine humorale Immunantwort gegen Survivin zeigten, alle mindestens 20% Survivin-positiv Tumorzellen enthielten. Dies unterstützt die These, dass die *Überexpression* eines Proteins, eher noch als Mutationen in der korrespondierenden Gensequenz, eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer humoralen Autoimmunität gegenüber Tumor-assoziierten Antigenen ist (146). Auf der anderen Seite ließen sich bei der Mehrzahl der Meningeom- und Gliompatienten, deren Tumor hochpositiv für Survivin war, keine Survivin-spezifischen Antikörper nachweisen, was zeigt, dass eine hohe Antigenlast alleine nicht ausreicht, um B-Lymphozyten zu stimulieren.

Die von uns gefundenen Survivin-Autoantikörperfrequenzen bei Hirntumorpatienten (11,9% (Meningeom) bzw. 8,6% (malignes Gliom)) passen zu den bisher in der Literatur bei anderen Krebspatienten beschriebenen Befunden. In Abhängigkeit von gewähltem ELISA und Trennwert fanden sich bei 1,2% (hepatozelluläres Karzinom; 147) bis zu exzeptionell hohen 58,1% (Lungenkarzinom; 148) der Patienten gegen Survivin gerichtete Antikörper. Die Prävalenz dieser Antikörper bei Hirntumorpatienten passt zu der Frequenz, die wir oben für MCM3-Autoantikörper bei Astrozytompatienten beschrieben hatten (Publikation 5): 7 von 74 (9,5%) Patienten mit malignem Gliom hatten Anti-MCM3-Antikörper. Obwohl Survivin mit hoher Frequenz in Hirntumoren exprimiert wird, ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass weder wir noch zahlreiche andere Gruppen Survivin jemals durch Immunoscreening von Hirntumor-cDNA-Expressionsbanken mit Seren von Meningeom- bzw. Gliompatienten detektierten (149-151; Publikation 5). Dieses Verfahren beruht zwar ebenfalls auf der Immunblot-Technik, es ist jedoch vorstellbar, dass Antigene, die von Phagen-infizierten *E. coli* exprimiert werden, andere (Konformations-abhängige) Epitope präsentieren als denaturiertes Survivin, das auf Polyacrylamidgele geladen wird.

Um die prognostische Aussagekraft von Tumor-assoziierten Autoantikörpern bei Hirntumorpatienten weiter zu erhöhen, ist für das Immunoscreening der Einsatz von Multi-Antigen-Matrices („Arrays“) sinnvoll, bei denen neben Survivin und MCM3 weitere Tumor-assoziierte Antigene eingeschlossen werden sollten (142,144).

Tumor-assoziierte Antigene bei Neuroblastomen

In einer Arbeit, die in der Kinderklinik der Universität zu Köln angefertigt wurde, untersuchten wir die Expression der 3 „Cancer Testis“ (CT) -Antigene NY-ESO-1, MAGE-1 und MAGE-3 in

98 Neuroblastomen mittels RT-PCR und korrelierten die Befunde mit klinischen Parametern (Publikation 7).

Das Neuroblastom ist ein embryonaler neuroektodermaler Tumor des Kindesalters, der von den Zellen des Nebennierenmarks bzw. den Ganglien des sympathischen Nervensystems ausgeht. Die Inzidenz liegt bei 8 pro 1 Millionen Kinder, das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters. Etwa 96% der Neuroblastome treten innerhalb der ersten 10 Lebensjahre auf. Klinisch variieren die Verläufe von spontaner Regression über Tumormaturierung bis zu Therapie-resistenter Progression. Eine Amplifikation des Onkogens MYCN findet sich bei 25% der Neuroblastome, eine Deletion von Chromosom 1p bei 30–40% und ein Allelverlust von 11q bei 30-50% (152). MYCN-Amplifikation und 1p LOH korrelieren miteinander, aber auch mit einer schlechten Prognose (152). Ebenfalls prognostisch ungünstige Faktoren sind erhöhte Katecholaminmetabolite (Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure) im Urin sowie erhöhte Lactatdehydrogenase und erhöhtes Ferritin im Serum.

Die sogenannten CT-Antigene NY-ESO-1, MAGE-1 und MAGE-3 werden bei zahlreichen Krebserkrankungen exprimiert, nicht jedoch in normalen Zellen abgesehen von Spermatozyten (153). Diese gelten jedoch als immunologisch privilegiert, da sie keine HLA-Moleküle exprimieren. NY-ESO-1, MAGE-1 und MAGE-3, deren Funktion bis heute ungeklärt ist, wurden unter anderem bei Melanomen, Lungen-, Brust-, Ovarial- und Ösophaguskarzinom nachgewiesen (153). Aufgrund ihres restringierten Expressionsmusters stellen CT-Antigene genau wie Survivin potenzielle Zielstrukturen für eine Krebsvakzinierung sowie mögliche diagnostische und prognostische Marker dar. In ersten klinischen Studien, bei denen Melanompatienten mit MAGE- bzw. NY-ESO-1-Antigenen geimpft wurden, wurden bei einigen Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung und Tumorregressionen beobachtet (154-156). Für alle 3 Antigene konnte nachgewiesen werden, dass sie in vivo zelluläre und humorale Immunantworten induzieren können (153), wobei NY-ESO-1 bis heute als das immunogenste CT-Antigen gilt (157).

Zweiundsiebzig Prozent der Neuroblastome exprimierten mindestens eines der 3 CT-Antigene: MAGE-1 fand sich bei 66% der Tumore, NY-ESO-1 bei 36% und MAGE-3 bei 33%. Die NY-ESO-1-Expression korrelierte signifikant mit Alter >1 Jahr, höherem Differenzierungsgrad des Tumors, erhöhtem Vanillinmandelsäurespiegel im Urin und normalem Ferritinspiegel im Serum. Die MAGE-1-Genexpression korrelierte ebenfalls signifikant mit einem normalen Ferritinspiegel, zusätzlich mit der Abwesenheit einer MYCN-Amplifikation, während die Expression von MAGE-3 mit der Abwesenheit von Metastasen assoziiert war. Eine Korrelation der Expression der 3 Gene mit Tumorstadium, Ort des Primärtumors und Überleben ließ sich nicht nachweisen. Da keiner der 3 Antigene eindeutig nur mit günstigen oder ungünstigen klinisch-pathologischen Faktoren assoziiert war, lässt

sich schlussfolgern, dass die Expression dieser 3 CT-Antigene nicht mit einem bestimmten Typ von Neuroblastom gekoppelt ist.

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen war die Expression von MAGE-1 und MAGE-3, nicht jedoch von NY-ESO-1, bei Neuroblastomen bereits beschrieben worden (158-160), wobei die Rate MAGE-1-positiver Neuroblastome zwischen 18 und 51% variierte, während für MAGE-3 Expressionsraten von 32 bis 54% berichtet wurden. Wir selbst hatten 66% MAGE-1- und 33% MAGE-3-positiv Tumore detektiert. Die hohen Schwankungsbreiten bei diesen Untersuchungen lassen sich am Ehesten durch die Anwendung unterschiedlicher RT-PCR-Methoden erklären: Zuber et al. hatten gezeigt, dass die Rate MAGE-1-positiver Melanome mit der Anzahl der PCR-Zyklen korrelierte (161).

Inzwischen stehen auch gegen MAGE-Antigene und NY-ESO-1 gerichtete monoklonale Antikörper für die Immunhistochemie zur Verfügung, mit denen sich die mittels RT-PCR erhobenen Befunde validieren lassen. Während für Melanom und Blasenkrebs mithilfe der RT-PCR gezeigt werden konnte, dass die Expression von MAGE- und NY-ESO-1-mRNAs mit Tumorprogression korreliert (162-165), konnten immunhistochemische Untersuchungen an einer großen Serie von Melanomen einen Zusammenhang zwischen der Expression der CT-Antigenfamilien MAGE bzw. SSX und Tumorstadium nicht bestätigen (166,167), so dass der diagnostische Wert von CT-Antigenen bei Krebserkrankungen bisher nicht gesichert ist.

Angesichts der auch von uns festgestellten heterogenen Expression Tumor-assoziiertes Antigene in Tumoren dürfte eine polyvalente Krebsvakzine, die Epitope *mehrerer* Tumorspezifischer Antigene repräsentiert, am Erfolg versprechendsten sein, da vor allem sie in der Lage sein wird, die Ausbildung von Antigenverlustvarianten bei Tumoren zu verhindern.

4. Ausblick

Die Prognose für Patienten mit Glioblastom ist nach wie vor schlecht. Es macht daher Sinn, gen- und immuntherapeutische Strategien für diese Erkrankung weiterzuentwickeln. Unsere Untersuchungen belegen, dass das Biolumineszenz-Imaging ein geeignetes Verfahren zur Quantifizierung des cytotoxischen Effekts einer Gentherapie ist. Da klinisch ein durchschlagender Erfolg replikationsdefizienter Viren als Gentransfer-Fähren bisher nicht nachgewiesen wurde, erscheint die Entwicklung Tumor-spezifischer konditionell in Gliomzellen replizierender bzw. onkolytischer Viren sinnvoll. In Zusammenarbeit mit Prof. Messerle (Inst. für Virologie, MH Hannover) bearbeiten wir derzeit 2 Projekte, die sich mit der Evaluation neuer onkolytischer Herpes simplex Typ 1 Viren bei Gliomen befassen (168). Hierfür werden sowohl die Viren als auch die Tumorzellen mit unterschiedlichen Luciferasen

markiert, so dass das Ausmaß der Onkolyse und damit der therapeutische Erfolg durch Biolumineszenz-Imaging erfasst werden kann.

Die intratumorale Überexpression der Präreplikationskomplex-Komponenten Minichromosome Maintenance (MCM) Proteine 2-7 scheint bei vielen Krebserkrankungen, inkl. malignem Gliom, mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein. Eine gezielte Ausschaltung dieser für die Zellteilung essentiellen Proteine repräsentiert eine neue therapeutische Strategie, die bisher bei Gliomen nicht beschrieben wurde. Wir arbeiten derzeit daran, MCM3, das von uns bei Astrozytomen als negativer Prognosefaktor identifiziert wurde, mithilfe von RNA-Interferenz in Gliomzellen zu supprimieren und zu analysieren, welche Konsequenzen diese Gensuppression für Wachstum, Apoptose und Tumorigenität von Gliomen hat. Eingebracht in geeignete Vektoren könnten MCM3-spezifische „short interfering RNAs“ (siRNAs) eine neue Form der Gentherapie für maligne Gliome darstellen.

Tumor-spezifische Antigene und gegen sie gerichtete Autoantikörper können diagnostisch und prognostisch hilfreiche Tumormarker repräsentieren. Zusätzlich sind diese Antigene auch potenzielle Zielstrukturen für eine Krebsvakzinierung. Angesichts der großen Heterogenität maligner Gliome macht es Sinn, möglichst viele Gliom-assoziierte Antigene zu identifizieren. Hierzu wenden wir verschiedene Verfahren des Immunoscreenings von Gliombanken bzw. -lysaten mit Patientenseren an, unter anderem auch die Proteomicstechnologie. Wir haben inzwischen neben MCM3 mehr als 30 Tumor-assoziierte Antigene detektieren können, die von uns derzeit detailliert untersucht werden. Die Tatsache, dass diese Antigene eine humorale Krebs-restringierte Immunantwort bei Patienten mit Gliom auslösen können, lässt sie prinzipiell als Zielstruktur für eine Vakzinierung gegen Krebs als geeignet erscheinen.

Die parallele und standardisierte Analyse der humoralen Immunantwort auf eine Vielzahl Tumor-assoziiertes Antigene bei Tumorpatienten stellt eine Art „molekularen Fingerabdruck“ dar, der sich als wichtiges Instrument für Diagnose, Überwachung des Krankheitsverlaufs und Therapiestratifizierung erweisen könnte.

5. Literaturverzeichnis

1. Cavenee WK, Weller M, Furnari FB, et al. Diffusely infiltrating astrocytomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. *Tumours of the nervous system*. Lyon: IARC Press 2000;10-54.
2. Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS. Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1382-90.
3. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*. 2001;2:120-9.
4. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005;353:811-22.
5. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9:157-73.
6. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2003;361:323-31.
7. Rich JN, Bigner DD. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:430-46.
8. Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol*. 1998;8:1195-8.
9. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*. 2004;22:1926-33.
10. Lang FF, Gilbert MR. Diffusely infiltrative low-grade gliomas in adults. *J Clin Oncol*. 2006;24:1236-45.
11. Recht LD, Bernstein M. Low-grade gliomas. *Neurol Clin*. 1995;13:847-59.
12. Frappaz D, Chinot O, Bataillard A, Ben Hassel M, Capelle L, Chanalet S, et al. Neuro-oncology Group of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer; Association of French-speaking Neuro-oncologists. Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the management of adult patients with intracranial glioma (2002). *Br J Cancer*. 2003;89 Suppl 1:S73-83.
13. Gonzalez J, Gilbert MR. Treatment of astrocytomas. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:632-8.
14. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*. 2004 20;23:7267-73.
15. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64:7011-21.

16. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:275-84.
17. Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:1253-65.
18. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16:1405-9.
19. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 2005;23:2411-22.
20. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005;25:1-7.
21. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:987-96.
22. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75 Suppl 2:ii2-11.
23. Louis DN, Seizinger BR. Genetic basis of neurological tumours. *Baillieres Clin Neurol*. 1994;3:335-52.
24. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*. 2000;60:1383-7.
25. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997;94:303-9.
26. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57:684-9.
27. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*. 1996;6:217-23.
28. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1979;5:1725-31.
29. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;26:239-44.
30. Brooks DJ, Beaney RP, Lammertsma AA, Leenders KL, Horlock PL, Kensett MJ, et al. Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability using rubidium-82 and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1984;4:535-45.

31. Izquierdo M, Cortes M, de Felipe P, Martin V, Diez-Guerra J, Talavera A, Perez-Higueras A. Long-term rat survival after malignant brain tumor regression by retroviral gene therapy. *Gene Ther.* 1995;2:66-9.
32. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.* 1993;53:83-8.
33. Rainov NG. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther.* 2000;11:2389-401.
34. Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, et al. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2000;11:2197-205.
35. Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, et al. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum Gene Ther.* 1999;10:2325-35.
36. Immonen A, Vapalahti M, Tynnela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, et al. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther.* 2004;10:967-72.
37. Harsh GR, Deisboeck TS, Louis DN, Hilton J, Colvin M, Silver JS, et al. Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study. *J Neurosurg.* 2000;92:804-11.
38. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 1993;53:5274-83.
39. Aghi M, Chiocca EA. Gene therapy for glioblastoma. *Neurosurg Focus.* 2006;20:E18.
40. Desaknai S, Lumniczky K, Esik O, Hamada H, Safrany G. Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med.* 2003;5:377-85.
41. Rainov NG, Kramm CM, Aboody-Guterman K, Chase M, Ueki K, Louis DN, et al. Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm. *Cancer Gene Ther.* 1996;3:99-106.
42. Lawler SE, Peruzzi PP, Chiocca EA. Genetic strategies for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:225-33.
43. Ilsley DD, Lee SH, Miller WH, Kuchta RD. Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerases alpha, delta, and epsilon with very different potencies and have unique mechanisms of action. *Biochemistry.* 1995;34:2504-10.
44. Kim SH, Kim JH, Kolozsvary A, Brown SL, Freytag SO. Preferential radiosensitization of 9L glioma cells transduced with HSV-tk gene by acyclovir. *J Neurooncol.* 1997;33:189-94.

45. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4348-52.
46. Kruse CA, Roper MD, Kleinschmidt-DeMasters BK, Banuelos SJ, Smiley WR, Robbins JM, Burrows FJ. Purified herpes simplex thymidine kinase Retrovector particles. I. In vitro characterization, in situ transduction efficiency, and histopathological analyses of gene therapy-treated brain tumors. *Cancer Gene Ther*. 1997;4:118-28.
47. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:683-93.
48. Ross BD, Chenevert TL, Rehemtulla A. Magnetic resonance imaging in cancer research. *Eur J Cancer*. 2002;38:2147-56.
49. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*. 2003;17:545-80.
50. Helms MW, Brandt BH, Contag CH. Options for visualizing metastatic disease in the living body. *Contrib Microbiol*. 2006;13:209-31.
51. Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, et al. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol*. 2002;160:1143-53.
52. De A, Lewis XZ, Gambhir SS. Noninvasive imaging of lentiviral-mediated reporter gene expression in living mice. *Mol Ther*. 2003;7:681-91.
53. Shah K. Current advances in molecular imaging of gene and cell therapy for cancer. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:518-23.
54. Welsh S, Kay SA. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol*. 1997;8:617-22.
55. Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J, Muzyczka N. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol*. 1996;70:4646-54.
56. Graves EE, Weissleder R, Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging of small animal tumor models. *Curr Mol Med*. 2004;4:419-30.
57. Jaiswal JK, Simon SM. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol*. 2004;14:497-504.
58. So MK, Xu C, Loening AM, Gambhir SS, Rao J. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*. 2006;24:339-43.
59. Jacobs A, Voges J, Reszka R, Lercher M, Gossmann A, Kracht L, et al. Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet*. 2001;358:727-9.
60. Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res*. 2003;63:1160-5.

61. Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*. 2000;2:491-5.
62. Brown DG, Visse R, Sandhu G, Davies A, Rizkallah PJ, Melitz C, et al. Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type-1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. *Nat Struct Biol*. 1995;2:876-81.
63. Degreve B, Johansson M, De Clercq E, Karlsson A, Balzarini J. Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J Virol*. 1998;72:9535-43.
64. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 1996;173:33-8.
65. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*. 1999;17:969-73.
66. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11984-9.
67. Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, Jovin TM, Hell SW. EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett*. 2000;479:131-5.
68. Gavin P, Devenish RJ, Prescott M. An approach for reducing unwanted oligomerisation of DsRed fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:707-13.
69. Lauf U, Lopez P, Falk MM. Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Lett*. 2001;498:11-5.
70. Yanushevich YG, Staroverov DB, Savitsky AP, Fradkov AF, Gurskaya NG, Bulina ME, et al. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of Anthozoa fluorescent proteins. *FEBS Lett*. 2002;511:11-4.
71. Fradkov AF, Chen Y, Ding L, Barsova EV, Matz MV, Lukyanov SA. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett*. 2000;479:127-30.
72. Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV, Remington SJ. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:462-7.
73. Wall MA, Socolich M, Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol*. 2000;7:1133-8.
74. Degreve B, Esnouf R, De Clercq E, Balzarini J. Characterization of multiple nuclear localization signals in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 22;264:338-42.
75. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:906-18.

76. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7877-82.
77. Lyons RM, Forry-Schaudies S, Otto E, Wey C, Patil-Koota V, Kaloss M, et al. An improved retroviral vector encoding the herpes simplex virus thymidine kinase gene increases antitumor efficacy in vivo. *Cancer Gene Ther*. 1995;2:273-80.
78. Iyer M, Berenji M, Templeton NS, Gambhir SS. Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol Ther*. 2002;6:555-62.
79. Hall SJ, Sanford MA, Atkinson G, Chen SH. Induction of potent antitumor natural killer cell activity by herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer. *Cancer Res*. 1998;58:3221-5.
80. Bi W, Kim YG, Feliciano ES, Pavelic L, Wilson KM, Pavelic ZP, Stambrook PJ. An HSVtk-mediated local and distant antitumor bystander effect in tumors of head and neck origin in athymic mice. *Cancer Gene Ther*. 1997;4:246-52.
81. Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*. 2004;64:1323-30.
82. Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T, et al. A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:740-51.
83. Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther*. 1997;8:73-85.
84. Glaß MS, Söling A, Messerle M. Characterization of glioma-specific regulatory promoter elements for the construction of oncolytic herpes simplex viruses. 16. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 15.-18.3.2006.
85. Johnson M, Sato M, Burton J, Gambhir SS, Carey M, Wu L. Micro-PET/CT monitoring of herpes thymidine kinase suicide gene therapy in a prostate cancer xenograft: the advantage of a cell-specific transcriptional targeting approach. *Mol Imaging*. 2005;4:463-72.
86. Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, Wilson CB. Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990;18:321-4.
87. Glaser T, Wagenknecht B, Groscurth P, Krammer PH, Weller M. Death ligand/receptor-independent caspase activation mediates drug-induced cytotoxic cell death in human malignant glioma cells. *Oncogene*. 1999;18:5044-53.
88. Glaser T, Weller M. Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281:322-7.
89. Van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer*. 2006;42:582-8.

90. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343:1350-4.
91. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.
92. Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol.* 1999;17:2762-71.
93. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1473-9.
94. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol.* 2004;70:161-81.
95. Wemmert S, Ketter R, Rahnenfuhrer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, et al. Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia.* 2005;7:883-93.
96. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:296-307.
97. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol.* 1998;16:3851-7.
98. Tolcher AW, Gerson SL, Denis L, Geyer C, Hammond LA, Patnaik A, et al. Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *Br J Cancer.* 2003;88:1004-11.
99. Takeda E, Weber G. Role of ribonucleotide reductase in expression in the neoplastic program. *Life Sci.* 1981;28:1007-14.
100. Rosenberger G, Fuhrmann G, Grusch M, Fassel S, Elford HL, Smid K, et al. The ribonucleotide reductase inhibitor trimidox induces c-myc and apoptosis of human ovarian carcinoma cells. *Life Sci.* 2000;67:3131-42.
101. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Elford HL. The enzyme ribonucleotide reductase: target for antitumor and anti-HIV therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1997;34:503-28.
102. Tihan T, Elford HL, Cory JG. Studies on the mechanisms of inhibition of L1210 cell growth by 3,4-dihydroxybenzohydroxamic acid and 3,4-dihydroxybenzamidoxime. *Adv Enzyme Regul.* 1991;31:71-83.
103. Grusch M, Fritzer-Szekeres M, Fuhrmann G, Rosenberger G, Luxbacher C, Elford HL, et al. Activation of caspases and induction of apoptosis by novel ribonucleotide reductase inhibitors amidox and didox. *Exp Hematol.* 2001;29:623-32.
104. Kanno S, Uwai K, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, et al. Trimidox induces apoptosis via cytochrome c release in NALM-6 human B cell leukaemia cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98:44-50.

105. Horvath Z, Hochtl T, Bauer W, Fritzer-Szekeres M, Elford HL, Szekeres T, Tihan T. Synergistic cytotoxicity of the ribonucleotide reductase inhibitor didox (3,4-dihydroxy-benzohydroxamic acid) and the alkylating agent carmustine (BCNU) in 9L rat gliosarcoma cells and DAOY human medulloblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;54:139-45.
106. Sikorski CW, Lesniak MS. Immunotherapy for malignant glioma: current approaches and future directions. *Neurol Res.* 2005;27:703-16.
107. Jager E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jager D, et al. Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer.* 1999;84:506-10.
108. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;183:725-9.
109. Elliott LH, Brooks WH, Roszman TL. Activation of immunoregulatory lymphocytes obtained from patients with malignant gliomas. *J Neurosurg.* 1987;67:231-6.
110. McVicar DW, Davis DF, Merchant RE. In vitro analysis of the proliferative potential of T cells from patients with brain tumor: glioma-associated immunosuppression unrelated to intrinsic cellular defect. *J Neurosurg.* 1992;76:251-60.
111. Tan EM. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2001;108:1411-5.
112. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11810-3.
113. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol.* 2005;205:123-9.
114. Musahl C, Holthoff HP, Lesch R, Knippers R. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res.* 1998;241:260-4.
115. Endl E, Kausch I, Baack M, Knippers R, Gerdes J, Scholzen T. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J Pathol.* 2001;195:457-62.
116. Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14932-7.
117. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 2003;21:1624-36.
118. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2121-32.
119. Hunt DP, Freeman A, Morris LS, Burnet NG, Bird K, Davies TW, et al. Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein. *Br J Neurosurg.* 2002;16:10-5.

120. Kruger S, Thorns C, Stocker W, Muller-Kunert E, Bohle A, Feller AC. Prognostic value of MCM2 immunoreactivity in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2003;43:138-45.
121. Feng D, Tu Z, Wu W, Liang C. Inhibiting the expression of DNA replication-initiation proteins induces apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:7356-64.
122. Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8862-7.
123. Longstreth WT Jr, Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD. Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 1993;72:639-48.
124. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *Lancet* 2004;363:1535-43.
125. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 2004;70:183-202.
126. Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 1985;62:18-24.
127. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2005;92:212-6.
128. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer.* 2005;4:11-19.
129. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med.* 2005;9:360-72.
130. Das A, Tan WL, Smith DR. Expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin in benign meningiomas. *Cancer Lett.* 2003;193:217-23.
131. Lulis EA, Chicoine MR, Perry A. High throughput screening of meningioma biomarkers using a tissue microarray. *J Neurooncol.* 2005;73:219-23.
132. Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA. Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol (Berl).* 2002;104:105-9.
133. Chakravarti A, Noll E, Black PM, et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol.* 2002;20:1063-8.
134. Das A, Tan WL, Teo J, Smith DR. Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:302-6.
135. Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, et al. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer.* 2003;97:1077-83.
136. Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg.* 2003;99:738-45.

137. Preusser M, Gelpi E, Matej R, Marosi C, Dieckmann K, Rossler K, Budka H, Hainfellner JA. No prognostic impact of survivin expression in glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005;109:534-8.
138. Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S. Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J Neurooncol*. 2005;72:231-8.
139. Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY. Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br J Cancer*. 2006;94:108-14.
140. Soussi T. P53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*. 2000;60:1777-88.
141. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Menard S, Cheever MA. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997;15:3363-7.
142. Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:136-43.
143. Andersen MH, Thor SP. Survivin-a universal tumor antigen. *Histol Histopathol*. 2002;17:669-75.
144. Koziol JA, Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Shi FD, Feng AC, Chan EK, Tan EM. Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5120-6.
145. Kempuraj D, Devi RS, Madhappan B, Conti P, Nazer MY, Christodoulou S, et al. T lymphocyte subsets and immunoglobulins in intracranial tumor patients before and after treatment, and based on histological type of tumors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004;17:57-64.
146. Tan EM, Shi FD. Relative paradigms between autoantibodies in lupus and autoantibodies in cancer. *Clin Exp Immunol*. 2003;134:169-77.
147. Himoto T, Kuriyama S, Zhang JY, Chan EK, Kimura Y, Masaki T, et al. Analyses of autoantibodies against tumor-associated antigens in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2005;27:1079-85.
148. Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, et al. Detection of autoantibodies to livin and survivin in sera from lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2005;48:217-21.
149. Comtesse N, Heckel D, Racz A, Brass N, Glass B, Meese E. Five novel immunogenic antigens in meningioma: cloning, expression analysis, and chromosomal mapping. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3560-68.
150. Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, et al. Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9601-06.

151. Schmits R, Cochlovius B, Treitz G, Regitz E, Ketter R, Preuss KD, et al. Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer*. 2002;98:73-7.
152. Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr*. 2005;17:7-13.
153. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2002;188:22-32.
154. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*. 1999;80:219-30.
155. Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12198-203.
156. Khong HT, Yang JC, Topalian SL, Sherry RM, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Immunization of HLA-A*0201 and/or HLA-DPbeta1*04 patients with metastatic melanoma using epitopes from the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*. 2004;27:472-7.
157. Nicholaou T, Ebert L, Davis ID, Robson N, Klein O, Maraskovsky E, et al. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. *Immunol Cell Biol*. 2006;84:303-17.
158. Corrias MV, Scaruffi P, Occhino M, De Bernardi B, Tonini GP, Pistoia V. Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1996;69:403-7.
159. Ishida H, Matsumura T, Salgaller ML, Ohmizono Y, Kadono Y, Sawada T. MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *Int J Cancer*. 1996;69:375-80.
160. Cheung IY, Barber D, Cheung NK. Detection of microscopic neuroblastoma in marrow by histology, immunocytology, and reverse transcription-PCR of multiple molecular markers. *Clin Cancer Res*. 1998;4:2801-5.
161. Zuber M, Spagnoli GC, Kocher T, Luscher U, Schaefer C, Noppen C, et al. Heterogeneity of melanoma antigen-1 (MAGE-1) gene and protein expression in malignant melanoma. *Eur Surg Res*. 1997;29:403-10.
162. Brasseur F, Rimoldi D, Lienard D, Lethe B, Carrel S, Arienti F, et al. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 1995;63:375-80.
163. Goydos JS, Patel M, Shih W. NY-ESO-1 and CTp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res*. 2001;98:76-80.
164. Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, et al. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer*. 1995;64:60-4.

165. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.* 2001;61:4671-4.
166. Dos Santos NR, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, et al. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res.* 2000;60:1654-62.
167. Busam KJ, Iversen K, Berwick M, Spagnoli GC, Old LJ, Jungbluth AA. Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters. *Mod Pathol.* 2000;13:459-65.
168. Müther N, Caysa H, Sodeik B, Söling A, Messerle M. Evaluation of the therapeutic effect of oncolytic Herpes simplex viruses by bioluminescence imaging. 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie, Düsseldorf, 12.-14.7.2006. (1. Posterpreis).

6. Anlagen

6.1 Thematisch relevante eigene Publikationen

1. Soling A, Simm A, Rainov NG. Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag. *FEBS Letters*. 2002;527:153-58.
2. Soling A, Theiß C, Jungmichel S, Rainov NG. A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for non-invasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma. *Genetic Vaccines Ther*. 2004;2:7-21.
3. Soling A, Rainov NG. Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3:1163-72.
4. Figul M, Soling A, Dong HJ, Chou TC, Rainov NG. Combined effects of temozolomide and the ribonucleotide reductase inhibitors didox and trimidox in malignant brain tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:41-46.
5. Soling A, Sackewitz M, Volkmar M, Schaarschmidt D, Jacob R, Holzhausen HJ, Rainov NG. Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:249-58.
6. Soling A, Plugge EM, Schmitz M, Weigle B, Jacob R, Illert J, Holzhausen HJ, Rainov NG. Autoantibodies to the inhibitor of apoptosis protein survivin in patients with brain tumors, *Int J Oncol*. 2007;30:123-8.
7. Soling A, Schurr P, Berthold F. Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma. *Anticancer Res*. 1999;19:2205-10.

6.2 Thesen

- [1] Die Fusion des Suizidgens Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase (HSV-TK) an ein für die optische Bildgebung mit Fluoreszenz bzw. Lumineszenz geeignetes Reporterprotein ist unter Bewahrung sowohl der therapeutischen als auch der Reporteraktivität möglich.
- [2] Biolumineszenz stellt ein geeignetes Bildgebungsverfahren für die Quantifizierung der Expression eines therapeutischen Transgens dar.
- [3] Bei Expression des HSV-TK-Luciferase-Fusionsproteins in humanen Gliomzellen zeigen cytotoxische und Luciferase-Aktivität sowohl in Zellkultur als auch in vivo eine sehr gute Korrelation. Diese enge Korrelation ist in vivo bei sehr großen Tumoren nicht mehr gegeben.
- [4] Beide Enzymaktivitäten unseres HSV-TK-Luciferase-Fusionsproteins sind im Vergleich zu den Aktivitäten der jeweiligen unfusionierten Enzyme reduziert. Die enzymatischen Aktivitäten eines solchen Konstrukts lassen sich durch Auswahl einer zwischen den beiden Enzymen liegenden längeren bzw. anderen Verbindungssequenz steigern.
- [5] Bei zellbiologischen Studien unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Fusionsproteinen sollte berücksichtigt werden, dass das angehängte Fluoreszenzprotein Funktion und Lokalisation des zu untersuchenden Proteins bzw. seiner Interaktionspartner erheblich beeinflussen kann.
- [6] Die Kombination von Temozolomid mit Ribonukleotidreduktasehemmern induziert in Abhängigkeit von der Dosis und unabhängig vom p53-Status synergistische cytotoxische Effekte gegenüber humanen Glioblastomzellen.
- [7] Das Immunoscreening von Gliom-cDNA-Expressionsbanken mit Serum von Gliompatienten eignet sich zur Detektion (neuer) Tumor-assoziiertes Antigene und prognostischer Marker.
- [8] Tumor-assoziiertes Antigene wie z.B. MCM3 oder Survivin können bei Patienten mit Hirntumoren eine humorale Immunantwort induzieren und daher möglicherweise Zielstrukturen für eine Vakzinierung gegen Krebs darstellen.

- [9] Expression des für die DNA-Replikation essentiellen Antigens Minichromosome Maintenance Protein 3 (MCM3) ist ein negativer prognostischer Faktor bei Astrozytompatienten.
- [10] Minichromosome Maintenance Protein 3 kann eine hochtitrige und Krebs-restringierte IgG-Immunantwort bei Patienten mit Astrozytom auslösen. Die Stärke der Immunreaktion scheint auch, aber nicht nur, durch das Ausmaß der intratumoralen MCM3-Expression beeinflusst zu werden.
- [11] Vorausgesetzt die Expression von MCM3 ist ein Maß für die proliferative Kapazität eines Gewebes, dann scheint das biologische Merkmal „Tumorstadium“ ein signifikanter negativer Prognosefaktor für Patienten mit anaplastischem Astrozytom zu sein, nicht jedoch für Patienten mit Glioblastom.
- [12] Der in der Routinediagnostik vielfach verwendete Proliferationsmarker Ki67 ist, im Gegensatz zu MCM3, bei Astrozytompatienten kein signifikanter prädiktiver Faktor für Überleben.
- [13] Aufgrund der Tumor-assoziierten (Über-)Expression von MCM-Proteinen und der essentiellen Bedeutung des Präreplikationskomplexes für die Zellteilung könnte die Suppression der MCM-Protein-Expression ein neuer und vielversprechender therapeutischer Ansatz bei Gliomen sein.

6.3 Erklärungen

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Fakultät oder Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht in die Wege geleitet worden.

Halle, den 4.12.2007

Ariane Söling

6.4 Lebenslauf

7.11.1959	geboren in Freiburg im Breisgau
1966 – 1978	Volksschule/ Gymnasium in Göttingen
1979 – 1985	Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin
20.12.1985	Approbation
1986 – 1989	Stipendiatin der Max-Planck-Gesellschaft. Promotion über die „Expression und Charakterisierung von rekombinantem Hühnchen-Nervenwachstumsfaktor“ am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried bei München.
1989 - 1991	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.
1991 - 1996	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Kinderklinik der Freien Universität Berlin (KAVH), später Kinderklinik der Humboldt Universität zu Berlin.
1996 – 1999	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Kinderonkologie und -hämatologie der Universitätskinderklinik Köln.
7.1.1998	Erteilung der Anerkennung als Fachärztin für Kinderheilkunde (Ärztekammer Nordrhein).
1999 – 2000	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Kinderheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
2000 - 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
seit 4/ 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Kinderheilkunde der Georg-August-Universität Göttingen.

6.5 Danksagung

Prof. Winfried Burkert und Prof. Christian Strauss danke ich für die Ermöglichung der Habilitation und die Unterstützung der Forschungsarbeiten des Neuroonkologischen Labors.

Besonderer Dank gebührt Prof. Hans-Jürgen Holzhausen für seine anhaltende und große Unterstützung unserer Forschungsarbeiten sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Barbara Seliger, Prof. Marianne Borneff-Lipp, Prof. Bernd Fischer, Prof. Paolo Fornara und Prof. Stephan Zierz für die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Ich danke Nikolai G. Rainov, der das Neuroonkologische Labor aufgebaut und die Arbeiten des Labors über Jahre hinweg unterstützend und kritisch begleitet hat. Durch sein Engagement wurden viele der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen erst möglich.

Von ganzem Herzen bedanken möchte ich mich bei Ursula Müller-Werdan und Sylvia Korch, ohne deren diplomatisches Geschick und Hartnäckigkeit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für Kritik, Geduld, unzählige gute Ratschläge, anhaltende Unterstützung und Aufmunterung bin ich Bernd Mayer, Michael Buerke, Helge Taubert, Martin Messerle, Hendryk Aurich, Marc Schmitz, Matthias Kappler, Ulrich Walter, Marten Szibor, Andreas Simm, Volkmar Heidecke, Thomas Hollemann und Jürgen Dittmer zu tiefstem Dank verpflichtet.

Für ihr außergewöhnliches Engagement und ihre Bereitschaft, Fragen zu stellen, danke ich Christian Theiß, Roland Jacob, Mirko Sackewitz, Henrike Caysa, Stephanie Jungmichel, Gerold Diez, Dorit Vogelreuter, Jörg Illert, Christian Bär und Tony Gutschner.

Ich bedanke mich beim Pflegepersonal und den Ärzten der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie für die Unterstützung der Forschungsarbeiten des Neuroonkologischen Labors. Ebenso dankbar bin ich den Mitarbeitern des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung für die exzellente Hilfe bei unseren Arbeiten.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Land Sachsen-Anhalt und der Jürgen Manchot Stiftung für die ideelle und finanzielle Unterstützung.

Meinen Lehrern Hans Thoenen, Günter Schultz und Hans Helge danke ich für eine hervorragende Ausbildung auf wissenschaftlichem und klinischem Gebiet und dafür, dass sie mich gelehrt haben, Fragen zu stellen, aber nicht immer die bequemen Antworten zu akzeptieren.