

Aus dem Institut für Pathologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich-Wilhelm Rath)



**Untersuchungen zum phänotypischen Verhalten humaner  
Weichteilsarkomxenotransplantate auf der Nacktmaus und dessen Bedeutung  
für *in-vivo*-Gentransferstudien**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Albrecht Waschke  
geboren am 02.05.1974 in Jena

Gutachter: 1. Prof. Dr. F.-W. Rath  
2. Prof. Dr. J. Dunst  
3. Prof. Dr. M. Schönfelder

Verteidigt am 19.12.2002 in Halle/S.

**urn:nbn:de:gbv:3-000004715**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004715>]

## Referat

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Xenotransplantaten von insgesamt drei Weichteilsarkom-Zelllinien, die unterschiedliche molekulare Alterationen in sich tragen. In der Absicht, ein *in-vivo*-Modell für weiterführende Untersuchungen im Hause zu etablieren, wurden zunächst Weichteilsarkomxenotransplantate per s.c.-Injektion von diesen *in vitro* kultivierten Zelllinien auf der Nacktmaus erzeugt und im Folgenden weitertransplantiert. Die so erzeugten Tumoren wurden zum einen einer vergleichenden morphologischen Betrachtung unter Einbeziehung des Primärtumors unterworfen, wobei die HE-Färbung und immunhistochemische Techniken für lichtmikroskopische Untersuchungen zur Anwendung kamen. Ergänzend wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Tumoren durchgeführt. Zum anderen wurden o.g. Tumoren für erste orientierende Gentransfer-Versuche verwendet. Dabei testeten wir in insgesamt drei Experimenten die Wirkung von liposomal komplexierten p53-Plasmiden und mdm2-AS-Oligodesoxynukleotiden, die durch eine intratumorale Injektion an ihren Wirkort gebracht wurden.

Es konnte bei den Xenotransplantaten aller drei Zelllinien eine Stabilität im Phänotyp über den Zeitraum der Transplantationen, sowohl auf lichtmikroskopischer als auch auf ultrastruktureller Ebene, nachgewiesen werden, wodurch deren Eignung als *in-vivo*-Modell bestätigt wird. In den Gentransfer-Studien konnten erste qualitative Aussagen getroffen werden. So zeigte eine Therapie mit intratumoraler Injektion von wtp53-Plasmiden und mdm2-AS-ODNs bei RD-Xenotransplantaten deutliche Unterschiede im Nekroseausmaß in zentraler Tumorbereiche im Vergleich zur Kontrolle.

Anschlussuntersuchungen zum morphologischen Verhalten nach weiteren Transplantationsgenerationen können weitere Sicherheit über die schon gewonnenen Ergebnisse bringen. Die Methode der intratumoralen Injektion ist als solche kritisch zu überdenken. Weiterhin sind kontinuierliche Wirkstoff-Applikation sowie die Untersuchung größerer Fallzahlen Grundlage Erfolg versprechender Nachfolgeuntersuchungen.

Waschke, Albrecht: Untersuchungen zum phänotypischen Verhalten humaner Weichteilsarkomxenotransplantate auf der Nacktmaus und dessen Bedeutung für *in-vivo*-Gentransferstudien.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2002

## Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Weichteilsarkome im Überblick	1
1.2	p53 und mdm2 als molekulare Eckpfeiler der WTS-Tumorigenese	2
1.3	Zielstellung der Arbeit	3
2	Material	3
2.1	Primärtumoren	3
2.2	Verwendete Zelllinien	4
2.3	Versuchstiere	5
2.4	Geräte, Verbrauchsmittel, Chemikalien, Antikörper, DNA-Konstrukte	5
2.4.1	Geräte und Verbrauchsmittel	5
2.4.2	Chemikalien	6
2.4.3	Chemikalien für die HE-Färbung	7
2.4.4	Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	7
2.4.5	Chemikalien für die Elektronenmikroskopie	8
2.4.6	Verwendete(s) Oligodesoxynukleotide / Plasmid	8
3	Methoden	9
3.1	Tumorinduktion durch s.c.-Injektion	9
3.2	Xenotransplantation	9
3.3	Gewinnung von Tumormaterial für die Gentransfer-Versuche	12
3.4	Isolation von Plasmid-DNA	12
3.5	Intratumorale Applikation von Lipoplexen	12
3.6	Einbettung in Paraffinblöcke	14
3.7	HE-Färbung	14
3.8	Immunhistochemische Verfahren	15
3.9	Elektronenmikroskopie	16
4	Ergebnisse	17
4.1	Transplantationsergebnisse	17
4.2	Vergleichende lichtmikroskopische Auswertung	18
4.2.1	Xenotransplantate der RD-Zelllinie	18
4.2.2	Xenotransplantate der Zelllinie 45/92	21
4.2.3	Xenotransplantate der Zelllinie US8/93	24

4.3	Immunhistochemie	27
4.3.1	Xenotransplantate der RD-Zelllinie	27
4.3.2	Xenotransplantate der Zelllinie 45/92	29
4.3.3	Xenotransplantate der Zelllinie US8/93	31
4.4	Elektronenmikroskopie	32
4.5	Gentherapeutische Versuche	34
4.5.1	Vorbemerkungen	34
4.5.2	Morphologische Charakterisierung: Intratumorale Injektion von liposomalen wtp53-Plasmiden und mdm2-AS-ODNs in RD-Xenotransplantattumoren	34
4.5.3	Morphologische Charakterisierung: Intratumorale Injektion von mdm2-AS- und mdm2-SE-ODNs in US8/93-Xenotransplantattumoren	38
5	Diskussion	40
5.1	Phänotypisches Verhalten der Xenotransplantate	40
5.2	Gentherapeutische Versuche	46
5.2.1	p53 und mdm2 als Regulatoren des Zellzyklus	46
5.2.2	Grundlagen der Lipid-vermittelten Transfektion <i>in vivo</i>	47
5.2.3	Oligodesoxynukleotide (ODNs) und wtp53-Plasmide	48
5.2.4	Eigene Ergebnisse und Wertung	51
5.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	57
6	Zusammenfassung	58
7	Literaturverzeichnis	60
8	Thesen	74

## Abkürzungen und Symbole

∅	Durchmesser
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AS	Antisense
BSA	bovine serum albumin – Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleinacid – Desoxyribonukleinsäure
ds	double strand – Doppelstrang
fs	frame shift
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
LFA	Lipofectamin
MFH	Malignes fibröses Histiozytom
MG	Molekulargewicht
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mt	mutiert
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate buffered saline – Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
PT	Primärtumor
RNA	ribonucleinacid – Ribonukleinsäure
s	Sekunde
s.c.	subkutan

SE	Sense
ss	single strand - Einzelstrang
Tab.	Tabelle
TSG	Tumorsuppressorgen
vs.	versus
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
wt	Wild-Typ
WTS	Weichteilsarkom

## 1 Einleitung

### 1.1 Weichteilsarkome im Überblick

Der Terminus „Weichteilsarkome“ beinhaltet alle nichtepithelialen Tumoren, die sich aus Zellen des extraskelletalen Gewebes einschließlich des peripheren Nervensystems herleiten. Ausgenommen sind Tumoren des hämato- und lymphopoetischen Systems, der Glia sowie Tumoren des Stützgewebes parenchymatöser Organe (Riede & Schaefer, 1995; Weiss & Goldblum, 2001).

Mit einem Anteil von 1% an allen Malignomen des Menschen sind Weichteilsarkome zu den seltenen Tumoren zu rechnen. Für die alten Bundesländer wird die Inzidenz mit ungefähr 600 Fällen pro Jahr angegeben (Steinau & Biemer, 1990). Die Häufigkeitsangaben für die einzelnen WTS-Entitäten schwanken. Das häufigste WTS des Erwachsenen ist das maligne fibröse Histiozytom (ca. 25 – 30%) gefolgt vom Liposarkom (ca. 11 – 12%). Danach folgen in absteigenden Reihenfolge das Leiomyosarkom, das Synovialsarkom, das Fibrosarkom und das maligne Schwannom (Hashimoto *et al.*, 1992). Rhabdomyosarkome, als häufigste Weichteiltumoren des Kindes gesondert klassifiziert, haben einen Anteil von 11 bis 19% an allen WTS des Menschen (Weiss & Goldblum, 2001).

Weichteilsarkome sind an nahezu allen Stellen des menschlichen Körpers lokalisiert. Weitaus am häufigsten sind Extremitäten und Rumpfwand betroffen (untere Extremität bis zu 50%, Rumpfwand ca. 20%, obere Extremität ca. 10% (Weiss & Goldblum, 2001)), Seltenheiten sind dagegen primäre Sarkome der Lunge (Attanoos *et al.*, 1996) oder intrakraniell lokalisierte Tumoren (Paulus *et al.*, 1991).

Die Prognose der WTS ist vergleichsweise schlecht: Die 5-Jahres-Überlebensrate wird abhängig vom Differenzierungsgrad zwischen 76% (G1) und 26% (G3) angegeben, in Bezug zum klinischen Tumorstadium entsprechend den AJCC-Kriterien liegt sie zwischen >90% im Stadium 1 und <20% im Stadium 4 (Berger *et al.*, 1997). Die Prognose der WTS wird stark von histologischen Merkmalen beeinflusst. Am deutlichsten wird dies bei Parametern wie Differenzierungsgrad, Mitoserate sowie Nekrosehäufigkeit und -ausmaß. Daneben bestimmen jedoch auch Merkmale wie Zellularität, Häufigkeit von Kernatypien, Stromaanteil und myxoide Umwandlung die Prognose entscheidend mit (Hashimoto *et al.*, 1992; Weiss & Goldblum, 2001). Weitere prognostisch relevante Parameter sind Tumorentität und Eindringtiefe.

Die Therapiekonzepte bei WTS fußen auf einer primär chirurgischen Vorgehensweise. Bei der weitaus häufigsten Lokalisation an den Extremitäten steht das Konzept einer Resektion weit im Vordergrund dem Konzept einer vollständigen Kompartimentresektion gegenüber (Steinau & Biemer, 1990; Zornig *et al.*, 1992). Adjuvante und neoadjuvante Konzepte umfassen entsprechend Stadium, Differenzierungsgrad und Operabilität eine zusätzliche Strahlen- und/oder Chemotherapie. Die Ergebnisse der adjuvanten Chemotherapie, wobei Doxorubicin die größte Rolle spielt (Santoro *et al.*, 1995), sind im Hinblick auf das Langzeitüberleben als wenig erfolbringend zu bewerten (Tierney *et al.*, 1995). Die Rolle der postoperativen Radiatio beschränkt sich auf die lokale Tumorkontrolle und bringt einen wenn auch nicht dramatischen so aber trotzdem signifikanten Prognosevorteil (Suit *et al.*, 1985). Die Lokalrezidivraten reichen von 8% bei adäquat durchführbarer bis zu 76% bei inadäquater chirurgischer Resektion (Markhede *et al.*, 1982).

## **1.2 p53 und mdm2 als molekulare Eckpfeiler der WTS-Tumorigenese**

Das Wissen um die molekularen Grundlagen der Tumorigenese bei WTS erfuhr in den letzten Jahren einen enormen Zuwachs. Als Eckpfeiler konnten dabei das TSG p53 und das mit ihm über eine negative Rückkopplung verbundene mdm2-Onkogen identifiziert werden, wobei als grundlegende Mechanismen der Tumorentstehung funktionelle Inaktivierung von P53 (Harris, 1996) und mdm2-Überexpression diskutiert werden (Freedman *et al.*, 1999). Die Beteiligung dieser Mechanismen in der WTS-Tumorigenese ist allgemein anerkannt, jedoch erst in Anfängen verstanden (Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Taubert *et al.*, 2000). p53-Mutationen sind für eine Vielzahl von menschlichen Tumoren beschrieben (Hollstein *et al.*, 1991), darunter auch WTS, bei denen sie zu den häufigsten molekularen Alterationen gehören (Pollock *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist für eine Reihe von WTS eine mdm2-Überexpression nachgewiesen (Flørenes *et al.*, 1994) und in der Zellkultur der in der vorliegenden Arbeit untersuchten US8/93-Zelllinie führt eine mdm2-AS-Behandlung zur signifikanten Reduzierung des klonogenen Überlebens (Meye *et al.*, 2000).

Weiterhin haben p53-Mutationen nachgewiesenermaßen prognostische Bedeutung bei WTS (Würl *et al.*, 1997): Non-fs-Mutationen des p53-Gens (Taubert *et al.*, 1996) korrelieren ebenso wie eine mdm2-Überexpression (Würl *et al.*, 1998) bei WTS mit

einer allgemein schlechteren Prognose der betroffenen Patienten. Zusätzlich führt eine mdm2-Überexpression unabhängig vom p53-Status bei transgenen Mäusen in 38% der Fälle zur Entwicklung von Sarkomen (Jones *et al.*, 1998).

### **1.3 Zielstellung der Arbeit**

Die bisher unbefriedigenden Ergebnisse in der Behandlung von WTS münden konsequenterweise in die Suche nach neuen Therapiestrategien für diese spezielle Tumorguppe. Dabei legen die bisherigen Erkenntnisse aus molekularbiologischen Untersuchungen gentherapeutische Versuche in Form einer Restaurierung von wtp53- und Unterdrückung von mdm2-Aktivität am *in-vivo*-Modell nahe. Dazu wurden zwei im Hause etablierte Zelllinien humaner WTS (45/92, US8/93) sowie eine kommerziell erhältliche ATTC-Zelllinie (RD) auf Nacktmäuse xenotranplantiert.

Im ersten Teil der Arbeit soll eine vergleichende Analyse der histologischen, immunhistochemischen und ultrastrukturellen Charakteristika der an Nacktmäusen induzierten und weitertransplantierten WTS-Xenotransplantate erfolgen. Die Frage nach dem phänotypischen Verhalten der Tumoren nach Transplantation in ein *in-vivo*-Modell über mehrere Generationen hinweg ist aus folgenden Gründen von besonderem Interesse: Phänotypische Stabilität ist Grundlage der Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus *in-vivo*-Experimenten, weiterhin ist diesbezüglich immer noch eine kontroverse Studienlage zu verzeichnen (siehe Kap. 5.1). Der jeweilige Primärtumor wird vergleichend mit herangezogen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden erste orientierende *in-vivo*-Gentransferversuche durchgeführt. Dabei standen zunächst die technische Realisierbarkeit und qualitative Aussagen im Mittelpunkt des Interesses – deren Ergebnisse sollen im zweiten Teil der Arbeit diskutiert werden.

## **2 Material**

### **2.1 Primärtumoren**

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der Zelllinien 45/92 und US8/93 wurden vitale Proben von im Universitätsklinikum Kröllwitz (Klinik für Allgemeinchirurgie) diagnostizierten und nachfolgend auch operativ entfernten humanen WTS

verwendet. Die Verschlüsselung und Anonymisierung der Daten erfolgte in einer intern erstellten, chronologisch angeordneten Datenbank (Bsp.: Probe 45/92 entspricht dem 45. Tumorneueingang des Jahres 1992).

Ausgangstumor der Zelllinie US8/93 war ein undifferenziertes und nicht klassifizierbares Sarkom (G3) bei einem zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (1993) 40-jährigen Mann. Die Geschwulst befand sich an der lateralen Thoraxwand. Der Patient erhielt postoperativ eine Strahlentherapie und ist seitdem rezidiv- und metastasenfrei.

Ausgangstumor der Zelllinie 45/92 war ein als pleomorphes Rhabdomyosarkom klassifiziertes WTS der Hand bei einem 57-jährigen Mann. Die histologische Einordnung erfolgte unter Einbeziehung ultrastruktureller Merkmale nach der gängigen Klassifikation der WHO (Weiss & Goldblum, 2001).

## 2.2 Verwendete Zelllinien

Tabelle 1

Bezeichnung	Typ	p53-Genstatus	Weiterführende Literatur
RD	eRMS	mt/ <sup>-1</sup>	McAllister <i>et al.</i> , 1969 Nanni <i>et al.</i> , 1989
45/92	RMS	wt/wt	Schmidt <i>et al.</i> , 1998 Hinze <i>et al.</i> , 1999
US8/93	US	wt/mt	Taubert <i>et al.</i> , 1997

*Legende:* (e)RMS – (embryonales) Rhabdomyosarkom, US – undifferenziertes Sarkom, <sup>1</sup> – p53-missense-Mutation gekoppelt mit Heterozygotieverlust (Stratton *et al.*, 1990; Germani *et al.*, 1994)

Hierbei sind 45/92 und US8/93 Zelllinien, die in der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung des Institutes für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aus den in Kap. 2.1 beschriebenen humanen WTS etabliert wurden. Bei RD handelt es sich um die kommerziell erhältliche ATCC-Linie CCL-136 (Rockville, MD, USA) welche über die Firma WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Homburg bezogen wurde.

## 2.3 Versuchstiere

Als Tumorzellempfänger dienten Nacktmäuse (NMRI-num, SPF-Qualität, bei Lieferung 3 – 4 Wochen alt), die von der Tierzucht Schönwalde GmbH geliefert wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter semisterilen Bedingungen in Makrolonkäfigen im zentralen Tierstall der Medizinischen Fakultät (Leiter: Prof. Dr. Pauer) im 12/12h-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Nahrung bestand aus Standardpellets, Wasser stand in Trinkflaschen *ad libitum* zur Verfügung. Die sachgerechte Versorgung erfolgte durch MitarbeiterInnen des zentralen Tierstalles. Es wurde eine Eingewöhnungsphase von mindestens einer Woche ab Eintreffen der Tiere bis zum Beginn der Experimente eingehalten. Alle Tiere einer Versuchsreihe stammten aus derselben Lieferung, um vergleichbare Ausgangswerte betreffs Körpergewicht und Alter zu gewährleisten.

Die Tierexperimente wurden auf Antrag (I 13G1; Az.: 43.2-42502/2-224 MLU HAL) von Dr. Taubert (Institut für Pathologie, MLU) genehmigt. Alle an den Experimenten beteiligten Personen waren vorab ausführlich über den sachgemäßen Umgang mit Labortieren unterrichtet worden.

## 2.4 Geräte, Verbrauchsmittel, Chemikalien, Antikörper, DNA-Konstrukte

### 2.4.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Produkte	Firma
Einweg-Plastikartikel für Zellkultur	Greiner (Frickenhausen)
Folioplast (Abdecktuch)	Hartmann (Heidenheim)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Hypercenter XP	Shandon (Frankfurt/M.)
Kammerobjektträger	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
Maxon HR26 Nahtmaterial	Braun-Dexon (Melsungen)
Makrolonkäfige	Ebeco (Castrop-Rauxel)
Mettler AM 100 (Analysenwaage)	Mettler (Gießen)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Multischalen	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
Objektträger	Menzel Gläser (Braunschweig)

Produkte	Firma
Opti-MEM I (Serumfreies Medium)	Life Technologies (Eggenstein)
Peha-taft (Handschuhe)	Hartmann (Heidenheim)
Plasmid-Maxi/Mega-Kit	Qiagen (Hilden)
Plastipak (Einwegspritzen)	Becton Dickinson (San Jose, CA/USA)
Softasept N	B. Braun-Dexon (Melsungen)
Skalpelle, Scheren, Pinzetten	Aesculap (Tuttlingen)
Sterican-Einmal-Injektionskanülen	B.Braun-Dexon (Melsungen)
Sterile Tupfer	Hartmann (Heidenheim)
U-40 Insulin (Einmalspritze)	B.Braun-Dexon (Melsungen)
Vortex-Schüttler	IKA Labortechnik (Staufen)

#### 2.4.2 Chemikalien

Produkt	Hersteller
DMSO	Boehringer Ingelheim (Ingelheim)
Formalin	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96%)	Laborchemie Apolda (Apolda)
Ether (zur Tiernarkose)	Merck (Darmstadt)
Mayers Haemalaun	Merck (Darmstadt)
PSI Wachs 2 (Paraffin)	PSI (Laudenbach)

#### Verwendete kationische Lipidformulierung:

Name:	Lipofectamin (LFA)
Zusammensetzung:	DOSPA:DOPE (3:1)
Konzentration:	1 µg/µl
Molekulargewicht (Da):	977
Positivladungen/mol:	3,36
Hersteller:	Life Technologies

*Abkürzungen:* DOPE – Dioleoylphosphatidylethanolamin  
 DOSPA – 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermin-carboxyamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium-trifluoracetat

Folgende verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Standardmethoden angefertigt und verwendet:

PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Trypsinlösung, LB-Lösung.

### 2.4.3 Chemikalien für die HE-Färbung

Produkt	Hersteller
Gelbliches Eosin	Merck (Darmstadt)
Rotisol/Roticlear	Roth (Karlsruhe)
Alkohol (verschiedene Konzentrationen)	Laborchemie Apolda
Hämatoxylin	Eigene Herstellung

#### Ansatz für 5 Liter:

5 g Hämatoxylin, 1 g KJO<sub>3</sub>, 250 g chemisch reines Kalilaun,  
250 g Chloralhydrat, 5 g Zitronensäure

jeweils in 1 l Aqua dest. lösen und nachfolgend  
sehr langsam zusammenmischen.

### 2.4.4 Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Tabelle 2

Antigen	Ak-Klon	Sekundäranti- körperspezifität	Arbeitskon- zentration	Firma
Vimentin	3B4	IgG 1	1:25	Dako
Desmin	D33	IgG 1	1:50	Dako
Myoglobin	Pab	Anti-Kaninchen	1:500	Dako
Cytokeratin	MNF116	IgG 1	1:100	Dako
SmAktin	1A4	IgG 2a	1:25	Dako
CD 34	QBEND 10	IgG 1	1:2	Immunotech
P53	DO7	IgG 2b	1:200	Medac
Mdm 2	IF2	IgG 1	1:50	Dianova



### **3 Methoden**

#### **3.1 Tumorinduktion durch s.c.-Injektion**

Zur Tumorerzeugung auf der Nacktmaus wurden den ca. 5 – 8 Wochen alten Tieren nach vorhergehender Inhalationsnarkose (Ether) und Desinfektion s.c.-Injektionen in beide Flanken verabreicht. Diese Injektionen bestanden aus ca. 0,3 – 0,5 ml Zellsuspension von  $10^6$  –  $10^7$  vorher leicht trypsinisierten Tumorzellen der in Kap. 2.2 aufgeführten Zelllinien in Serum-freiem Medium (Opti-MEM I). Anfänglich wurden zur Optimierung der Anwachsrate leichte Variationen von Injektionstechnik (streng subkutan, kombiniert subkutan/intramuskulär) und -ort (Flanke, laterale Bauchwand, Oberschenkel) vorgenommen, wobei letztendlich die subkutane Injektion in die Flanke als Procedere der Wahl zur Anwendung kam. Das Tumorstadium wurde anschließend mindestens zwei Mal wöchentlich palpatorisch überprüft. Im Falle von Tumorstadium (Tumorgeneration N1) an den Injektionsstellen wurde gewartet, bis der Tumordurchmesser ca. 7 – 15 mm betrug, dann erfolgte die Tumorentnahme zwecks Probengewinnung und Weitertransplantation.

Zur Auswertung im Rahmen der vergleichenden lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen (1. Teil der Arbeit) gelangen für die RD-Zelllinie drei Tumoren (Tier 1-3), für die Zelllinie 45/92 zwei Tumoren (Tier 4+5) und für US8/93 ein Tumor (Tier 6) der Generation N1 (siehe Abb. 1 – Abb. 3).

#### **3.2 Xenotransplantation**

Die in den Nacktmäusen durch Injektion erzeugten Tumoren wurden nachfolgend für Xenotransplantationen auf eine nächste Generation Nacktmäuse weiterverwendet. Die Transplantationsprozedur erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Dafür wurde die tumortragende Maus durch Inhalationsnarkose betäubt. Danach erfolgten eine ausgiebige Desinfektion und die Hautinzision über dem Tumor, Präparation des gesamten Tumors mittels Schere und Pinzette sowie Tumorentnahme. Die Aufbereitung zur weiteren Transplantation erfolgte durch vorsichtiges Schneiden des Tumorgewebes in ca.  $0,5$  –  $1$  mm<sup>3</sup> große Stücke, gleichzeitig wurde Material zur histologischen Untersuchung gewonnen. Dazu wurde das frisch entnommene Gewebe in 4%igem Formalin für histologische und immunhistochemische

Untersuchungen, in 3%iger Glutaraldehydlösung für ultrastrukturelle Untersuchungen konserviert.

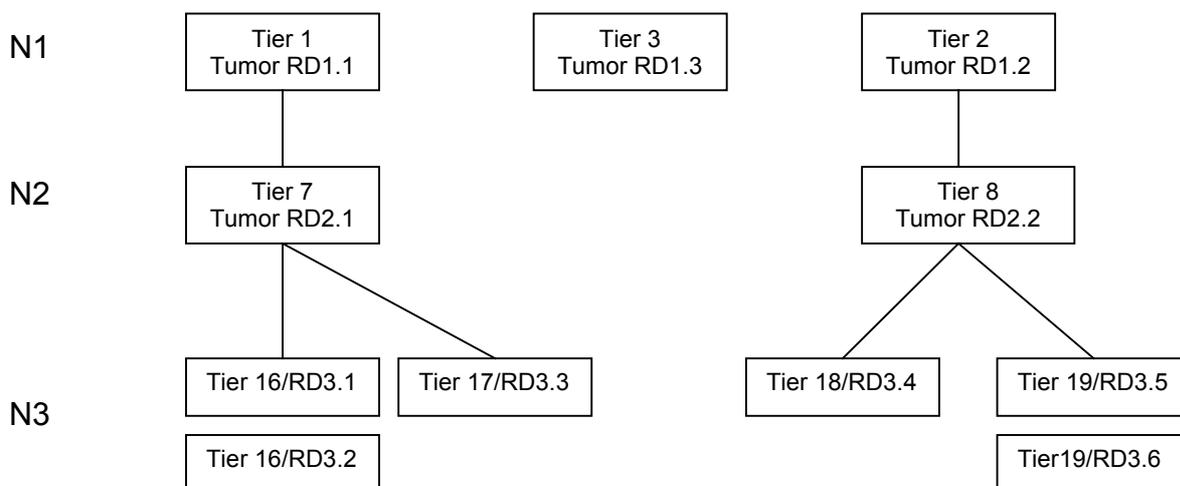
Die zu transplantierenden, ca. 5 – 8 Wochen alten Tiere wurden ebenfalls narkotisiert, an beiden Flanken wurde nach Desinfektion eine ca. 8 – 12 mm lange Hautinzision gesetzt, die durch Präparation mittels Schere zu einer Gewebstasche dilatiert wurde, in welche die Gewebstückchen (Gesamtvolumen ca. 8 mm<sup>3</sup>) plaziert wurden. Der anschließende Wundverschluss erfolgte durch Einzelknopfnah.

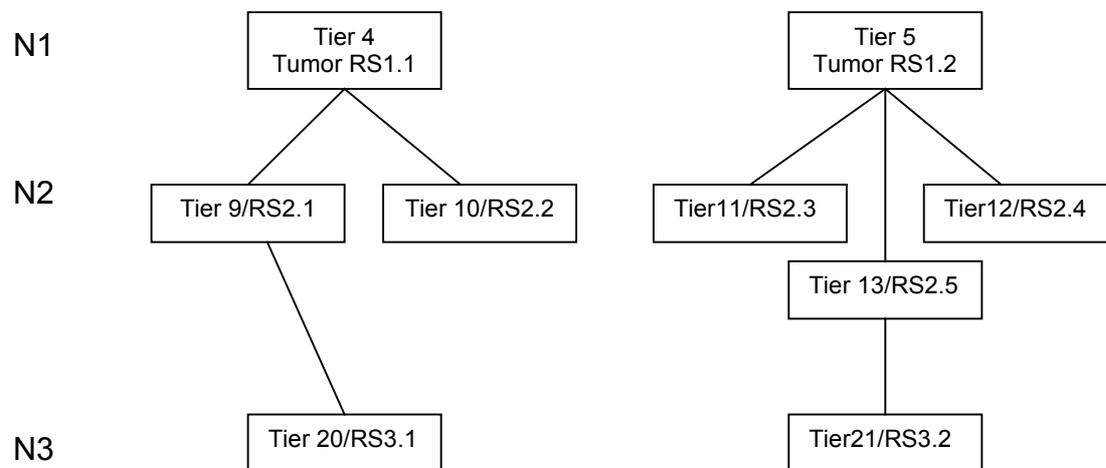
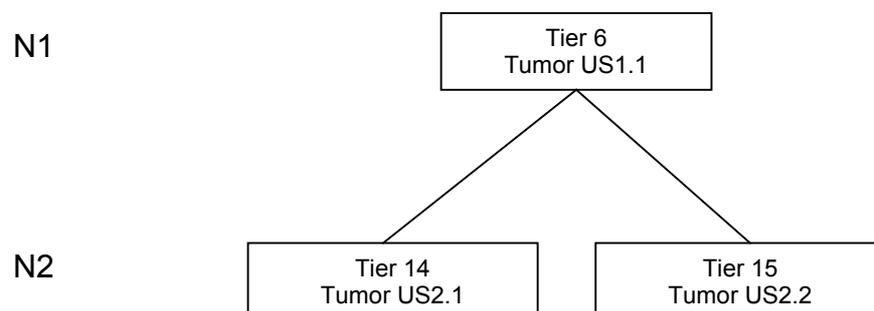
Die so erzeugten Tumoren (Tumorgeneration N2) bildeten wiederum die Grundlage für eine weitere Transplantationsserie (Tumorgeneration N3), wobei in gleicher Weise vorgegangen wurde.

Im Falle einer nicht zumutbaren Tumorprogression wurden die Tiere durch Narkosemittel-Überdosierung eingeschläfert. Bei allen getöteten Tieren erfolgte eine makroskopische Sektion und in ausgewählten Fällen die Konservierung von Organen zur histologischen Aufarbeitung.

Für die RD-Zelllinie wurden zwei Tumoren (Tier 7+8), für 45/92 fünf (Tier 9-13) und für US8/93 zwei (Tier 14+15) Tumoren der Generation N2 erzeugt. In der Generation N3 kommen für RD sechs Tumoren (Tier 16-19) und für 45/92 zwei Tumoren (Tier 20+21) zur Auswertung (siehe Abbildungen).

**Abb. 1:** Generationen der RD-Xenotransplantate



**Abb. 2:** Generationen der 45/92-Xenotransplantate**Abb. 3:** Generationen der US8/93-Xenotransplantate

Einen Überblick über die in die Auswertung eingegangenen Tumorzahlen gibt die folgenden Tabelle.

Tabelle 4

Zelllinie	Anzahl N1	Anzahl N2	Anzahl N3	Gesamt
RD	3	2	6	11
45/92	2	5	2	9
US8/93	1	2	-	3

### 3.3 Gewinnung von Tumormaterial für die Gentransfer-Versuche

Für die im zweiten Teil der Arbeit beschriebenen Gentransfer-Versuche wurden insgesamt 14 Tiere verwendet, die allesamt Tumoren der Generation N3 trugen (2. Xenotransplantation). Es erfolgten drei Versuche: Versuch I mit 3 Tieren mit RD-Xenotransplantaten, Versuch II mit 8 Tieren mit RD-Xenotransplantaten und Versuch III mit 3 Tieren mit US8/93-Xenotransplantaten. Die Tumoren wurden auf die oben beschriebene Weise erzeugt – nach Abschluss der Experimente wurden die Tiere getötet und die Tumoren der histologischen Auswertung zugeführt.

### 3.4 Isolation von Plasmid-DNA

Das wtp53-Plasmid wurde nach Transformation mittels Standardmethoden in *Escherichia coli* vermehrt. Individuelle Klone einer Agarplatte wurden in LB-Medium mit Antibiotika-Zusatz bis zu einer optischen Dichte von  $\geq 0,9_{(600)}$  kultiviert. Der bakterielle Überstand wurde gewonnen, die Plasmid-DNA mittels standardisierter Endotoxin-freier Methoden nach Angaben des Herstellers isoliert, in Endotoxin-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und bei –20°C gelagert.

### 3.5 Intratumorale Applikation von Lipoplexen

Das Mischen der entsprechenden DNA- und Lipid-Mengen erfolgte getrennt in jeweils der Hälfte des vorgesehenen Injektionsvolumens Opti-MEM-I-Medium (OM-I) ca. ½ - 1 Stunde vor Beginn der Experimente. Grundsätzlich wurden alle Ansätze von Mehrfachexperimenten wegen der Vermeidung möglicher Pipettierfehler gleichzeitig und in Form von Stammlösungen hergestellt. DNA- und Lipid-Lösung wurden vereinigt und erneut gemischt. Nach einer Präinkubation der definierten DNA-Lipid-Mischungen über 20 – 60 min bei Raumtemperatur (zwischendurch mehrmals im Vortex-Schüttler) wurden die DNA-Lipid-Komplexe mittels steriler Spritzen und Nadelkanülen (27Gx4,5“) mit einem Gesamtinjektionsvolumen von 150 – 200 µl (10 – 20 µg DNA, 40 – 80 µg LFA) pro Versuch intratumoral appliziert. Bei den sich über mehrere Tage erstreckenden Experimenten wurden die gleichen Ansätze für jeden Tag neu hergestellt.

Die Kontrolle des Tumorwachstums erfolgte durch Messung des größten Tumordurchmessers in bestimmten Zeitintervallen vor, während und nach den Lipidinjektionen. Die abschließende Tumorentfernung erfolgte unter Narkose, daraufhin wurden die Tiere eingeschläfert.

*Versuch I:* Im ersten Versuch wurden drei Nacktmäuse einer Therapie unterzogen. Die Tiere erhielten 25 Tage vor Therapiebeginn eine Xenotransplantation mit mazerierter Tumormasse (RD-Xenotransplantat), wobei es sich um die 2. Xenotransplantation (Generation N3) handelte. Die Therapie bestand aus einer dreimaligen, alle drei Tage stattfindenden intratumoralen Injektion. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 150 µl, injiziert wurde eine Mischung aus Lipid und DNA in Opti-MEM-I mit einer Lipid-DNA-Ratio von 4:1 (20 µg DNA, 80 µg LFA). Vergleichend untersucht werden sollen eine Behandlung mit nur Lipid (Tier 1), mit LFA-Plasmid-Komplexen (wtp53, Tier 2) und LFA-ODN-Komplexen (mdm2-AS nach Kondo *et al.*, 1995, Tier 3). Vor dem ersten Versuch sowie vor jeder weiteren Injektion wurden die Tumorumfänge vermessen. Drei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere eingeschläfert und die Tumoren zur weiteren Untersuchung entnommen.

*Versuch II:* Ein zweiter Versuch mit den RD-Tumoren bezog insgesamt acht Nacktmäuse ein. Die Injektionen wurden diesmal mit einem Insulin-Pen ausgeführt. Die Tiere erhielten pro Sitzung 10 Einzelinjektionen à 10 µl (zusammen 100 µl) verteilt in das gesamte Tumorumfang mit jeweils insgesamt 20 µg wtp53 (Tiere 1+2), mdm2-AS-ODNs (nach Kondo *et al.*, 1995, Tiere 3+4) und mdm2-SE-ODNs (nach Kondo *et al.*, 1995, Tiere 5+6) im Gemisch mit 80 µg LFA. Als Kontrolle diente die Injektion von 80 µg LFA allein (Tiere 7+8), als Trägermedium fungierte wiederum Opti-MEM-I. Die Therapie erfolgte an den Tagen 0, 2 und 7, die Tötung und Tumorentnahme 2 Tage nach der letzten Therapie (Tag 9). Die Tumorumfänge wurden wiederum an jedem Therapietag sowie vor der Tötung bestimmt.

*Versuch III:* Für die US8/93-Xenotransplantattumoren wurde ein Therapieversuch, der drei Tiere einschloss, durchgeführt. Die behandelten Tumoren gehörten zur Generation N2, das *in-vivo*-Tumorwachstum vor Therapiebeginn betrug 10 Wochen. Es wurde eine einmalige intratumorale Injektion mit 30 µg DNA und 90 µg LFA in Opti-MEM-I-Medium (Tier 1: mdm2-SE-ODNs; Tier 2: mdm2-AS-ODNs; Tier 3: mdm2-AS-ODNs links) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 150 µl. Als Kontrolle diente die intratumorale Applikation von 150 µl PBS (Tier 3, rechts).

Zwei Tage nach o.g. Therapie wurde Tier 2 getötet. Bei den verbliebenen Tieren schloss sich eine nochmalige Therapie mit den gleichen Ansätzen, aufgrund von leichten Präzipitationen der Lipid-DNA-Komplexe im ersten Zyklus aber mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Injektion, an. Drei Tage später wurden die Tiere eingeschläfert und die Tumoren entnommen. Die Tumorgößen wurden kontinuierlich gemessen.

### **3.6 Einbettung in Paraffinblöcke**

Nach mindestens 24-stündiger Fixierung in 4%igem neutralen Formalin wurden die entnommenen Gewebeproben für histologische und immunhistochemische Untersuchungen in Paraffinblöcke eingebettet. Dies erfolgte in den entsprechenden Kapseln automatisch mittels dem Hypercenter XP (Fa. Shandon). Folgendes Programm kam dabei zur Anwendung (aufsteigende Alkoholreihe):

- 1 h Einwirkzeit 70%iger Alkohol
- 1 h Einwirkzeit 80%iger Alkohol
- 2 x 1 h 96%iger Alkohol
- 2 x 1 h Rotisol-Lösung
- 2 x 1 h Roticlear-Lösung
- 2 h Roticlear Lösung
- 2 x 2 h Paraffin.

Abschließend Gießen des Paraffinblocks.

### **3.7 HE-Färbung**

Nach dem Anfertigen von Semidünnschnitten am Mikrotom wurden diese auf Objektträger aufgezogen und 20 min bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Die Färbung erfolgte gemäß dem nachfolgend beschriebenen Protokoll:

- Absteigende Alkoholreihe (Xylol 2 x 10 min, jeweils 2 min 96% – 80% – 70%iger Alkohol, abschließend 2 min Aqua dest.)
- 10 min in Haemalaun

- 10 min Bläuen in klarem Leitungswasser
- 2 min in Eosin
- Spülen des Objektträgers (Leitungswasser)
- Aufsteigende Alkoholreihe (70% – 80% – 96%iger Alkohol jeweils 2 min, Carbol-Xylol einige Sekunden, 3 x jeweils kurze Xylol-Behandlung)
- Eindecken der Schnitte

### 3.8 Immunhistochemische Verfahren

Für die immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte wurden die in Tabelle 2 (S. 7) aufgelisteten Primärantikörper sowie Sekundärantikörper gegen die Ig-Subklasse der jeweiligen Primärantikörper verwendet. Diese besondere Vorgehensweise wurde notwendig aufgrund nicht zu tolerierender Unspezifitäten in ersten Probefärbungen mit den standardmäßig verwendeten Sekundärantikörpern. Als Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen wurde die Kreuzreaktivität von Anti-Maus-Ig-Antikörpern mit Epitopen von Mausgewebe diskutiert. In den folgenden Färbungen schien sich diese Hypothese zu bestätigen, da speziell gegen die Ig-Subklasse der Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper deutlich weniger Unspezifitäten zeigten.

Folgendes Protokoll kam für die Paraffinschnitte zur Anwendung:

- Anfertigung von 4- $\mu$ m-Paraffinschnitten mittels Mikrotom
- Aufziehen der Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger
- Inkubation über 15 min bei 60°C (Trockenbrutschrank)
- Entparaffinierung im Xylolbad (zweimal 5 min)
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
  - zweimal 3 min mit 99%igem Ethanol
  - zweimal 1 min mit 95%igem Ethanol
  - zweimal 1 min mit 70%igem Ethanol
- Spülen des Objektträgers für 5 min in PBS (pH 7,4)
- Inkubation für 30 min in 0,1%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Blockierung endogener Peroxydaseaktivität)
- 5 min in 6%iger Trägerproteinlösung (Blockierung unspezifischer Primär-Ak-Absorption)

- Abtupfen des Blockierungsreagenz
- Applikation der Primär-Ak-Lösung (siehe Tabelle 2, S. 7)
- Inkubation für ca. 12 h in feuchter Kammer bei 4°C
- PBS-Spülung zweimal 5 min
- Applikation der Sekundär-Ak-Lösung (Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen)
- Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
- PBS-Spülung zweimal 5 min
- 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Lösung
- PBS-Spülung zweimal 5 min
- 3- bis 5-minütige Inkubation mit Chromogen-Lösung (AEC)
- Stoppen der Farbreaktion im Wasserbad
- Leichte Gegenfärbung der Schnitte mit Mayers Haemalaun
- Eindecken der Schnitte mit Gelatine

### 3.9 Elektronenmikroskopie

Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden sofort nach ihrer Entnahme und Zerkleinerung in ca. 2 – 4 mm dicke Gewebstreifen in 3%igem phosphatgepufferten Glutaraldehyd für 24 h fixiert. Danach wurden die Proben dreimal in  $\text{PO}_4$ -Puffer gespült und weiterverarbeitet bzw. in  $\text{PO}_4$ -Puffer gelagert. Die Einbettung der Gewebestücke erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 2 h Inkubation in 1%iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung
- 2-malige Spülung (jeweils 15 min) in Phosphat-Puffer
- Dehydrierung (aufsteigend Aceton):
  - jeweils 30 min in: 30%-, 50%-, 70%-, 80%- und 90%igem Aceton
  - 2 x 1 h 100%iges Aceton
- 2 x 15 min Inkubation in Propylenoxid
- 1 h in einer Mischung aus Propylenoxid und Durcupan im Verhältnis 3 : 1
- 1 h in einer Mischung aus Propylenoxid und Durcupan zu gleichen Teilen
- 1 h in einer Mischung aus Propylenoxid und Durcupan im Verhältnis 1 : 3
- 3 x 2 h Inkubation in reinem Durcupan bei ca. 45°C im Brutschrank
- abschließende Einbettung in Durcupan und härten lassen für 48 h bei 65°C

- Anfertigen eines Semidünnschnittes (0,35 µm) und Färbung mit Toluidinblau für lichtmikroskopische Untersuchung der relevanten Areale
- Anfertigen eines Ultradünnschnittes (50 – 70 nm)
- Kontrastierung des Schnittes mit Uranylacetat und Bleizitrat

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Transplantationsergebnisse**

Die Induktion von Tumoren auf der Nacktmaus zeigte je nach Zelllinie unterschiedliche Ergebnisse. So kam es bei der kommerziell erhältlichen RD-Zelllinie in den meisten Fällen zum Auswachsen von Tumoren an den Injektionsstellen. Die durchschnittliche Zeit, die bis zum erstmaligen palpatorischen Nachweis dieser Tumoren verging, betrug ca. 3 – 4 Wochen. Ebenso unkompliziert gestalteten sich die weiteren Xenotransplantationsexperimente. So konnte im weiteren Verlauf mit einer Anwachsrate von 80 – 100% der Xenotransplantate gerechnet werden. In dieser Hinsicht decken sich unsere Ergebnisse mit denen in der Literatur (Nanni *et al.*, 1989). Zur Auswertung kommen drei durch Injektion auf der Nacktmaus induzierte Tumoren (Tumorgeneration N1), zwei Tumoren der Generation N2, d.h. der ersten Transplantationsserie und sechs Tumoren der zweiten Transplantationsserie (Generation N3).

Ähnlich stellten sich auch die Transplantationsergebnisse bei der selbstetablierten Zelllinie 45/92 dar. Aufgrund eines relativ aggressiven Wachstumsverhaltens konnten ohne größere Schwierigkeiten Tumoren der Generationen N1, N2 und N3 erzeugt werden. Die durchschnittliche Zeit bis zum ersten Tumornachweis nach Injektion lag mit 2 – 4 Wochen in etwa ähnlichen Dimensionen wie bei der RD-Zelllinie, die Anwachsrate der Xenotransplantate können mit 90 – 100% beziffert werden. In die Auswertung fließen zwei Tumoren der Generation N1, fünf Tumoren der Generation N2 sowie zwei Tumoren der Generation N3 ein.

Im Gegensatz zu den beiden ersten Zelllinien erforderte es einen längeren Zeitraum, um Tumoren mit der selbstetablierten Zelllinie US8/93 per s.c.-Injektion zu erzeugen. So mussten mehrere Versuche mit leichten Variationen von Zellzahl, Milieu und Injektionstechnik (siehe Kap. 3) vorgenommen werden. Die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten der Tumoren war mit 5 – 8 Wochen deutlich länger als bei den anderen beiden Zelllinien. Die Anwachsrate nach Xenotransplantation erreichten

ca. 50 – 75%, die Tumorverdopplungszeit lag im Vergleich ebenfalls deutlich höher. In die Auswertung konnten ein Tumor der Generation N1 sowie zwei Tumoren der Generation N2 aufgenommen werden.

Bemerkt werden muss, dass keiner der auf der Nacktmaus gewachsenen Tumoren nachweisbare Metastasen produziert hat. Diese Tatsache ist in Einklang mit den Angaben über Metastasenhäufigkeit nach subkutaner Xenotransplantation von humanen WTS in der Literatur zu sehen (Katenkamp, 1988). (Kuroki, 1984; Neulat-Duga *et al.*, 1984; Katenkamp *et al.*, 1987; Katenkamp *et al.*, 1988; De Giovanni *et al.*, 1989; Nanni *et al.*, 1989; Chao & Greager, 1997; Crnalic *et al.*, 1997)

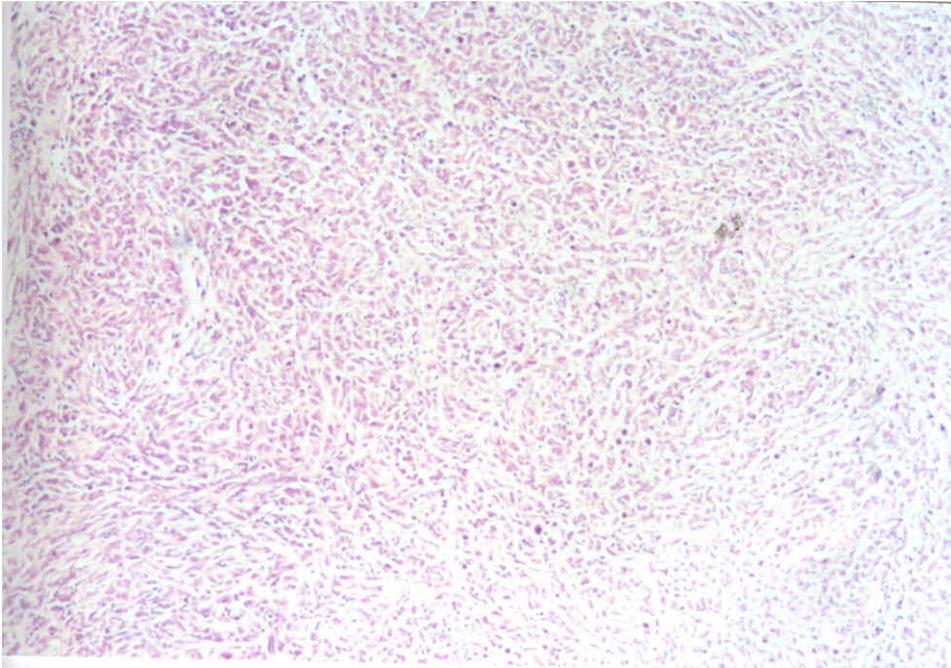
Im Folgenden sollen die auf der Nacktmaus induzierten Tumoren feingeweblich charakterisiert und vergleichend analysiert werden. Dabei werden zunächst nur die durch uns induzierten Tumoren untereinander verglichen. Bei den beiden selbstetablierten Zelllinien US8/93 und 45/92 werden die Primärtumoren vergleichend mit herangezogen. Die Ergebnisse der genterapeutischen Experimente werden im Anschluss besprochen.

## **4.2 Vergleichende lichtmikroskopische Auswertung**

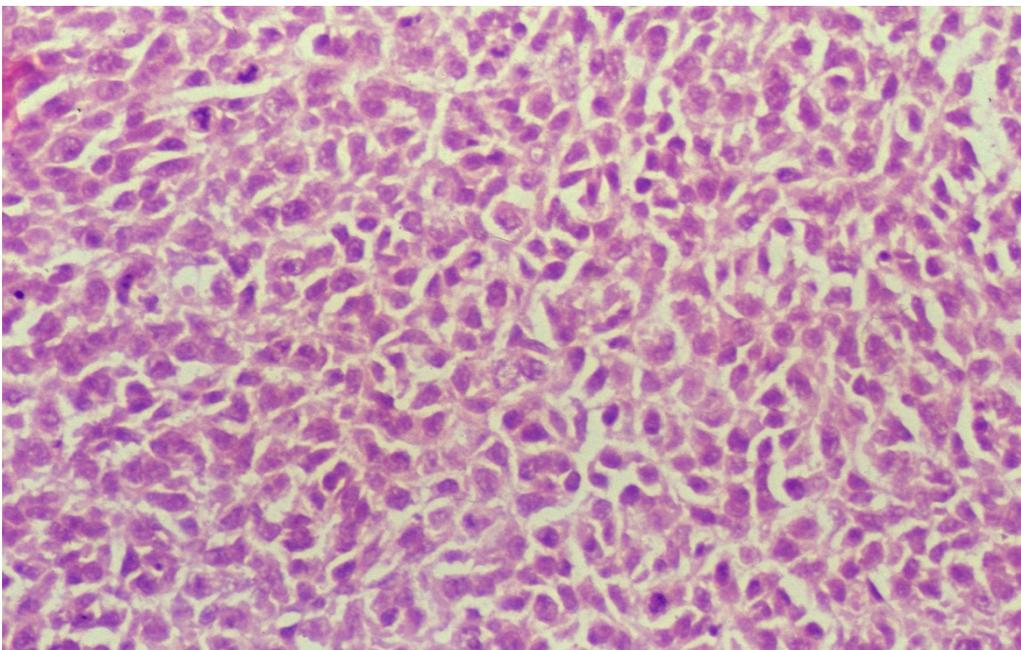
### **4.2.1 Xenotransplantate der RD-Zelllinie**

Das histologische Bild der Tumoren, die nach Injektion auf der Nacktmaus gefunden wurden (N1), unterscheidet sich im Einzelnen nur wenig. Die Tumoren imponieren durch knotenförmiges Wachstum und sind von einer zarten, bindegewebigen Kapsel umgeben, die nirgends durchbrochen wird. Allgemein ergibt sich das Bild eines relativ großzelligen, polymorphen Sarkoms. Die Zellformen variieren von spindelzellig über polygonal bis rundzellig, teilweise sind völlig irreguläre Formen zu finden. Der großzellig-runde Typ bestimmt jedoch das Bild. Die Kerne sind überwiegend groß, rund, mit mehreren Nukleoli, teilweise auch gelappt. Der Zytoplasmagehalt ist allgemein gering. Einzelne Areale zeigen ein storiformes, manchmal auch strang- und bandförmiges Wachstum, ansonsten aber ist kein geordnetes Wachstumsmuster ersichtlich (siehe Abb. 4 und 5). Vereinzelt sind im gesamten Tumorgewebe verteilt Riesenzellen nachweisbar. Zeichen einer rhabdomyomatösen Differenzierung in Form von Rhabdomyoblasten oder gar Querstreifung, wie sie angesichts der Ausgangszelllinie erwartet werden könnten, sind nicht nachweisbar. Die Grundsubstanz- und Faserproduktion ist durchweg als sehr gering einzustufen.

Außer im Bereich von nekrotischen Arealen sind selten Apoptosefiguren zu finden, Mitosen zeigen sich reichlich.

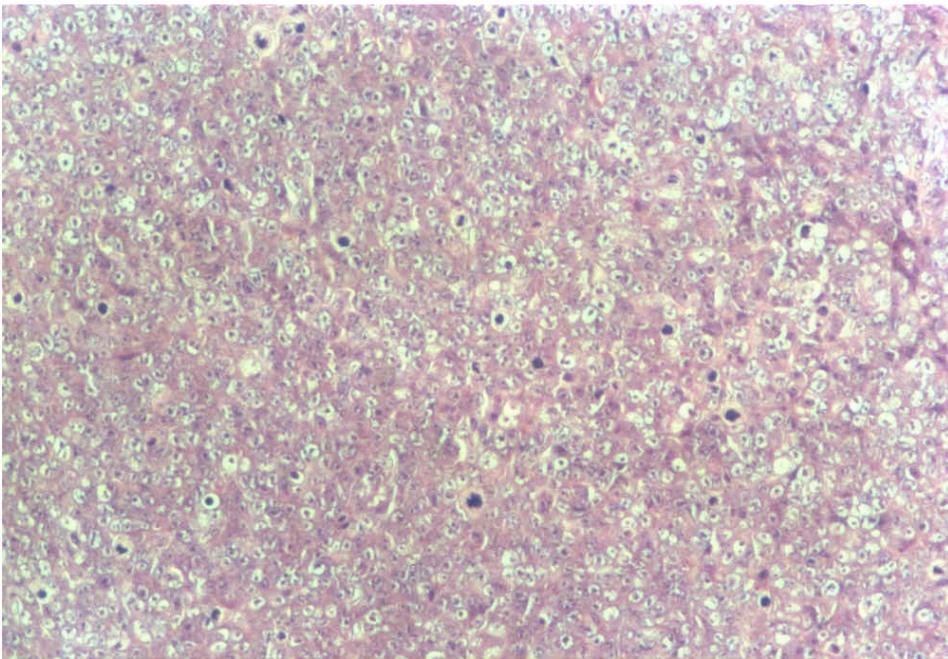


**Abb. 4** Gesamtübersicht (x90) Tumor RD1.3 – größtenteils ungeordnetes Wachstumsmuster mit diskret angedeutetem storiformen Wachstumsmuster

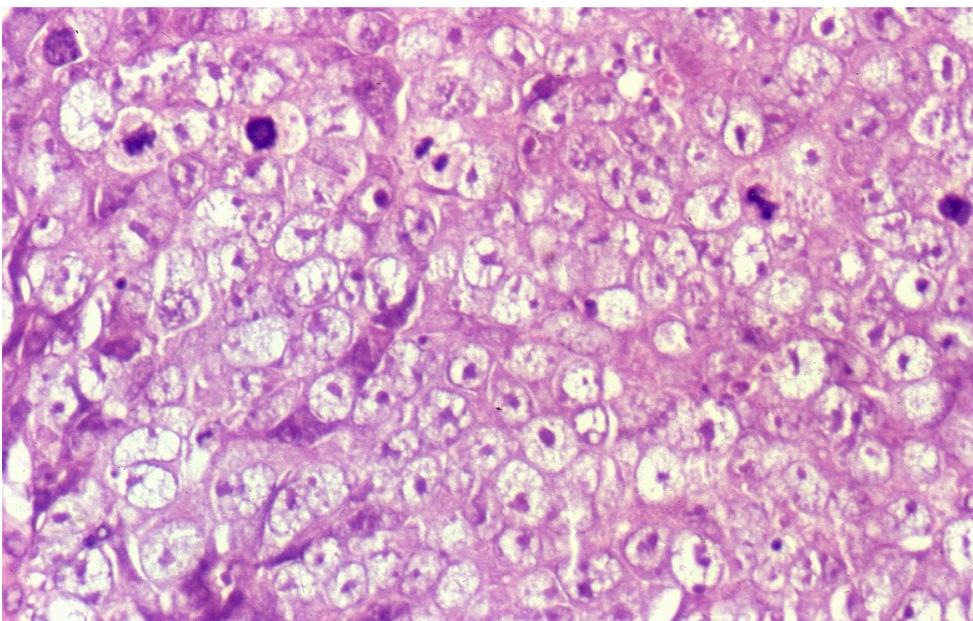


**Abb. 5** Detailansicht von RD1.3 (x370) – polymorphe Tumorzellen in ungeordnetem Verband dominieren das Zellbild, daneben einige Mitosen und einzelne Apoptosekörperchen

In den Tumorgenerationen N2 und N3 sind lichtmikroskopisch keine wesentlichen Änderungen des eben beschriebenen Phänotyps zu vermerken. Eine etwas größere Tendenz zu ausgedehnten Nekrosen ist zum größten Teil wahrscheinlich der stark variierenden Geschwulstgröße geschuldet. Insgesamt gesehen erscheint das Zellbild etwas eintöniger mit großen, runden Zellen und meist rundlichen Kernen, Anzeichen von Differenzierung auf zellulärer Ebene sind nicht zu erkennen (Abb. 6 und 7). Variationen betreffen die Anzahl der Riesenzellen, die Ausbildung von Grundsubstanz und ein streckenweise zu erkennendes storiformes Wachstumsmuster.



**Abb. 6** RD3.2 (x180) – N3-Tumor mit uniformem rundzelligem Gewebsbild und vielen Mitosen

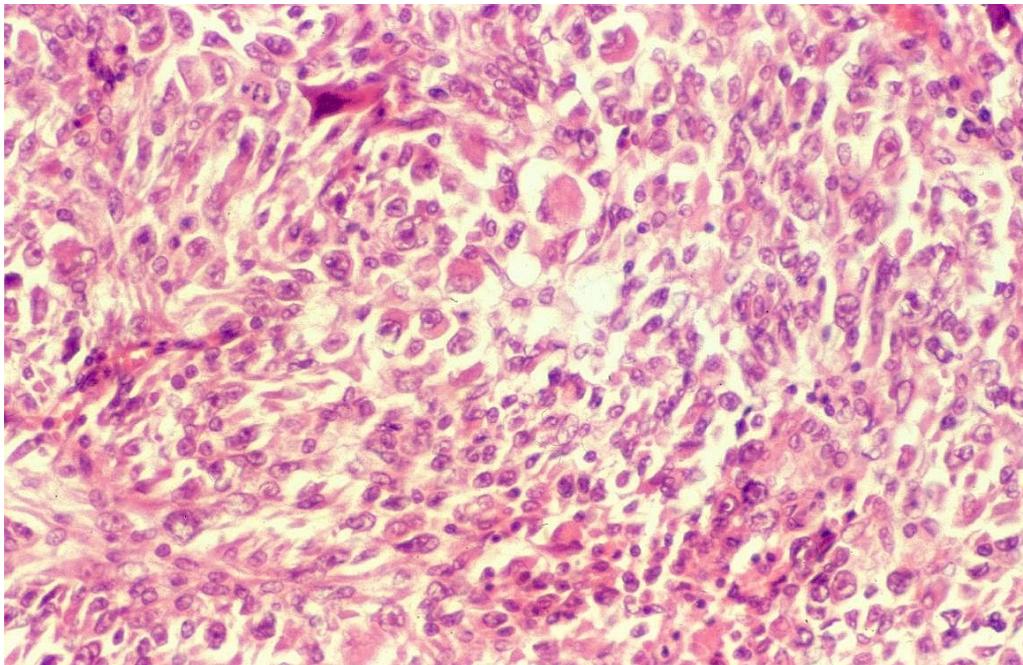


**Abb. 7** Detailansicht von RD3.2 (x600)

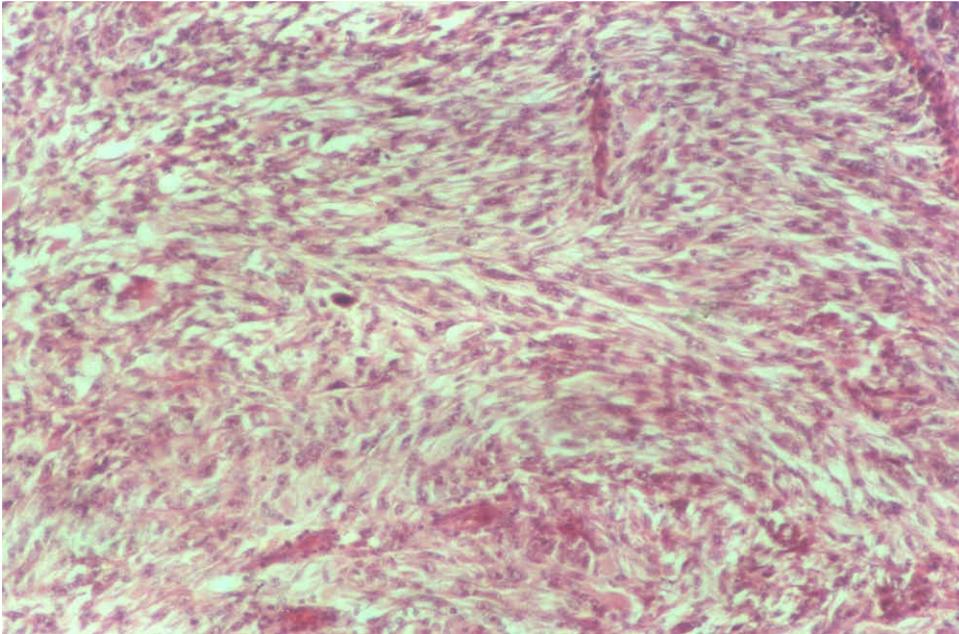
#### 4.2.2 Xenotransplantate der Zelllinie 45/92

*Primärtumor:* In den Vergleich einfließen sollen ebenfalls die histologischen Befunde der Primärtumoren, die als Ausgangsmaterial für die beiden selbstetablierten Zelllinien dienten. Für den Primärtumor der 45/92 (im Folgenden PT45/92) ergab sich folgender Befund:

Es handelte es sich um ein ca. 8 x 7 cm großes, aus dem Handteller entnommenes Gewebstück. Makroskopisch bestand der Tumor aus weichen, bröcklig-schmierigen Massen von grau-blassbräunlicher Farbe. Das Gewebe veränderte seine Konsistenz auch nach Fixierung wenig. Lichtmikroskopisch ist eine zeldichte, mesenchymale Neubildung zu beschreiben. Die Zellformen sind überwiegend spindelförmig, das Wachstumsmuster faszikelartig und sich-durchflechtend (Abb. 9). Polygonale Zelltypen kommen vor, vereinzelt sind Rhabdomyoblasten mit stark eosinophilem Zytoplasma auszumachen (Abb. 8).



**Abb. 8** Primärtumor der 45/92-Zelllinie (x300): Es imponieren polygonale Zellformen, einige Mitosen, eingestreut eosinophile Zellen und Rhabdomyoblasten



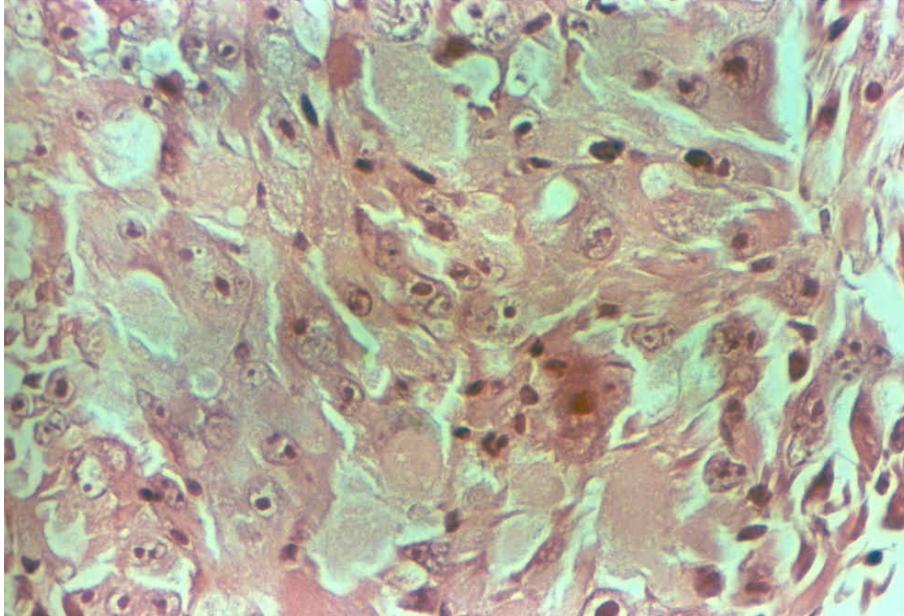
**Abb. 9** Primärtumor 45/92 (x150): Strang- bzw. faszikelartiges Wachstumsmuster

Die Kernformen sind als überwiegend vesikulär mit prominenten Nukleoli einzustufen. In einzelnen Arealen kommen Tumorroriesenzellen mit Phagozytosen vor. Querstreifung ist nicht nachweisbar.

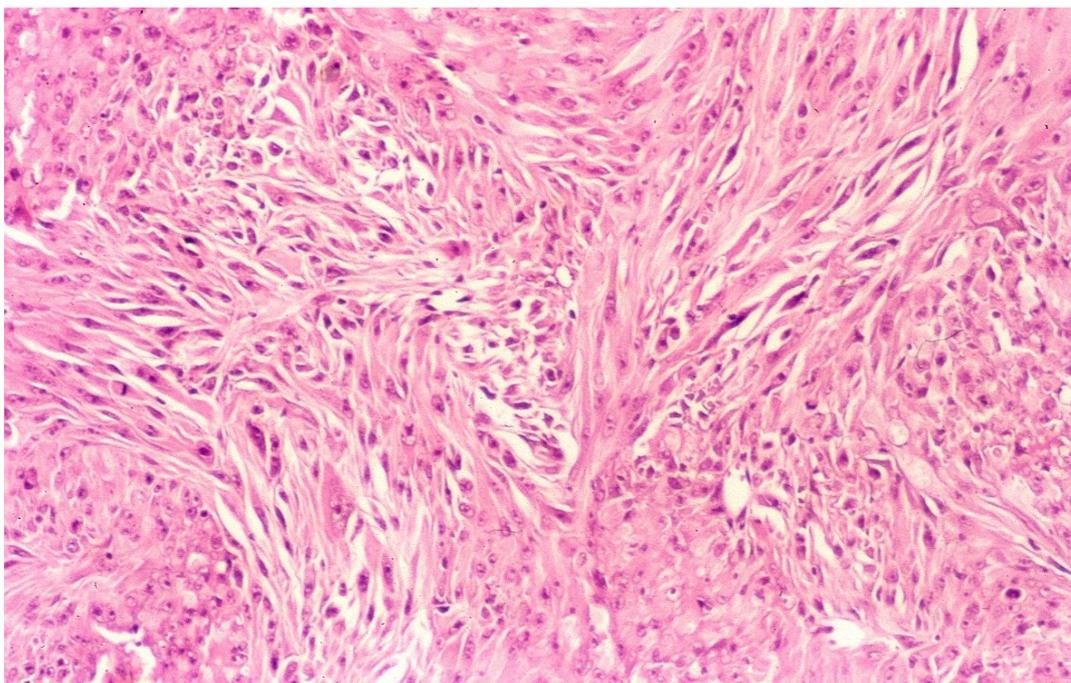
*Xenotransplantate:* Die Tumoren der Generation N1 waren durch relativ aggressives Wachstumsverhalten und erstaunliche Größenzunahme in kurzer Zeit charakterisiert. Makroskopisch meistens weich und homogen, waren die Tumoren von einer zarten Kapsel umgeben. Histologisch lässt sich in den meisten Arealen ein eintöniges, ungeordnetes Wachstumsmuster feststellen. Vereinzelt kommen Areale mit einem storiformen Wachstumsprinzip zur Darstellung. Das Zellbild wird geprägt von spindelförmigen, großen Tumorzellen mit vesikulären Kernformen und prominenten Nukleoli. Die Varianz der Zellformen und -größe ist ebenso wie der Zytoplasmagehalt gering. Es finden sich einige wenige Rhabdomyoblasten (Abb.11), ihre Anzahl ist aber in Relation zum Gesamttumor deutlich geringer als im PT45/92. Querstreifung ist auch hier nicht zu finden. Einzelne Tumorroriesenzellen sind nachweisbar, infiltratives Wachstum findet sich nicht.

In Generation N2 finden sich keine generellen Änderungen vom gerade beschriebenen Muster. Einige Tumoren zeigen ausgedehntere Nekrosen (Abb. 12), die Apoptosehäufigkeit ist in allen Tumoren ähnlich niedrig. Die Anzahl der

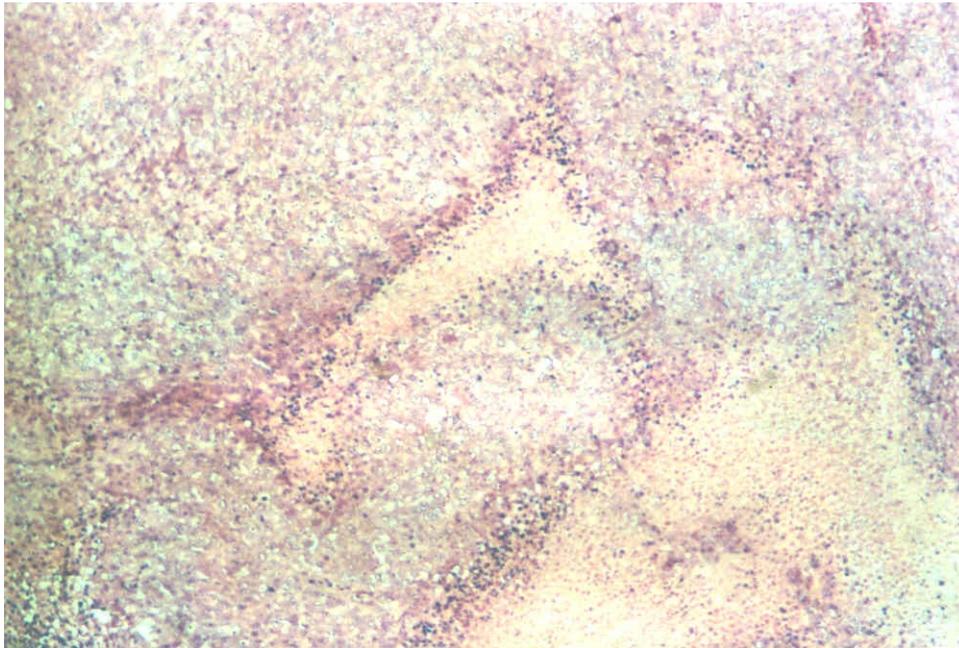
Riesenzellen variiert, in einzelnen Schnitten kommen ganze Areale mit Tumorriesenzellen zur Darstellung (Abb. 10).



**Abb. 10** RS2.5 (x450) – N2-Tumor der 45/92 mit granulierten, teilweise mehrkernigen Riesenzellen



**Abb. 11** RS2.5 (x185) – N2-Tumor der 45/92 mit faszikelartigem, sich durchflechtendem Wachstumsmuster, eingestreut ein Rhabdomyoblast (Pfeil)



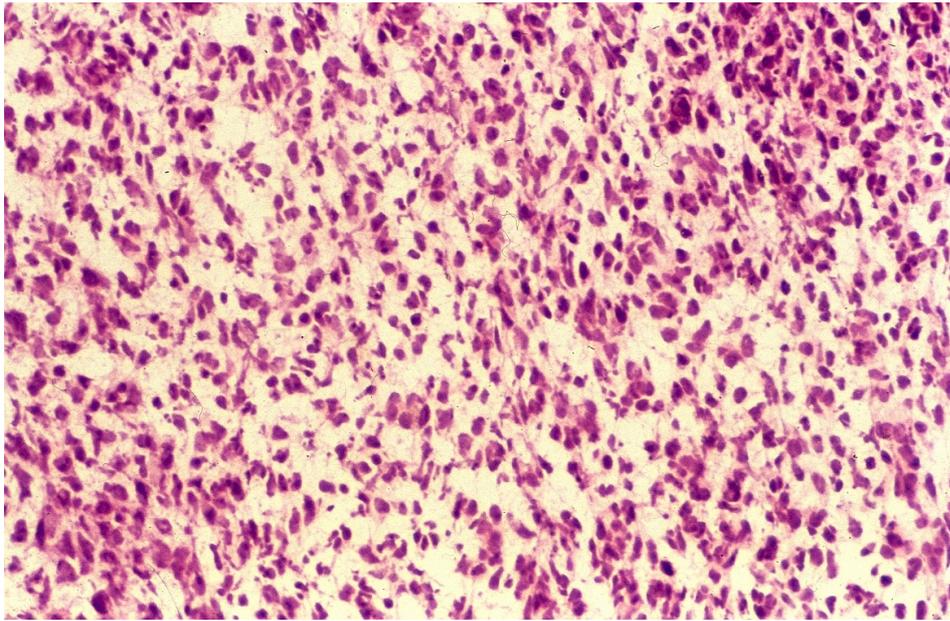
**Abb. 12** RS2.2 (x100) – ausgeprägte zentrale Nekrosen in einem 45/92-Xenotransplantattumor, randständig vermehrt Apoptosefiguren

Das Wachstumsprinzip ist größtenteils ungeordnet, teilweise sind aber auch Stellen mit faszikelartiger Anordnung der Zellen und ein storiformes Wachstumsmuster auszumachen. Anzeichen einer rhabdomyomatösen Differenzierung in Form von Rhabdomyoblasten sind rar (Abb. 11). Querstreifung findet sich nicht. Ähnlich liegen die Verhältnisse auch in der Tumorgeneration N3.

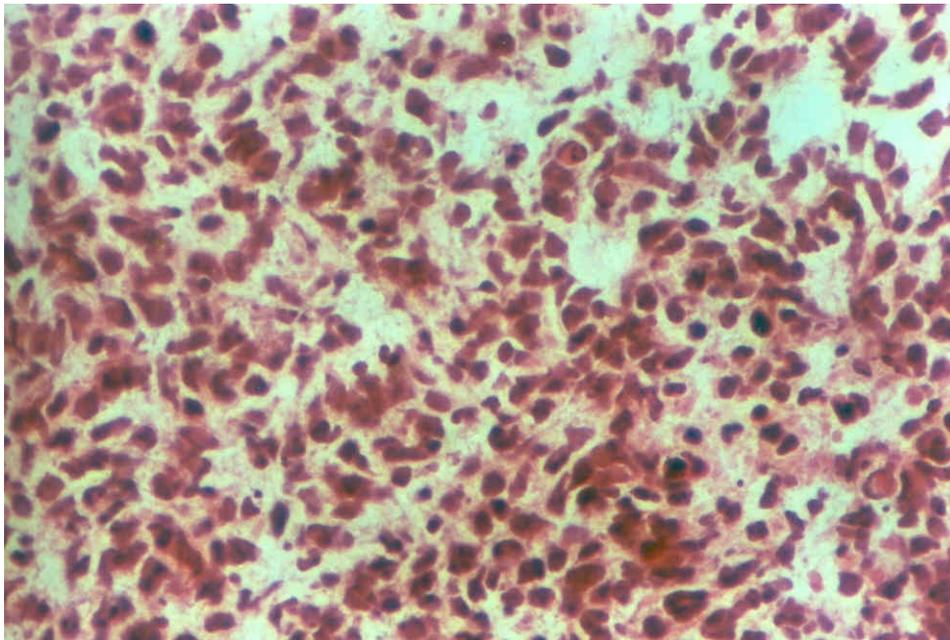
#### **4.2.3 Xenotransplantate der Zelllinie US8/93**

*Primärtumor:* Makroskopisch stellte sich der aus der lateralen Thoraxwand entnommene Tumor als relativ weicher, im Durchmesser maximal 5 cm messender grau-rötlicher Knoten dar.

In der histologischen Untersuchung zeigt sich ein polymorphzelliges, undifferenziertes Sarkom mit teilweise ausgedehnten, landkartenartig-konfluierenden Nekrosen. Die Zellformen sind meist polygonal, an manchen Stellen kommen aber auch fusiforme Zellen mit abgerundeten Kernen zur Darstellung. Insgesamt erscheint das Zellbild sehr dicht, ein eindeutiges Wachstumsmuster ist nicht auszumachen. Fokal deutet sich eine myxoide Auflockerung an. Tumorrisenzellen sind nur vereinzelt zu sehen. Anzeichen einer rhabdomyomatösen oder neurogenen Differenzierung finden sich nicht (Abb. 13 und 14).



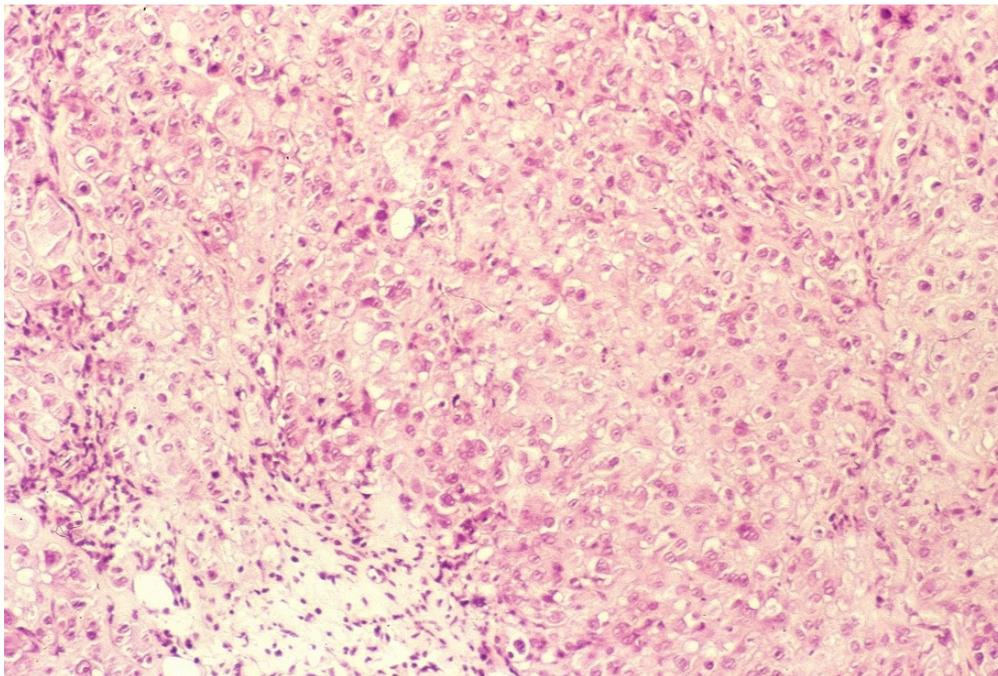
**Abb. 13** Primärtumor 8/93 (x300) – es zeigt sich ein polymorphes Zellbild sowie ein ungeordnetes Wachstumsmuster



**Abb. 14** Primärtumor 8/93 (x450) – Detailansicht von Abb. 13, polygonale Zellformen mit kleinen chromatinreichen Kernen, mäßige Grundsubstanzproduktion

*Xenotransplantate:* Aufgrund der schlechten Übertragbarkeit der Tumoren auf die Nacktmaus (siehe Kap. 4.1) konnten nur wenige Tumoren in die Auswertung einfließen. Trotzdem erscheint eine wenn auch exemplarische Betrachtung vor allem im Hinblick auf die durchgeführten gentherapeutischen Versuche sinnvoll.

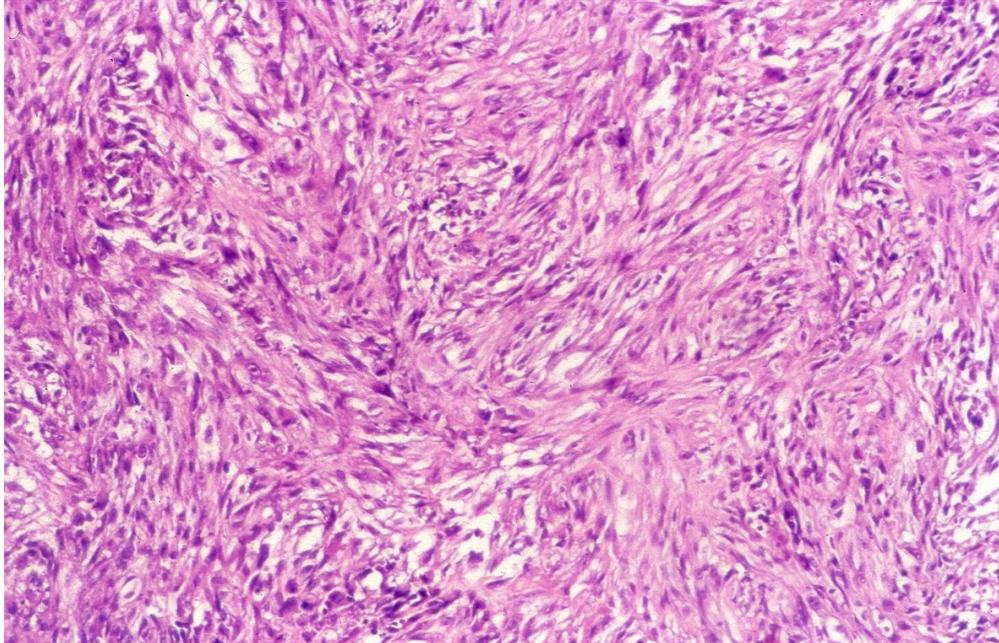
Die Tumoren unterschieden sich schon makroskopisch deutlich von ihren Pendants in der RD- und 45/92-Zelllinie. So waren ein kleinknotiges Wachstum und eine zum Teil sehr harte Konsistenz auffällig. Die maximal erreichte Größe war mit einem Durchmesser von ca. 0,8 – 1 cm im Vergleich zu bis zu 4 cm ebenfalls deutlich niedriger. Histologisch ist das Bild in Generation N1 geprägt von einem undifferenzierten, großzellig-runden Gewebsbild mit eingestreuten Riesenzellen. Die Zell- und Kernformen variieren nur wenig. In manchen Bereichen deutet sich ein epitheloides Wachstum mit soliden Formationen an (Abb. 15).



**Abb. 15** US1.1 (x120) – N1-Tumor der US8/93 mit angedeutetem organoiden Wachstumsmuster

Nekrosen sind nicht nachweisbar, ebenso findet keine Grundsubstanzproduktion statt, myxoide Areale kommen nicht vor. Demgegenüber finden sich in N2, abgesehen von ähnlichen Formationen wie für N1 beschrieben, teilweise große Areale mit faszikelartiger Anordnung der Tumorzellen und einem storiformen Wachstumsmuster (Abb. 16). Die Zellformen sind hier eher spindelförmig gestreckt,

die Kerne chromatinreich und länglich. Tumorzellen sind spärlich eingestreut. Im Innern des Tumors finden sich Nekrosen. Anzeichen von zellulärer Differenzierung sind nicht zu auszumachen.



**Abb. 16** US2.1 (x120) – N2-Tumor der US8/93 mit ausgeprägtem faszikelartigen Wachstum und Dominanz eines fusiformen Zellbildes

### 4.3 Immunhistochemie

#### 4.3.1 Xenotransplantate der RD-Zelllinie

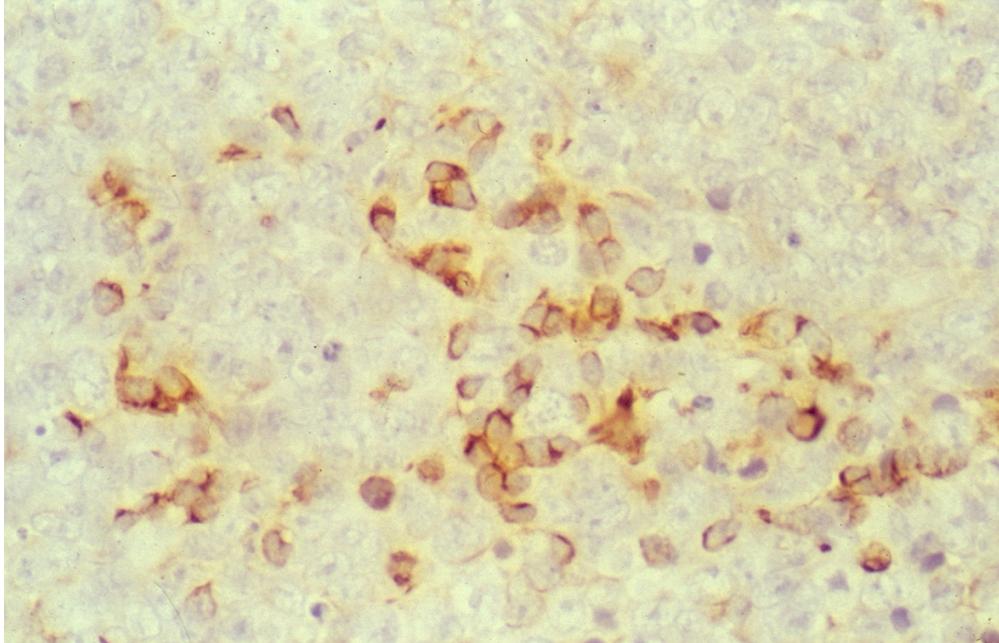
Immunhistochemisch zeigt sich bei allen RD-Tumoren (Generation N1 – N3) folgendes Muster:

Tabelle 5

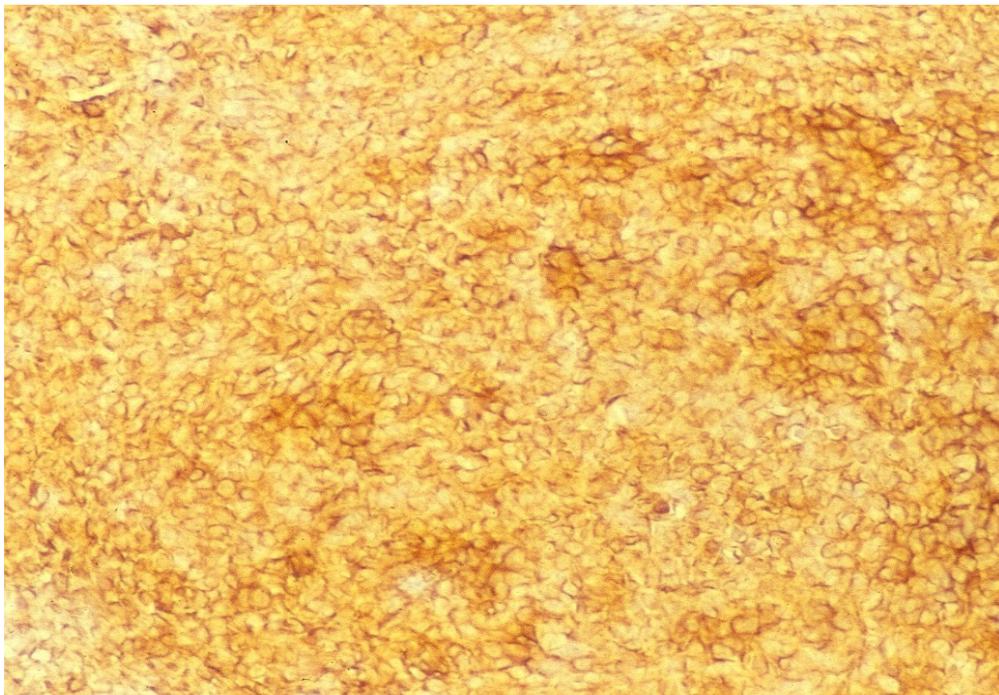
Vimentin:	+++	Desmin:	+	P53:	-
SMA:	einzelne Zellen	Cytokeratin:	-	MDM2:	-
Myoglobin:	-	CD34:	-		

*Legende:* +++ nahezu alle Zellen positiv, ++ mehr als 50% der Zellen positiv, + weniger als 50% der Zellen positiv, - keine Zelle positiv

Es ist eine ausgeprägte Expression von Vimentin festzustellen (Abb. 18). Die Desmin-Expression betrifft in einigen Arealen fast 70 – 80% der Zellen, ist aber in Relation zum gesamten Tumor als gering einzustufen (Abb. 17).

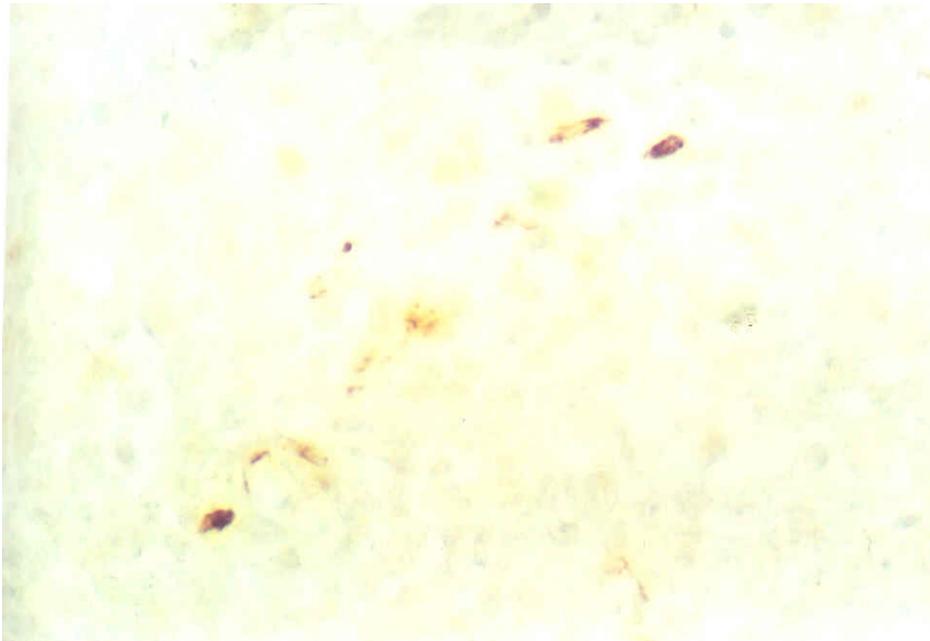


**Abb. 17** RD2.2 (x450) – Desmin-Färbung mit einzelnen positiven Zellen



**Abb. 18** RD2.2 (x180) – Im gleichen Tumor hohe Vimentin-Positivität

In der SMA-Färbung stellen sich lediglich einzelne Zellen positiv dar.



**Abb. 19** RD2.2 (x470) – SMA-Färbung mit vereinzelt positiven Zellen

Im immunhistochemischen Muster wird die Herkunft der Tumoren aus einer Rhabdomyosarkom-Zelllinie einigermaßen sichtbar. Dazu passt die Expression von Vimentin und Desmin. Eine Myoglobin-Expression ist bei einem derart undifferenzierten Tumor kaum zu erwarten (Brooks, 1996; Ordóñez, 1998) und Gaffney (Gaffney *et al.*, 1993) berichtet bei immerhin 6 von 8 Rhabdomyosarkomen von einer SMA-Expression. Bemerkenswerterweise sind alle intratumoralen Gefäße CD34-negativ, was den Schluss nahe legt, dass diese Gefäße von der Maus stammen.

#### 4.3.2 Xenotransplantate der Zelllinie 45/92

Die Immunhistochemie des Primärtumors (PT45/92) ergab folgendes Bild:

Tabelle 6

Vimentin:	+++	Desmin:	-	P53:	-
SMA:	-	Cytokeratin:	-	MDM2:	-
Myoglobin:	++	CD34:	-		

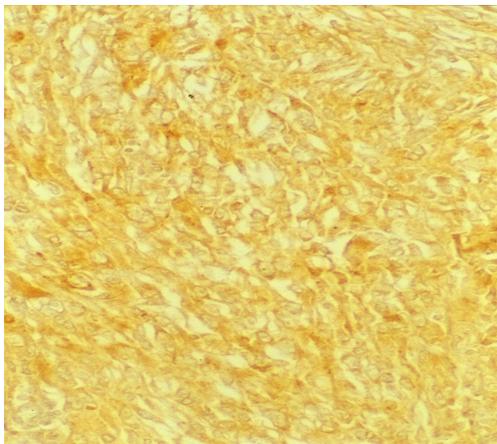
Die Immunhistochemie der 45/92-Transplantattumoren (Generation N1 – N3) erbrachte Folgendes:

Tabelle 7

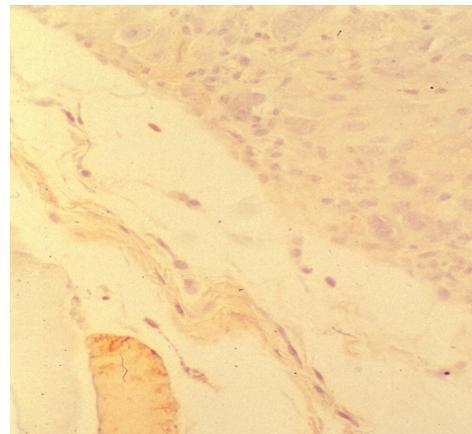
Vimentin:	+++	Desmin:	+	P53:	-
SMA:	-	Cytokeratin:	-	MDM2:	einzelne Zellen
Myoglobin:	-	CD34:	-		

*Legende:* siehe Tabelle 5

In allen Tumoren ist eine ausgeprägte, nahezu 100% der Zellen betreffende Vimentin-Expression festzustellen. Als bemerkenswerteste Veränderung fällt eine fehlende Myoglobin-Expression in den Transplantattumoren gegenüber deutlicher Myoglobin-Positivität des Primärtumors auf (Abb. 20). Das Argument, die Transplantattumoren könnten murines Myoglobin enthalten, das durch den Antikörper nicht erkannt wird, kann durch die gute Anfärbung von Mausmuskel entkräftet werden (siehe Abb. 21).

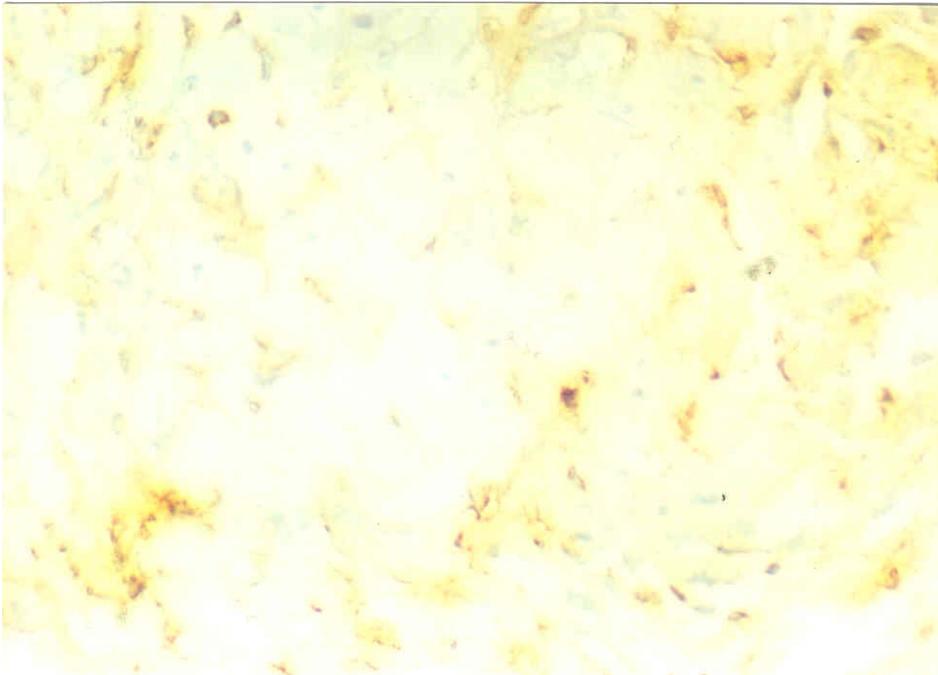


**Abb. 20** Primärtumor (x300) – Myoglobin-Färbung mit Positivität des Mausmuskels (Pfeil)



**Abb. 21** RS2.3 (x300) – Myoglobin-Färbung

Weiterhin ist in den Transplantattumoren eine neu aufgetretene Desmin-Expression zu verzeichnen, die in einzelnen Arealen zwar recht unterschiedlich, trotz allem aber in geringem Ausmaß konstant über den ganzen Tumor (Abb. 22) verteilt war. Darüber hinaus konnte in vereinzelt Zellen der 45/92-Xenotransplantattumoren MDM2 detektiert werden.



**Abb. 22** RS2.4 (x475) – 45/92-Xenotransplantat mit einigen Desmin-positiven Zellen

### 4.3.3 Xenotransplantate der Zelllinie US8/93

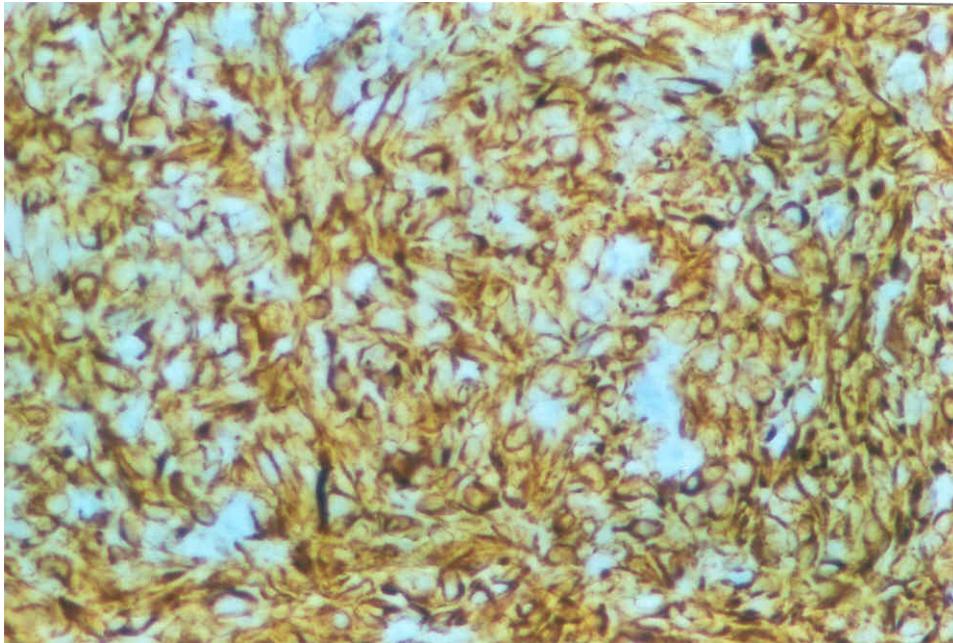
In der vergleichenden immunhistochemischen Untersuchung von Primärtumor und Xenotransplantaten konnten keine auffallenden Differenzen gefunden werden. Allgemein ergab sich folgendes Muster:

Tabelle 8

Vimentin:	++	Desmin:	-	P53:	-
SMA:	-	Cytokeratin:	-	MDM2:	-
Myoglobin:	-	CD34:	-		

*Legende:* siehe Tabelle 5

Die Vimentin-Expression ist im Vergleich zu RD und 45/92 etwas geringer, dennoch aber deutlich (Abb. 23).



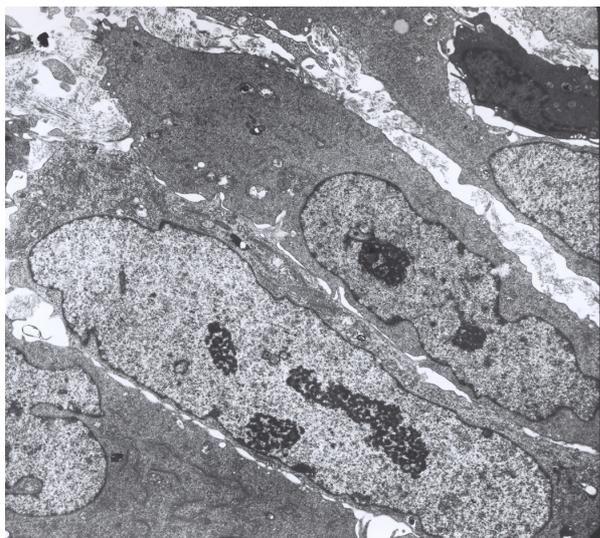
**Abb. 23** US1.1 (x300) – N1-Tumor der US8/93, Vimentin-Färbung

Alle anderen Färbungen waren vollkommen negativ, sowohl im Primärtumor als auch in den Xenotransplantaten. Es ergibt sich somit auch immunhistochemisch das Bild eines undifferenzierten mesenchymalen Tumors.

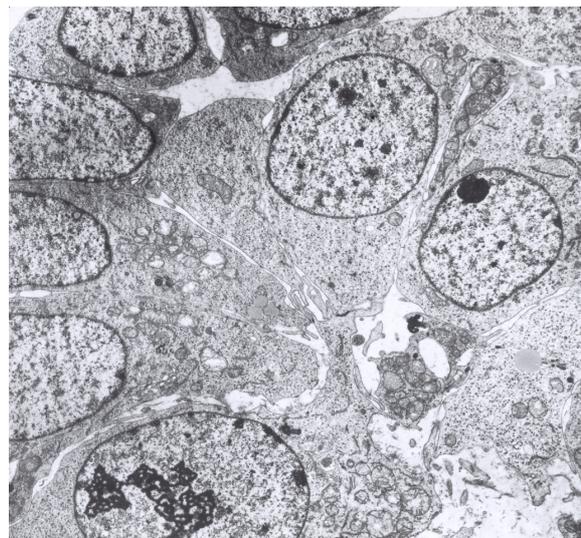
#### **4.4 Elektronenmikroskopie**

Die ultrastrukturellen Untersuchungen lieferten keine zusätzlichen Ergebnisse bezüglich eventuell vorhandener weiterer Differenzierungsmerkmale. Sämtliche untersuchten Tumoren – dazu zählten exemplarische Proben von allen drei xenotransplantierten Zelllinien – zeigen elektronenmikroskopisch das mehr oder minder immer gleiche undifferenzierte Muster eines mesenchymalen Tumors, der jegliche Differenzierungscharakteristika vermissen lässt. Es handelt sich ausnahmslos um Tumoren mit Dominanz eines primitiven mesenchymalen Zelltyps, wobei vom groben Aspekt her am ehesten an fibroblastenartige Zellen zu denken ist. Es imponieren große, teilweise unregelmäßig geformte Kerne, häufig mit aktivierten Nukleolen. Das Zytoplasma enthält außer vielen freien Ribosomen und

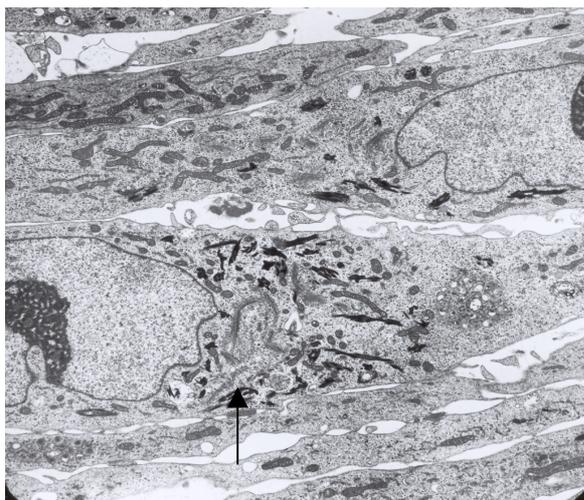
Mitochondrien keine weiteren Organellen, Intermediärfilamente waren nirgendwo nachweisbar. Die Zellen besitzen teilweise filiforme Ausläufer und mäßig häufig Zellkontakte (Abb. 24 und 25). Unterschiede zwischen den einzelnen Xenotransplantat-Gruppen lassen sich nur insofern machen, als dass in den 45/92-Xenotransplantaten Einschlüsse eines osmiophilen Lipids mit lamellärer Struktur zu finden sind (Abb. 26 und 27).



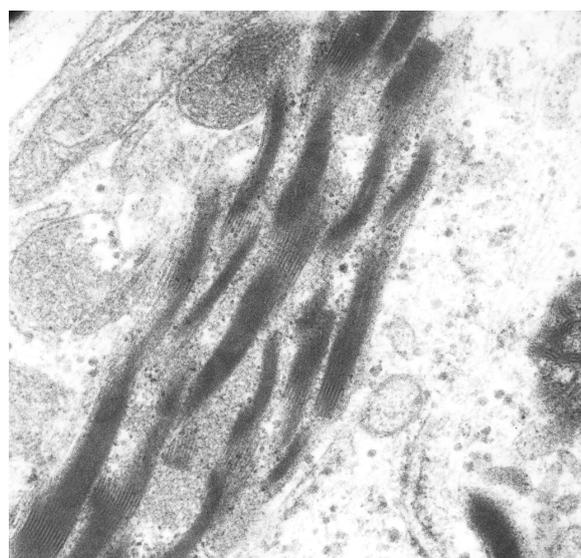
**Abb. 24** 8/93-Xenotransplantat (Elmi-Nr. 8791, x8000) – aktivierte Nukleolen, filiforme Ausläufer, keine wegweisenden Differenzierungsmerkmale



**Abb. 25** RD-Xenotransplantat (Elmi-Nr. 8639, x8000) – viele freie Ribosomen, aktivierter Nukleolus unten links



**Abb. 26** 45/92-Xenotransplantattumor mit osmiophilen Lipideinschlüssen (Pfeil) (Elmi-Nr. 8839, x8000)



**Abb. 27** Gleiches Präparat wie in Abb. 26, es zeigt sich eine lamelläre Struktur (x90000)

## **4.5 Genterapeutische Versuche**

### **4.5.1 Vorbemerkungen**

Im Anschluss an die Etablierung der beschriebenen WTS-Xenotransplantattumoren auf der Nacktmaus und deren feingewebliche Charakterisierung sollen im Folgenden erste Ergebnisse von *in-vivo*-Gentransfer-Versuchen an diesen Tumoren dargestellt werden. Dabei soll insbesondere Bezug auf eventuell fassbare histologische Veränderungen genommen werden, auch im Vergleich zu den schon beschriebenen Xenotransplantaten und dem Primärtumor (US8/93, 45/92).

Genterapeutische Versuche in Form von anfangs einmaliger intratumoraler Applikation liposomaler wtp53-Plasmide sowie Komplexen aus LFA und mdm2-AS-ODNs wurden an Xenotransplantaten der RD- sowie der US8/93-Zelllinie durchgeführt. Die besondere Situation des *in-vivo*-Modells wird schon anhand des technisch anspruchsvolleren Applikationsweges für potenzielle Therapeutika im Vergleich zu Untersuchungen an Zellkulturen (Meye, 2001) deutlich. Entsprechend ernüchternd fielen denn auch die Untersuchungen zu Aufnahmezeiten FITC-markierter ODNs nach Injektion in die Transplantattumoren aus. Es ergab sich beispielsweise eine tumorspezifische ODN-Aufnahmerate von 10 – 40% (Meye, 2001) – ein auf den ersten Blick recht hoher Wert. Im Vergleich aber zu Ergebnissen an den Zellkulturen (jeweils >90% bei RD und US8/93 (Meye, 2001)) ist das Resultat als enttäuschend zu bezeichnen. Um eine homogenere Verteilung der ODNs im Tumor zu erreichen, ist nachfolgend auch die ODN-Applikation mittels multipler Mikroinjektionen (siehe Kap. 3.5, Versuch II) in das gesamte Tumolvolumen versucht worden. Eine umfassende Charakterisierung von ODN-Aufnahmeraten und -Verteilungsmuster nach intratumoraler Injektion steht indes noch aus.

### **4.5.2 Morphologische Charakterisierung: Intratumorale Injektion von liposomalen wtp53-Plasmiden und mdm2-AS-ODNs in RD-Xenotransplantattumoren**

Im ersten Versuch wurde an drei Tieren mit RD-Xenotransplantaten eine dreimalige Injektionstherapie mit dem Vergleich Lipid (Tier1) vs. Lipid-Plasmid (Tier 2) vs. Lipid-ODN (Tier 3) durchgeführt (siehe Kap. 3.5). Das Experiment erstreckte sich über insgesamt 9 Tage. Dabei ließ sich bei allen Tumoren eine kontinuierliche

Größenzunahme mit max. 20% Volumenänderung über den gesamten Beobachtungszeitraum feststellen. Gemessen wurde jeweils der größte Tumordurchmesser.

Tabelle 9

Therapietag	Tumorgroße in mm		
	Tier 1	Tier 2	Tier 3
0	13	18	14
3	12	17	13
6	14	20	14
9	15	20	17

Die makroskopische Untersuchung ergab große zentrale Nekroseherde in den beiden DNA-therapierten Tumoren (Tier 2 und 3). Demgegenüber erschien der mit nur-Lipid behandelte Kontrolltumor (Tier 1) von fester Konsistenz. In der histologischen Untersuchung zeigten sich außer der großen, zentral im Tumor gelegenen Nekrose keine weiteren Veränderungen (Abb. 25 und 26).

**Tier 1**

LFA

**Tier 2**

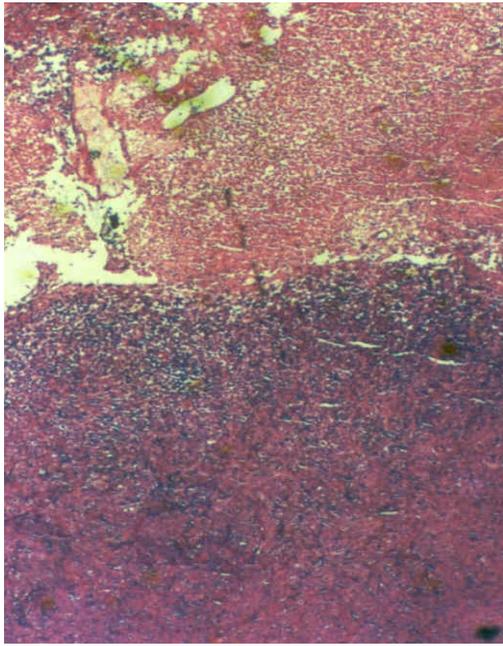
wtp53+LFA

**Tier 3**

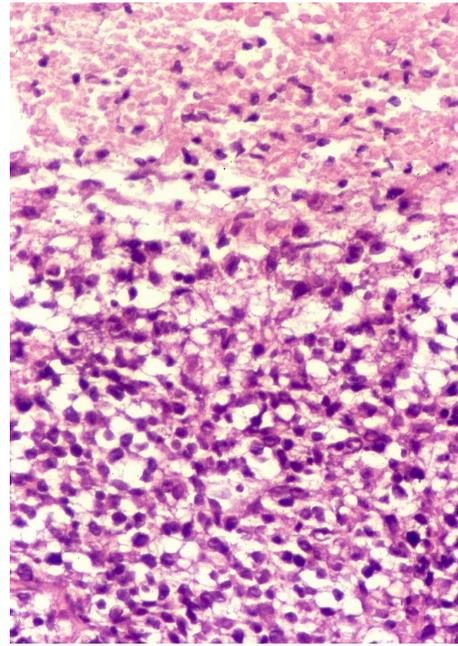
mdm2-AS+LFA



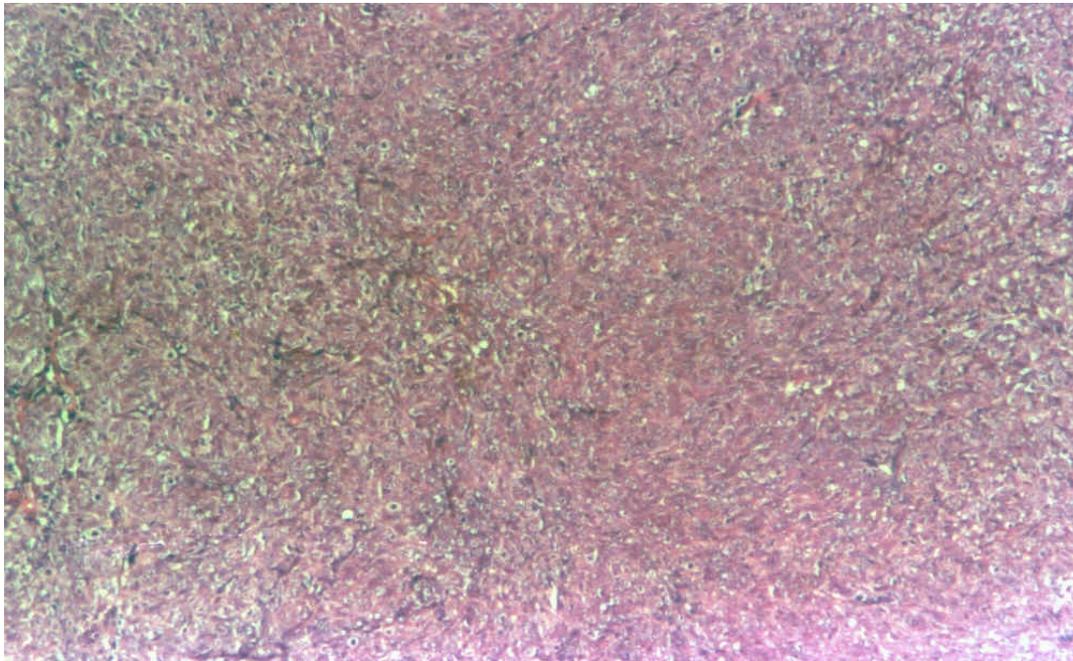
**Abb. 28** Makroskopisches Erscheinungsbild



**Abb. 29** Zentrale Nekrose im behandelten Tumor (x50, Tier 2)



**Abb. 30** Detailansicht Übergangsbereich mit vermehrt Apoptosefiguren (x370)



**Abb. 31** In zentralen Bereichen des Kontrolltumors (Tier 1) finden sich keine Nekrosen, es imponiert das bekannte, von primitiven polymorphen Zellen geprägte, undifferenzierte Gewebsbild (x100)

In den vitalen Randbereichen dominiert in allen Tumoren ein relativ undifferenziertes Zellbild, das von mittelgroßen, polygonalen Tumorzellen mit meist vesikulären Kernstrukturen geprägt wird. Dabei ist der Variantenreichtum der Zellformen sehr gering. Ein Wachstumsmuster ist nirgendwo ersichtlich, die Tumorzellen bilden einen losen, ungeordneten Verband. Tumorriesenzenellen sind spärlich, Rhabdomyoblasten finden sich nicht. Grundsubstanzproduktion ist ebenso wie entzündliches Infiltrat nicht vorhanden. Bis auf die Nekrosen im Zentrum der Tumoren sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den therapierten und dem Kontrolltumor auszumachen. Die Mitosenhäufigkeit ist in den vitalen Bereichen ähnlich, die Apoptosehäufigkeit erscheint in den behandelten Tumoren vor allem in den Grenzbereichen zwischen Nekrose und Tumorgewebe etwas größer, ist aber letztendlich nicht hochgradig verschieden. Der Vergleich mit den in Kap. 4.2.1 beschriebenen Xenotransplantattumoren ergibt keine bemerkenswerten Unterschiede hinsichtlich Differenzierungsgrad, Apoptosehäufigkeit oder Malignität. Da die Xenotransplantate der RD-Zelllinie schon an sich zu zentraler Nekrosebildung neigen, muss eine Wertung hinsichtlich der Größe und des Ausmaßes der Nekrosen nach Therapie mit DNA-Konstrukten zurückhaltend erfolgen.

Im zweiten Versuch mit Xenotransplantaten der RD-Zelllinie (diesmal insgesamt 8 Tiere, wtp53 vs. mdm2-AS vs. mdm2-SE vs. LFA-Kontrolle, siehe Kap. 3.5) zeigte sich bezüglich der Größenentwicklung der Tumoren eine ähnliche Tendenz wie im vorhergehenden Experiment. Es ergab sich eine kontinuierliche Größenzunahme aller Xenotransplantate, der maximale Volumenzuwachs betrug ca. 70%. Makroskopisch ließ sich kein so eindrücklicher Befund wie im vorangegangenen Experiment sichern, die Tumoren waren allesamt von ähnlicher Konsistenz, Nekrosen waren mehr oder minder in allen Proben zu finden.

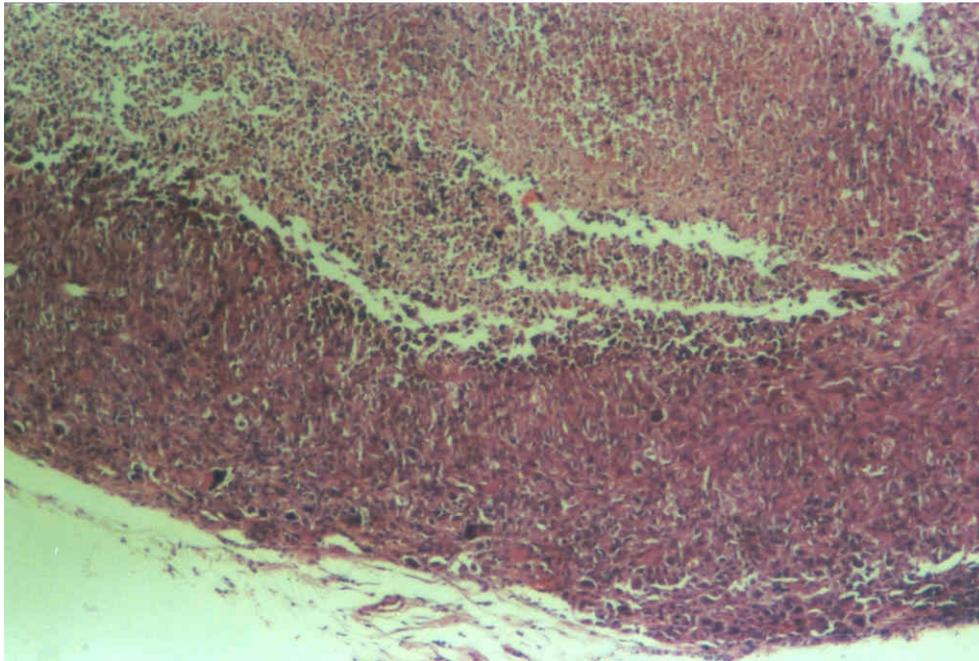
Histologisch ist die Bildung von mittelgroßen zentralen Nekroseherden nachzuvollziehen, wobei aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (einschließlich der Kontrolle) gefunden werden konnten. Das Zellbild variiert in den Grenzen, in denen es auch bei den Xenotransplantaten zu finden war. Es sind keine signifikanten histologischen Veränderungen betreffs Zell- und Kernformen, Wachstumsmuster, Riesenzellanteil, Grundsubstanzproduktion, Apoptosehäufigkeit, Zeichen von (De)Differenzierung und Malignitätsgrad nachweisbar, weder hinsichtlich des Vergleichs von behandelter zu nicht behandelter Gruppe, noch hinsichtlich der RD-Xenotransplantattumoren.

#### **4.5.3 Morphologische Charakterisierung: Intratumorale Injektion von mdm2-AS- und mdm2-SE-ODNs in US8/93-Xenotransplantattumoren**

In einem dritten Versuch wurde mit Xenotransplantaten der US8/93-Zelllinie gearbeitet. Verglichen wurden Tumorbehandlungen mit mdm2-SE-ODNs (Tier 1) vs. mdm2-AS-ODNs (Tier 2+3) vs. Kontrolle mit PBS (Tier 3, siehe Kap. 3.5).

Es ergaben sich keine messbaren Größenänderungen im Verlauf der Therapie. Im Unterschied zu den RD-Tumorexperimenten waren diese Tumoren deutlich kleiner (Tumor 1: 5x6x4 mm, Tumor 2: 8,5x8x6 mm, Tumor 3 (Tier 3, li): 8x5x3 mm, Tumor 4 (Tier 3, re): 6x8x5 mm).

Von der makroskopischen Beurteilung her fiel eine im Verlauf zunehmende, deutlich weiche Konsistenz der DNA-therapierten Tumoren auf. Hingegen war die Konsistenz des Kontrolltumors eher fest. In der histologischen Untersuchung bestätigen sich die ausgedehnten zentralen Nekrosen der mit ODNs behandelten Tumoren, ebenfalls kommt in den umgebenden Bereichen der Eindruck einer etwas größeren Häufigkeit von Apoptosefiguren auf. Andere lichtmikroskopisch nachweisbare Alterationen, vor allem in nekrosefernen Arealen, sind nicht zu finden. Es imponiert bei allen Tumoren ein storiformes bis faszikelartiges Wachstumsmuster, die Zellformen sind meist spindelförmig, vereinzelt kommen Areale mit Dominanz rundzelliger, größenvariabler polygonaler Elemente zur Darstellung. Riesenzellen sind spärlich eingestreut, Grundsubstanzproduktion und entzündliches Infiltrat fehlen. Generell betrachtet bietet sich das Bild eines polymorphzelligen Sarkoms. Die allgemeine Häufigkeit von Apoptosefiguren in den vitalen Bereichen des Tumors unterscheidet sich in den therapierten Tumoren sowie der Kontrolle nicht (Abb. 32).



**Abb. 32** Zentrale Nekrose 2 Tage nach der ersten mdm2-AS-Behandlung (Tier 2, x100)

Im Vergleich zu den in Kap. 4.2.2 beschriebenen Transplantattumoren finden sich ebenfalls, bis auf die deutlichen Nekrosen, keine signifikanten Abänderungen des Gewebsbildes. Dennoch lässt sich die Größe der Nekrosen, auch in Anbetracht der ansonsten geringen Nekrotisierungstendenz der US8/93-Xenotransplantate, nicht als unspezifischer Nebeneffekt abtun. Insofern kann durchaus von einer therapiespezifischen Wirkung, die allerdings nur die unmittelbar durch die Injektion erfassten zentralen Tumorareale betrifft, ausgegangen werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Phänotypisches Verhalten der Xenotransplantate

Die Klassifizierung der WTS erfolgt ohne Bezug auf ihre zelluläre Herkunft, sondern vor allem nach strukturellen und zytologischen Merkmalen und fußt auf dem Konzept der Ableitung von einer mesenchymalen Stammzelle (Katenkamp & Kosmehl, 1995). Hajdu (Hajdu, 1979) favorisierte erstmals dieses Konzept, welches durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen von Brooks (Brooks, 1986) bei geringer Modifizierung weitere Bestätigung fand.

Dabei wird von einer primitiven, pluripotenten, mesenchymalen Stammzelle als Ausgangspunkt der mesenchymalen Differenzierung ausgegangen. Aus dieser geht als eine mögliche Variante der „Fibrohistioblast“ hervor, welcher seinerseits Ursprungszelle für diverse Zellarten (z.B. Myofibroblast, Lipoblast etc.) ist, aus denen sich die endgültig differenzierten Zellformen (z.B. glatte Muskelzelle, Lipozyt etc.) herausbilden. Dieses Modell ist vielzitierte Erklärungsgrundlage einer Reihe von Beobachtungen in der Weichgewebssarkompathologie, so z.B. der Tatsache, dass die meisten „dedifferenzierten“ Areale, wie sie häufig nebeneinander mit „differenzierteren“ – und dann meist namensgebenden – Gewebsformationen im gleichen Tumor vorkommen, einen MFH-Phänotyp aufweisen. Gleichzeitig wird das MFH als der „final common pathway“ (Brooks, 1986) der WTS-Progression postuliert und seine Eigenschaft als eigene Tumorentität in Frage gestellt (Hashimoto *et al.*, 1990; Goren, 1991; Hollowood & Fletcher, 1995; Goren, 1991).

Ebenso passen Ergebnisse aus Untersuchungen mit über viele Generationen xenotransplantierten WTS gut in dieses Konzept (Katenkamp, 1988; Roholl *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Erste Versuche von Xenotransplantationen humaner Malignomzellen auf andere Säugetierspezies sind schon in den fünfziger und sechziger Jahren erfolgreich durchgeführt worden (Greene, 1952; Phillips & Gazet, 1967). Seit jedoch Nacktmäuse mit einem defizienten Thymus-vermittelten Immunsystem als Versuchstiere verfügbar sind, ist die Xenotransplantation zur gängigen Methode in der Tumorforschung avanciert (Rygaard & Povlsen, 1969; Giovanella *et al.*, 1974; Ueyama *et al.*, 1975; Fogh *et al.*, 1978). Erste Berichte über Xenotransplantationen von humanen WTS-Zellen auf Nacktmäuse stammen aus dem Anfang der siebziger Jahre (Takase *et al.*, 1971). Etwas später gelang es, Xenotransplantate von menschlichen Tumoren auf thymuslosen Ratten zu etablieren (Dawson *et al.*, 1982). Xenotransplantierte humane

Tumoren gelten als ein gut untersuchtes und weit verbreitetes *in-vivo*-Modell. So lassen sich Wirkungen und Nebenwirkungen von in der Tumorthapie angewendeten Chemotherapeutika und Immuntherapien, Bestrahlungseffekte und deren Folgen, Auswirkungen chirurgischer Eingriffe aber auch Tumor-Wirts-Wechselwirkungen sowie Invasions- und Metastasierungsverhalten gezielt studieren. Wesentlich im Umgang mit dem Nacktmausmodell ist jedoch, dass nicht alle experimentell gefundenen Zusammenhänge einfach auf humane Verhältnisse übertragbar sind. So sind im Vergleich zum Menschen andere Umgebungsmilieus inklusive der nicht vorhandenen T-Zell-vermittelten Immunität zu berücksichtigen. Es muss ein möglicherweise schnelleres Wachstum der Xenotransplantate im Mausmodell einkalkuliert werden (Sharkey & Fogh, 1984), was z.B. bei eventuellen Studien zur Chemotherapiesensitivität zu berücksichtigen ist. In Bezug auf die Transplantattumoren an sich stellt deren Stabilität im Phäno- als auch im Genotyp über viele Transplantationsserien hinweg eine wesentliche Voraussetzung für die Bewertung von Forschungsergebnissen dar, da nur so untereinander vergleichbare Resultate erzielt werden.

Betrachtet man diesbezüglich die Gruppe der WTS und WTS-Xenotransplantate näher, so sind in der Literatur sowohl eine Vielzahl an Arbeiten zu finden als auch eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Ergebnisse. Bis zum Ende der achtziger Jahre ist die allgemein vertretene Meinung die, dass, bis auf wenige Ausnahmen (Sharkey & Fogh, 1984), xenotransplantierte Tumoren unabhängig von ihrer Entität – WTS oder nicht – morphologisch über einen ausreichend langen Zeitraum stabil bleiben (Gershwin *et al.*, 1977; Kyriazis *et al.*, 1981; Povlsen *et al.*, 1982; Aamdal *et al.*, 1985; Garvin *et al.*, 1986; Budach *et al.*, 1986). Aber auch später tauchen noch Studien zur phänotypischen Stabilität xenotransplantierter humaner WTS auf (Sawada *et al.*, 1992). Unabhängig von der nachgewiesenen morphologischen Stabilität existierten jedoch schon Erkenntnisse zur genotypischen Instabilität von in längeren Serien transplantierten WTS-Xenotransplantattumoren (Ishii *et al.*, 1983). Für WTS war weiterhin nachgewiesen, dass die intraperitoneale Inokulation von Tumorzellen undifferenziertere Transplantattumoren produziert als die s.c.-Inokulation (Hajdu *et al.*, 1981). Vereinzelt wird in der Literatur über Änderungen im Differenzierungsmuster bei selbstetablierten Zelllinien von humanen WTS (Emoto *et al.*, 1992), ebenso aber auch von epithelialen Tumoren (Fleury-Feith *et al.*, 1995) berichtet. Kosmehl (Kosmehl *et al.*, 1989; Kosmehl *et al.*, 1990) konnte Varianten im histologischen Bild sowie Veränderungen im immunhistochemischen

Expressionsmuster an Methylcholantren-induzierten murinen Rhabdomyosarkomen nachweisen. Motoyama (Motoyama *et al.*, 1986) fand eine zunehmende Differenzierung an Xenotransplantaten einer *in vitro* undifferenzierten Rhabdomyosarkom-Zelllinie. Ähnliches berichtet auch Matsui (Matsui *et al.*, 1991), allerdings für die Xenotransplantate eines ursprünglich bovinen Rhabdomyosarkoms. Gezielte Versuche mit Langzeittransplantationen von WTS-Xenotransplantaten zeigten in der Folge teilweise erhebliche morphologische Unterschiede zwischen Primärtumor und Xenotransplantaten (Donhuijsen *et al.*, 1988), andere Autoren fanden vor allem ultrastrukturell nachweisbare Veränderungen des Tumorphänotyps im Verlauf ihrer Transplantationsserien (Roholl *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1997). In einer histologischen, immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchung (Schmidt *et al.*, 1996) konnten in fünf von acht Fällen Veränderungen des Tumorphänotyps zwischen Primärtumor und Xenotransplantaten in Form von Dedifferenzierung, d.h. Auftreten vielgestaltigerer Kernformen und Vorhandensein von deutlich mehr Mitosen im Xenotransplantat, festgestellt werden. Diese Beobachtung war nicht nur den „späten“ Transplantatgenerationen vorbehalten. Zwei von acht Fällen neigten zu einem eher differenzierteren Gewebsbild während nur einer von acht über lange Zeit morphologisch stabil blieb. Zusätzlich sind in den letzten Jahren Berichte in der Literatur aufgetaucht, wonach besonders bei Langzeitxenotransplantationen von menschlichen Tumoren immer wieder die Frage nach dem Ursprung der Tumorzellen in Xenotransplantaten, nämlich human oder murin, zu stellen ist (Pathak *et al.*, 1997; Krishan, 1998; Pathak *et al.*, 1998). Dieses Problem, das vor allem die seit längerer Zeit erhältlichen kommerziellen Zelllinien betrifft, veranlasste uns zu einer Chromosomenanalyse eines RD-Tumors. Sie zeigte die humane Herkunft des Tumors eindeutig auf (Daten hier nicht gezeigt).

In Zusammenschau aller dieser bekannten Fakten erscheint die Frage nach der Stabilität der transplantierten Tumoren, insbesondere bei den Xenotransplantaten der beiden selbstetablierten Zelllinien 45/92 und US8/93 gerechtfertigt. Dazu ist zu bemerken, dass der Beobachtungszeitraum erst drei Tumorgenerationen beträgt. Dies ist für eine abschließende Beurteilung des biologischen Verhaltens sicherlich zu wenig. Trotzdem kann eine vorläufige Analyse insofern gerechtfertigt werden, als dass die schon begonnenen und zukünftig geplanten Experimente in Zusammenhang mit den hier dargestellten Befunden eindeutiger interpretierbar sind. Zum anderen wird in der Literatur mehrfach darauf hingewiesen, dass die Ausbildung

von morphologischen Varianten häufig schon in frühen Transplantatgenerationen zu finden ist (Schmidt *et al.*, 1996). Demnach ist festzustellen:

Die Tumoren der US8/93-Zelllinie sind im Vergleich zum Primärtumor sowohl im Bezug auf das histologische Bild als auch auf den immunhistochemischen Befund keinen Variationen in der Größenordnung unterworfen, als dass sich daraus ein neuer Tumorphänotyp beschreiben ließe. Sie erscheinen über die beobachteten zwei Tumorgenerationen morphologisch stabil. Die im Primärtumor beschriebenen histologischen Merkmale lassen sich ebenso in den Transplantaten wiederfinden. Alle Varianten im histologischen Bild, zum Beispiel die Ausbildung von epitheloiden Formationen und Arealen mit storiformem Wachstumsmuster, sind auf kleine Bereiche im Tumor beschränkt. Immunhistochemisch gibt es keine Anzeichen für eine Veränderung des Expressionsmusters, es imponiert ein undifferenziertes Muster mit der alleinigen Vimentin-Expression im Primärtumor und den Xenotransplantaten. Die Elektronenmikroskopie zeigt ebenfalls keine neuen Differenzierungscharakteristika auf, es besteht konstant das Bild eines undifferenzierten mesenchymalen Tumors.

Ähnlich verhält es sich mit den Xenotransplantaten der 45/92-Zelllinie. Im Großen und Ganzen entsprachen auch diese Transplantate im histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Muster ihrem Primärtumor. Dennoch sind einige Veränderungen bemerkenswert. In der histologischen Untersuchung fällt eine als generell einzustufende Neigung zu einem undifferenzierteren Gewebsbild auf, die den gesamten Tumor betraf, und nicht als zweiter Phänotyp neben differenzierten Arealen zu beschreiben war (s.o.). Dafür sprechen die deutlich geringere Anzahl von Rhabdomyoblasten, das Nichtvorhandensein eosinophiler Zellen, das unstrukturierte Wachstumsmuster und das im Vergleich zum Primärtumor eintönigere Zellbild mit Dominanz von mittel- bis großzelligen Elementen (d'Amore *et al.*, 1994; Weiss & Goldblum, 2001). Ob die in Generation N2 und N3 zu findenden Nekrosen Ausdruck einer erhöhten Malignität sind, muss bezweifelt werden. Wahrscheinlicher ist, dass diese Tumoren aufgrund der enormen Wachstumsgeschwindigkeit am Ende in zentralen Bereichen nutritiv unterversorgt waren. In der Literatur stößt die Möglichkeit einer Dedifferenzierung von WTS-Xenotransplantaten im histologischen Bild auf Akzeptanz (Katenkamp, 1988; Kosmehl *et al.*, 1989).

Diese Tendenz zeigt sich auch in den immunhistochemischen Untersuchungen. Erklärungsbedarf besteht hinsichtlich der Tatsache, dass eine deutliche Myoglobin-

und Vimentinexpression einhergehend mit Desmin-Negativität im Primärtumor besteht, die Transplantate aber offensichtlich kein Myoglobin mehr produzieren, nun aber Desmin leicht positiv wird. Allgemein ist davon auszugehen, dass in der normalen Myogenese das Intermediärfilament Desmin (8 – 10 nm, MG 53000) zeitlich vor Myoglobin (MG 16900) exprimiert wird (Carter *et al.*, 1989). Ähnlich verhält es sich mit Vimentin in Bezug zu Desmin (Bennett *et al.*, 1979; Gard & Lazarides, 1980). Demnach wird in der voranschreitenden Differenzierung von Rhabdomyosarkomen, wobei letztendlich die normale Myogenese nachgespielt wird (Mierau & Favara, 1980), die Abfolge Desmin negativ, Desmin positiv und Myoglobin negativ, Desmin und Myoglobin positiv als „normal“ angesehen (Molenaar *et al.*, 1985; Carter *et al.*, 1989). Die Myoglobinexpression wird einerseits als Zeichen zunehmender Differenzierung bei Rhabdomyosarkomen bewertet (Corson & Pinkus, 1981; Kindblom *et al.*, 1982; Brooks, 1982; Tsokos *et al.*, 1983; Eusebi *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1986), währenddessen die alleinige Vimentin-Expression eher bei undifferenzierteren Tumoren gesehen wird (Molenaar *et al.*, 1985; Schmidt *et al.*, 1986; Gruchala *et al.*, 1997). Andererseits gilt Myoglobin in diagnostischer Hinsicht als sehr spezifisch für Rhabdomyosarkome (Corson & Pinkus, 1981; Brooks, 1982), obwohl die Wertigkeit infolge der Färbung von eher differenzierteren und damit auch diagnostisch klareren Fällen als gering eingestuft wird (Kodet, 1989; Ordóñez, 1998). Unter diesen Voraussetzungen würde die in den Xenotransplantaten zu findende Konstellation als Dedifferenzierung zu werten sein, die fehlende Desmin-Expression im Primärtumor wäre mit der Tatsache erklärt, dass der Immunhistochemie generell zellulär objektiv vorhandene Strukturen entgehen können. Deren elektronenmikroskopischer Nachweis, in der Literatur häufig als sensitivster Test angeführt (Fisher, 1990; Schmidt *et al.*, 1996), gelang in diesem Falle jedoch nicht. Auch diesbezüglich sind gegensätzliche Ansichten in verschiedenen Veröffentlichungen zu finden. Seidal (Seidal *et al.*, 1988) fand z.B. nur in drei von acht (37,5%) immunhistochemisch Desmin-positiven Rhabdomyosarkomen ultrastrukturell wegweisende Zellmerkmale (Nachweis von Intermediärfilamenten). Die These einer Tendenz zu Dedifferenzierung der 45/92-Xenotransplantate würde auf jeden Fall durch den histologischen Befund untermauert.

Vorausgesetzt, dass Myoglobin aus Skelettmuskeln von malignen Zellen aufgenommen werden kann (Eusebi *et al.*, 1984), könnte bei einer Falsch-Positivität von Myoglobin im Primärtumor eine Differenzierung, zumindest unter immunhistochemischen Gesichtspunkten (Desmin in den Transplantaten positiv),

stattgefunden haben. Diese Annahme ist jedoch aufgrund des lichtmikroskopischen Gewebsbildes nicht haltbar.

Andere Aspekte betreffen sicherlich Ungenauigkeiten in der Fixierungs- und Färbeprozedur, wobei hier von zufälligen Fehlern ausgegangen werden muss, so dass keine systematische Verfälschung der Ergebnisse denkbar ist. Die Fixierung in 4%iger neutraler Formalinlösung bringt zumindest für Myoglobin an Paraffinschnitten die vergleichbar besten Resultate (Kindblom *et al.*, 1982).

Zusammenfassend ist trotz aller beschriebenen geringfügigen Variationen keine vollständig vom Primärtumor aberrierende Konstellation in den Transplantaten der 45/92-Zelllinie zu finden. Es ist von einer hohen Stabilität der Tumoren auf der Nacktmaus auszugehen.

In Bezug auf die RD-Xenotransplantate lässt sich feststellen, dass über drei Transplantationsgenerationen hinweg keine gravierenden morphologischen Veränderungen fassbar sind. Alle Tumoren ähneln einander mit einigen schon beschriebenen Variationen, die Ausbildung neuer Differenzierungsmerkmale ist nicht zu beobachten. Die Immunhistochemie zeigt das Muster eines mesenchymalen Tumors mit muskelspezifischer Differenzierung, was durch die Herkunft aus einem embryonalen Rhabdomyosarkom hinreichend erklärt wird. Eine SMA-Expression – eigentlich diagnostisch wegweisend bei Leiomyosarkomen (Brooks, 1996; Ordóñez, 1998) – ist bei Rhabdomyosarkomen in der Literatur mit kontroversen Angaben belegt. So berichten Gaffney (Gaffney *et al.*, 1993) bei 6 von 8 (75%) und Roholl (Roholl *et al.*, 1990) bei 1 von 2 Rhabdomyosarkomen von einer SMA-Expression, Skalli (Skalli *et al.*, 1988) und Tallini (Tallini *et al.*, 1994) fanden es demgegenüber, wenn überhaupt, nur sehr selten. Ein Dilemma hinsichtlich der Wertung der immunhistochemischen Befunde ergibt sich daraus jedoch nicht. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergibt sich bei Konstanz der Befunde kein Hinweis auf Vorliegen eines Rhabdomyosarkoms, es sind keine diagnostisch wegweisenden Zellelemente zu finden. Eine Wertung muss ähnlich wie bei den 45/92-Xenotransplantaten erfolgen (s.o.). Es ist auch bei diesen Tumoren, zumindest in den ersten Generationen, von einer Stabilität im Phänotyp auszugehen.

Zusammenfassend lässt sich für alle drei untersuchten Xenotransplantatlinien eine Stabilität im phänotypischen Verhalten hinsichtlich des Vergleichs untereinander als auch gegenüber den Primärtumoren (US8/93, 45/92) feststellen. Dieses ist insofern von Bedeutung, als dass dadurch die generelle Eignung als Modell für weitere *in-vivo*-Untersuchungen bestätigt wird. Inwieweit spätere Transplantatgenerationen

dem beschriebenen Muster gleichen oder aber Veränderungen unterworfen sind, ist nicht endgültig zu klären. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht davon auszugehen, dass durch Veränderung des gesamten Tumorphänotyps oder aber Ausbildung von gravierenden morphologischen Varianten im Zuge der Weitertransplantation Ergebnisse von therapeutischen Versuchen maskiert oder vorgetäuscht werden. Eine spätere Analyse, z.B. nach 30 oder 40 Transplantationen könnte diesbezüglich interessant und aufschlussreich sein.

## **5.2 Genterapeutische Versuche**

### **5.2.1 p53 und mdm2 als Regulatoren des Zellzyklus**

Das Tumorsuppressorgen p53 und das Onkogen mdm2 interagieren in vielfältiger Weise miteinander, wodurch grundlegende Prozesse der Zellzykluskontrolle reguliert werden, die in vielen menschlichen Tumoren, darunter auch die WTS, außer Kontrolle geraten sind. Im Folgenden soll ein kurzer Abriss ihrer Eigenschaften und Funktionsweisen gegeben werden.

p53 ist ein auf dem Chromosom 17p13 lokalisiertes Tumorsuppressorgen, das für ein 53-kDa-Phosphoprotein kodiert. Dieses Protein ist in die Kontrolle von Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und DNA-Reparatur involviert (Harris, 1996). Im Allgemeinen reagieren Zellen auf genotoxischen Stress mit einer Aktivierung von p53. Die Funktion von p53 erfolgt vor allem über die transkriptionelle Aktivierung oder Hemmung der entsprechenden Gene. So ermöglicht ein Zellzyklusstop in der G1-Phase die Reparatur von DNA-Schäden, bevor diese in der S-Phase fixiert werden können. Eine weitere Möglichkeit besteht in der p53-vermittelten Apoptoseinduktion, wobei je nach Zelltyp eine der beiden Möglichkeiten eingeschlagen wird (Lowe *et al.*, 1993). P53 ist außerdem in der Lage, in vielfältiger Weise mit anderen Proteinen (Onkogenprodukte, tumorassoziierte zelluläre und virale Proteine) in Wechselwirkung zu treten und so in biologische Regelkreise einzugreifen (Mukhopadhyay *et al.*, 1995). Eine Inaktivierung von P53 kann funktionell durch Bindung an Onkogen-Produkte oder durch Mutationen im p53-Gen verursacht werden, wobei das mtp53-Protein selbst onkogene Eigenschaften erlangen kann. p53-Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen im menschlichen Erbgut überhaupt. Sie werden in >50% aller menschlichen Tumoren gefunden (Hollstein *et al.*, 1991). Der Verlust der p53-Aktivität führt zu genomischer Instabilität, Resistenz gegenüber antikanzerogenen

Substanzen und zur *functio laesa* wichtiger Kontrollmechanismen im Zellzyklus, was wiederum eine tumorpromovierende Wirkung nach sich zieht. Die Frequenz und das Muster von p53-Mutationen sind in WTS nicht grundlegend anders verteilt als bei anderen Tumorentitäten (Taubert *et al.*, 1998).

Als ein molekularer „Gegenspieler“ von p53 in der Beeinflussung des Zellzyklus ist das 90-kDa-Genprodukt des mdm2-Onkogens identifiziert worden. Spezifische Komplexe mit P53 bildend wirkt es als feedback-Inhibitor, indem es durch eine p53-Aktivierung hochreguliert wird (Wu *et al.*, 1993). Die physiologische Funktion von mdm2 liegt in einer Kontrolle der p53-abhängigen Zellzykluswege, die in der normalen Zelle auf einer fein abgestimmten Balance der jeweiligen Aktivitäten basiert. Mdm2-Überexpression führt zu einem Absinken des P53-Spiegels, umgekehrt wird bei einer p53-Überexpression die mdm2-Aktivität hochreguliert. Mdm2 wirkt als negativer Regulator einer p53-vermittelten Apoptose (Kondo *et al.*, 1995). Die sich bildenden MDM2-P53-Komplexe erfahren eine rasche proteosomale Degradation (Kubbutat *et al.*, 1997). Die Bedeutung von mdm2 im Prozess der Tumorentwicklung wird ähnlich hoch wie die von p53 eingeschätzt, wobei Sarkome zu den ersten Tumoren gehören, für die eine Überexpression für mdm2 beschrieben wurde (Leach *et al.*, 1993; Flørenes *et al.*, 1994).

### 5.2.2 Grundlagen der Lipid-vermittelten Transfektion *in vivo*

Eine erfolgreiche liposomale Transfektion von Tumorzellen im *in-vivo*-Modell ist einer Vielzahl von möglichen Einflussfaktoren unterworfen. Die Stabilität, Pharmakokinetik und Distribution der Lipid-DNA-Komplexe wird zum einen wesentlich vom gewählten Applikationsweg und dem umgebenden Milieu (Blut, Lymphe) bestimmt. Zum anderen spielen eine erhebliche Zahl molekularer und zellulärer Schranken im Prozess der Aufnahme, des intrazellulären Transportes und letztendlich der erfolgreichen Fremdgenexpression eine Rolle. Scheule (Scheule & Cheng, 1996) schlug folgendes hypothetisches Modell zum Transfer und zur Proteinexpression eines Fremdgens nach Lipofektion vor:

Nach Formierung eines Lipid-DNA-Komplexes muss dieser zur Zielzelle gelangen (per Diffusion oder Verteilung im Gefäßsystem) und an ihr adhären können. Die Komplexe müssen die Zellmembran passieren (z.B. durch Endozytose (Zabner *et al.*, 1995)) und der lysosomalen Degradation im Endosom entgehen (Coonrod *et al.*,

1997). Die Freisetzung aus den Endosomen und gleichzeitige Dekomplexierung der DNA erfolgt wahrscheinlich über einen Flip-Flop-Mechanismus anionischer Lipide der äußeren Endosomen-Membran (Xu & Szoka, 1996). Nach Freisetzung in das Zytoplasma kommt es zum aktiven Transport in den Kern via Kernporen, der bisher nicht vollständig verstanden ist. Letztendlich gelangt nur ein Bruchteil der im Zytoplasma befindlichen Plasmide in dekondensiertem und undegradiertem Zustand in das Kerninnere, wo die ektopische Expression erfolgen kann. Erschwerend hinzu kommt, dass Fremd-DNA im Kern zellspezifisch erkannt und abgebaut wird.

Meye (Meye, 2001) konnte für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zelllinien zeigen, dass ein drei- bis vierfacher Überschuss an kationischen Lipiden (Gewichtsverhältnis Lipid : DNA) erforderlich ist, um Plasmid-DNA vollständig zu komplexieren und ausreichend gegen enzymatische Verdauungsvorgänge zu schützen. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung, nämlich die Unversehrtheit der DNA-Konstrukte bis zur Aufnahme durch die Zielzelle, erfüllt. Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Lipidtoxizität (je mehr Lipid, desto besser die Transfektionsraten, je höher jedoch auch die Zytotoxizität) für WTS-Zellen ähnlich hoch wie für andere Tumorzellen (Karzinomzelllinien) war.

### **5.2.3 Oligodesoxynukleotide (ODNs) und wtp53-Plasmide**

AS-DNA heißt eine Sequenz, die zu einer Target-Sequenz (SE) auf RNA-Ebene komplementär ist. Die Hybridisierung dieser AS-DNA mit ihrer Ziel-mRNA führt zur Inaktivierung der RNA, was als sequenzspezifischer AS-Effekt betrachtet wird. Darüber hinaus geht man heute davon aus, dass viele AS-ODNs mit antitumorigenen Eigenschaften über sequenzspezifische non-AS-Mechanismen wirken. Deswegen werden zur Absicherung der spezifischen AS-Wirkungen verschiedene Kontrollen mit SE-ODNs empfohlen (Weiss, 1997). Bei den sogenannten non-AS-Mechanismen ist zwischen spezifischen und unspezifischen Wirkungen zu unterscheiden. Nach Neckers (Neckers & Iyer, 1997) können die folgenden spezifischen Hemmeffekte postuliert werden:

Transkriptionshemmung durch Interaktion mit ss/dsDNA, Translationsarrest (Blockierung der RNA, Bindung am Initiationscodon), Aktivierung der RNase H, Inhibierung des Splicings, 5'-capping und Inhibierung der 3'-Polyadenylierung.

Unspezifische, aber nicht unerwünschte Wirkungen betreffen z.B. die antiproliferative Wirkung bestimmter Sequenzen und die Stimulation des Immunsystems.

Die Gesamtheit der o.g. Effekte eröffnet die Einsatzmöglichkeit von ODNs in der Tumorthherapie in Form des Versuches, aktivierte Onkogene zu supprimieren und eine Restaurierung der normalen Wachstumskontrolle und Differenzierung in Tumorzellen zu erreichen.

Wie schon angedeutet, ist die ausreichende Konzentration und Speicherung von AS-ODNs am Zielort (Zytoplasma bzw. Zellkern) eine *conditio sine qua non*. Bei *in-vitro*-Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Aufnahme von ODNs in Zellen über Rezeptor-gesteuerte adsorptive Endozytose vermittelt wird (Vlassov *et al.*, 1994; Agrawal, 1996). Die ODNs binden nach Freisetzung aus den Endosomen und Dekomplexierung intrazellulär an zytoplasmatische und nukleäre Intermediärfilamente (IF) (Hartig *et al.*, 1997). Dabei zeigen ODNs ohne Phosphothioatbindungen sowohl zu zytoplasmatischen IF als auch zu intrazellulären Membranstrukturen eine geringere Affinität als Phosphothioat-ODNs. Art und Gehalt an IF bestimmen die Bindungskapazität von ODNs in der Zelle. So besitzen Zytokeratin-IF von Karzinomzellen eine höhere Bindungskapazität als z.B. die Vimentin-IF in mesenchymalen Zellen (Gao *et al.*, 1993). Der intrazelluläre Transport erfolgt zunächst passiv entlang dem IF-Skelett in Kernrichtung, der weitere Transport nach Erreichen von Mikrotubuli bzw. –filamenten erfolgt aktiv (Hartig *et al.*, 1997). Die Assoziation des Zytoskeletts mit Polyribosomen sollte zur Optimierung von sequenzspezifischen AS-Effekten beitragen, da die an IF gebundenen ODNs ihre Ziel-RNA besser binden können.

Das hier verwendete, als Kondo-AS bezeichnete 20-bp lange ODN besitzt eine zum Initiationscodon der mdm2-cDNA komplementäre Sequenz (Oliner *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1995). Dieses ODN bewirkte in verschiedenen Studien an Tumorzellen mit einer nachgewiesenen mdm2-Überexpression zellspezifische antiproliferative Effekte (Kondo *et al.*, 1995; Teoh *et al.*, 1997; Meye *et al.*, 2000). Als Wirkmechanismen werden von Chen (Chen *et al.*, 1998), der Untersuchungen mit einem weiteren mdm2-AS-ODN vornahm, unter anderem postuliert:

- Spezifische Inhibition der durch Amplifikation oder Autoaktivierung von p53 bedingten mdm2-Expression
- Reduktion des MDM2-steady-state-Spiegels und der MDM2-P53-Komplexe und damit Stimulation von p53
- Stimulierung von p53-vermittelten Effekten nach DNA-Schädigung

- Nichtmaligne Zellen sollen hingegen toleranter auf eine temporäre mdm2-Inhibition reagieren – dies entspräche einer indirekten Spezifität der Therapie für maligne Zellen

Eine weitere wichtige Strategie in der Gentherapie von Tumoren stellt die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) in Zellen mit defizienter TSG-Aktivität dar, im Speziellen die Restaurierung von wtp53-Aktivität in Zellen mit Defekten dieses Gens. Die zu erwartenden Effekte bei WTS können Roth (Roth & Cristiano, 1997) zufolge auf eine direkte Apoptoseinduktion, sog. Bystander-Effekte und eine Tumorzell-Dormancy zurückgeführt werden. Eine Unterdrückung der Progression von prämaligen Zellen, wie ebenfalls angeführt, hat für WTS keine praktische Relevanz, da nur in den seltensten Fällen Vorläuferzellen existieren (Weiss & Goldblum, 2001).

Zusammenfassend ergeben sich hinsichtlich der erfolgreichen WTS-Therapie mittels liposomal komplexierten wtp53-Plasmiden und mdm2-AS-ODNs folgende Hauptprobleme:

Zum einen muss ein reproduzierbar hoher Anteil an Tumorzellen erfolgreich transfiziert werden. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien konnte dies in der Zellkultur gezeigt werden (Meye *et al.*, 2000). Wie zu erwarten, waren jedoch die Aufnahmeraten von FITC-markierten ODNs nach Injektion in die Transplantattumoren mit 10 – 40% deutlich geringer. Dazu kommt, dass Veränderungen von Fluoreszenz-Eigenschaften der Einzelzelle auch durch unspezifische Assoziation der FITC-ODNs an Zellmembranen bzw. schon geschädigten Tumorzellen verursacht werden können, d.h., dass die erreichten 10 – 40% aller Wahrscheinlichkeit nach als falsch zu hoch einzuschätzen sind. Das Ausmaß des erwünschten Therapieeffektes – der selektiven Zerstörung von Tumorzellen mit defizienter wtp53-Aktivität – hängt weiterhin entscheidend von der Dauer der Fremdgenexpression ab. Dabei könnte eine relativ kurze Zeit der Expression zur Induktion eines lokal begrenzten Tumorzelluntergangs durchaus ausreichend sein, da Bystander-Effekte die Wirkung der Fremdgenexpression, vor allem *in vivo*, bei weitem übertreffen können (Liebermann *et al.*, 1995). *In-vivo*-Studien zum liposomalen wtp53-Transfer konnten hoffnungsvolle Ergebnisse nachweisen. So fand Xu (Xu *et al.*, 1997) eine signifikante Wachstumshemmung an Mammakarzinomxenotransplantaten bei einer Transfektionsrate von <5% nach parenteraler Verabreichung von liposomalem wtp53. Lesoon-Wood (Lesoon-Wood *et al.*, 1995) erreichte eine mehr als 60%ige Größenreduktion im Vergleich zum

Ausgangstumorvolumen von mit liposomalem wtp53 behandelten Xenotransplantaten einer Mammakarzinom-Zelllinie. Darüber hinaus konnte die Häufigkeit und Größe von Metastasen signifikant verringert werden. Ebenso berichten auch andere Autoren über signifikante *in-vivo*-Therapieerfolge nach p53-Lipofektion (Pollock *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2000) bzw. AS-ODN-Behandlung (Agrawal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

#### 5.2.4 Eigene Ergebnisse und Wertung

Wie schon in Kap. 4.5.1 angedeutet, erwies sich die Applikation der therapeutischen DNA-Konstrukte *in vivo* als schwierig. Die getesteten Möglichkeiten umfassten vor allem die, zwar in Varianten ausgeführten, dennoch vom Prinzip her konstanten Injektionen mit einer Nadelkanüle in das Zentrum des Tumors. Dabei waren die verwendeten Kanülengrößen ( $\varnothing$  0,4 – 0,8 mm) und Injektionsvolumina (200  $\mu$ l) den Größenverhältnissen der zu therapierenden Tumoren ( $\varnothing$  1,5 – 2 cm) angepasst. Modifizierungen im Ablauf wurden z.B. dadurch erreicht, dass nicht das gesamte Volumen auf einmal injiziert wurde, sondern durch Zurückziehen und nochmaliges Vorschieben in einen anderen Tumorbereich versucht wurde, eine homogenere Verteilung der Injektionslösung im Tumor zu erreichen. Diese Methode wurde später durch multiple Mikroinjektionen (10 – 20  $\mu$ l) mittels Insulin-Pen verfeinert (siehe Kap. 3.5). Der erste kritische Punkt liegt in der Art der Applikation, der Injektion begründet. Es erscheint durchaus plausibel, dass allein schon durch den Vorgang des Einstechens in zentrale und damit häufig hypoxische Areale des Tumors Störungen im Zellverband eintreten können, die sich später nur ungenau von den erhofften spezifischen Therapieeffekten unterscheiden lassen. Eine weitere Limitierung der Methode ist in einer nicht auszuschließenden Stichkanalmetastasierung zu sehen, was die zumindest hypothetische Übertragbarkeit auf humane Verhältnisse zusätzlich begrenzt. Des Weiteren muss bemerkt werden, dass der Ansatz im Hinblick auf die zu erwartende Penetrationstiefe von ungefähr 20 Zellschichten (Hsiao *et al.*, 1997) von vornherein keine vollständig homogene Verteilung der Lipoplexe im gesamten Tumor und damit ein Einwirken auf jede Tumorzelle zulässt. Die bisherigen Ergebnisse nehmen sich gegenüber denen an Zellkulturen (Meye *et al.*, 2000) erwartungsgemäß gering aus:

In die Transfektionsexperimente wurden Xenotransplantattumoren der RD- und der US8/93-Zelllinie einbezogen. RD-Zellen weisen bezüglich des p53-Gens eine mit einem Heterozygotieverlust gekoppelte missense-Mutation im Codon 248 auf (Felix *et al.*, 1992). Die konsekutiv gesteigerte Expression von mtp53 resultiert in einer mdm2-Überexpression in der Zellkultur (Meye, 2001). US8/93-Zellen weisen demgegenüber eine nonsense-Mutation im Codon 91 des p53-Gens auf (Taubert *et al.*, 1997). Einhergehend mit mdm2-Überexpression konnten in der Zellkultur geringe Mengen an wtp53-Protein nachgewiesen werden (Meye, 2001).

Als Haupteffekt nach der Therapie von RD-Xenotransplantattumoren mit liposomal komplexierten mdm2-AS-ODNs und wtp53-Plasmiden lässt sich die Induktion einer deutlichen Nekrose nachweisen. Die Nekrose erscheint makroskopisch im Vergleich zur Kontrolle (Injektion nur LFA) sehr viel größer und die histologische Untersuchung bestätigt diesen Eindruck. Zusätzlich scheint es, dass in den therapierten Tumoren mehr Zellen apoptotisch sind. Auf genaue Auszählungen wurde aber wegen der abzusehenden Insignifikanz der Ergebnisse verzichtet. Die Nekroseinduktion ist jedoch kritisch zu werten, da die Erfahrung zeigte, dass RD-Tumoren *per se* zu zentraler Nekrosebildung neigen. Eine Weiterführung der Experimente mit kleineren Tumordurchmessern könnte diesbezüglich zu höherer Sicherheit über die Spezifität der beobachteten Effekte führen.

In einem weiteren Experiment an RD-Xenotransplantattumoren wurde durch multiple Mikroinjektionen mittels Insulin-Pen eine homogenere Verteilung der Lipoplexe im Tumor angestrebt. Therapiert wurde wiederum mit mdm2-AS-ODNs und wtp53-Plasmiden. Es konnten aber keine morphologischen Äquivalente eines signifikanten Therapieerfolges gefunden werden.

Ein Therapieversuch an Transplantaten der US8/93-Zelllinie umfasste die intratumorale Applikation von mdm2-AS- und mdm2-SE-ODNs. In diesem Experiment konnte wiederum eine deutliche Nekrosebildung in zentralen Bereichen des Tumors gesichert werden, die im Vergleich zum Kontrolltumor deutlich größer erschien. Kritisch muss bemerkt werden, dass jedoch keine Unterschiede zwischen der SE- und der AS-Behandlung zu machen waren. Bezüglich der Malignitätsparameter von WTS wie Mitosen- und Apoptosenhäufigkeit, Zelldichte und -größe (Weiss & Goldblum, 2001) konnten keine entscheidenden Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus waren auch keine andersartigen histologischen Charakteristika (Wachstumsmuster, Polymorphie der Zell- und Kernformen, Differenzierungszeichen) auszumachen, die im Vergleich der therapierten Tumoren

zum nicht therapierten Tumor, als auch im Vergleich zu den Xenotransplantaten der US8/93 deutlichen Veränderungen unterworfen gewesen wären. Die Wertung der Nekrosen als solche erscheint bei den US8/93-Xenotransplantaten einfacher, da die Tumoren 1. deutlich geringere Durchmesser aufwiesen und 2. die US8/93-Tumoren als Xenotransplantate mit sehr fester Konsistenz ohne Nekrotisierungstendenz wuchsen. Insofern ist die Ansicht haltbar, dass es sich hierbei um einen Effekt der Therapie gehandelt hat.

Vergegenwärtigt man sich die zu erwartenden Effekte einer Therapie mit wtp53 bzw. mdm2-AS-ODNs, dann hätte mit einer Apoptoseinduktion oder Wachstumsinhibierung, zumindest in den transfizierten (durch Auslösung von Bystander-Effekten in mehr als nur den transfizierten) Zellen gerechnet werden können. Im Gegensatz dazu steht als einzig nachweisbarer Effekt die Induktion von Nekrosen im Bereich der Injektionsstellen. Unterschiede in der Apoptosehäufigkeit zwischen behandelten und nicht behandelten Tumoren waren nicht auszumachen. Bei abzusehender Insignifikanz einer statistischen Auswertung wurde auf diese verzichtet. Die Apoptoseinduktion nach Restaurierung von wtp53-Aktivität durch Transfektion wtp53-defizienter Tumorzellen mittels verschiedener Vektorsysteme ist unschwer verständlich und in der Literatur vielfältig belegt (Liebermann *et al.*, 1995; Harris, 1996; Nielsen *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1998; Swisher *et al.*, 1999). Demgegenüber ist ein Zusammenhang zwischen p53-Aktivität und Nekroseinduktion nicht ohne weiteres zu erklären. Die Nekrose, als Gewebsuntergang infolge exogener oder endogener Noxen mit begleitender Entzündungsreaktion einhergehend, ist formalpathogenetisch von der Apoptose, dem selektiven, programmierten Untergang einzelner Zellen, abzugrenzen (Riede & Schaefer, 1995). Die Induktion von Apoptose innerhalb sämtlicher Zellen eines bestimmten Gewebsbezirkes, in diesem Falle der durch die Injektion erreichten Tumorzellen, kann natürlich in das Bild des Unterganges eines gesamten Zellverbandes münden, was letztendlich dem histologischen Bild einer zentralen Nekrose entspräche (Trump *et al.*, 1997). Zusätzlich ist aber auch eine direkte p53-bedingte Nekroseinduktion vorstellbar (z.B. durch Bystander-Effekte). In einigen Studien ist die Ausbildung von Nekrosen nach Behandlung mit wtp53 als spezifischer Effekt belegt. So konnten in Lymphom-Xenotransplantaten deutlich mehr Apoptosen und Nekrosen nach Transfektion mit wtp53 über einen adenoviralen Vektor als in den Kontrollen nachgewiesen werden (Turturro *et al.*, 2000). Ebenso konnten auch nach lipidvermitteltem p53-Genstransfer Nekrosen in den behandelten Tumoren

nachgewiesen werden (Hsiao *et al.*, 1997). Unabhängig davon wies Virkajarvi (Virkajarvi *et al.*, 1997) eine deutliche Assoziation von p53-Überexpression und Nekrosebildung in Pankreaskarzinomen nach. Es ist also letztendlich plausibel, auch die Nekroseinduktion als Therapieeffekt zu werten, wobei aber gerade bei den RD-Tumoren aufgrund der o.g. Eigenschaften Zurückhaltung geboten ist.

Die Restaurierung von wtp53-Aktivität kann neben einer Apoptoseinduktion in einen Wachstumsarrest von Zellen in der G1-Phase münden (Harris, 1996). Differenzierte Zellen zeigen eine verlängerte G1-Phase und eine Unterdrückung des G1-S-Überganges im Zellzyklus (Liebermann *et al.*, 1995). Nach der Induktion von Differenzierung (z.B. Behandlung von Lymphomzellen mit Phorbol ester) konnte unter anderem eine G1-Arretierung nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1989; Pardee, 1989). Darüber hinaus wurde an M1-Zellen (siehe FAB-Klassifikation der AML) nach Behandlung mit Zytokinen zunächst Wachstumsarrest in der G1-Phase, Differenzierung und zuletzt Apoptose nachgewiesen (Selvakumaran *et al.*, 1994). Wachstumsarrest, Zelldifferenzierung und Apoptose sind sämtlich als Möglichkeiten der negativen Wachstumskontrolle zu sehen (Liebermann *et al.*, 1995). Somit liegt die Möglichkeit einer Differenzierung von Zellen nach erfolgreicher p53- bzw. mdm2-AS-Transfektion durchaus im Bereich des Möglichen. Für WTS wurde eine Induktion von Differenzierung („Auftauchen“ von vielen Rhabdomyoblasten sowie Zellen mit Querstreifung) nach neoadjuvanter Polychemotherapie gesehen (d'Amore *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur bislang vertretenen Meinung schlussfolgerten die Autoren, dass die Ursache dieser Differenzierung in der Aufhebung eines „Blocks“ der normalen Myogenese (die untersuchten Tumoren waren Rhabdomyosarkome) liegt, und nicht wie von Molenaar (Molenaar *et al.*, 1984) vertreten, in der selektiven Zerstörung von undifferenzierten Zellen und damit konsekutiver Dominanz eines differenzierteren Zellbildes.

In diesem Sinne ist eine Veränderung des Gewebsbildes auch für die hier untersuchten Tumoren vorstellbar. Es wäre also lohnend, gezielt nach Veränderungen in Form von Größenzunahme der Zellen, Ausbildung spezifischer Wachstumsformationen, Abnahme von Mitosenzahl und Anaplasie sowie speziell bei Rhabdomyosarkomen nach Eosinophilie, Rhabdomyoblasten und Querstreifung (Weiss & Goldblum, 2001) in den therapierten Tumoren zu suchen. Diese Suche muss jedoch in allen Tumoren als vergeblich bezeichnet werden. Mit dem Versuch, durch mehrere Injektionen mittels Insulin-Pen Homogenität in der Verteilung zu erreichen, konnte ebenfalls kein sichtbarer Erfolg erzielt werden.

Den Stand der Literatur betrachtend muss konstatiert werden, dass zur praktischen Anwendbarkeit der sich aus dem Zusammenhang zwischen p53-Defizienz und Tumorentstehung ergebenden Therapieoption einer wtp53- bzw. mdm2-AS-ODN-Transfektion für die spezielle Untergruppe der WTS bislang wenig bekannt ist. Für andere Tumorgruppen konnten demgegenüber schon vor einigen Jahren erste Teilerfolge berichtet werden (Lesoon-Wood *et al.*, 1995).

Hsiao (Hsiao *et al.*, 1997) erreichte eine signifikante Lebenszeitverlängerung nach liposomaler p53-Transfektion bei Mäusen mit intraperitoneal wachsenden Glioblastomen. Für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) sind Erfolge im Rahmen einer Phase-I-Studie veröffentlicht (Swisher *et al.*, 1999), allerdings unter Verwendung eines adenoviralen Vektorsystems.

Erste Ergebnisse deuten auch bei WTS auf die prinzipielle Übertragbarkeit des theoretischen Modells der p53-Restaurierung *in vivo* hin (Pollock *et al.*, 1998; Densmore *et al.*, 2001). Mit einem adenoviralen Vektorsystem konnten bis zu 60% Größenreduktion bei Leiomyosarkom-Xenotransplantaten erreicht werden (Milas *et al.*, 2000) und Zhan (Zhan *et al.*, 2001) wies eine Erhöhung der Sensitivität von WTS gegenüber Doxorubicin nach p53-Transfektion nach.

Für die therapeutische Beeinflussbarkeit von Tumorwachstum durch mdm2-AS-ODNs gibt es erst wenige Ergebnisse. Erste Erfolge bei der Anwendung von mdm2-AS-ODNs *in vivo* wurden von Tortora und Zhang (Zhang *et al.*, 1999; Tortora *et al.*, 1999) veröffentlicht. So konnte in Abhängigkeit von der mdm2-AS-Dosis eine signifikante Größenreduktion (>50%) von Xenotransplantattumoren erreicht werden (Tortora *et al.*, 1999). Der Ansatz einer mdm2-AS-Therapie erfuhr in der Folge zunehmend Beachtung und eine kontinuierliche Weiterentwicklung (Wang *et al.*, 1999a, Wang *et al.*, 1999b). Für das Kolonkarzinom konnte Tortora (Tortora *et al.*, 2000) und für das Mammakarzinom Wang (Wang *et al.*, 2001) eine Wachstumsretardierung sowie Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika nachweisen. Für WTS hingegen fehlen bisher aussagekräftige *in-vivo*-Studien. Für die in dieser Arbeit näher untersuchte 8/93-Zelllinie zeigten sich Erfolge nach Transfektion in der Zellkultur (Meye *et al.*, 2000; Grünbaum *et al.*, 2001).

Vergleicht man die bisher publizierten Ergebnisse mit unseren, so muss festgestellt werden, dass die Erwartungen an die Therapien bisher nicht erfüllt werden konnten. Das liegt zum einen sicherlich daran, dass, um relevante Zusammenhänge auch statistisch zu sichern, sehr viel größere Fallzahlen untersucht werden müssen.

Andererseits ist aber gerade zu mdm2-AS-Therapien bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine *in-vivo*-Studie an WTS publiziert. Nur unwesentlich weiter fortgeschritten erscheint der Stand bezüglich der p53-Transfektionsexperimente. Sämtliche Arbeiten sind als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen verwertbar, indem sie den Schluss eines generellen Erfolgversprechens nahe legen. In diesem Rahmen sind auch die Ergebnisse unserer Transfektionsexperimente zu werten. Sie besitzen in erster Linie orientierenden Charakter im Hinblick auf weitere *in-vivo*-Studien an WTS. Wenn auch bisher nicht in dem erhofften Umfang eingetreten, ist ein Erfolg weiterer *in-vivo*-Experimente mit den untersuchten Zelllinien und auch anderen WTS vorstellbar. Ermutigend stimmen in diesem Zusammenhang erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von Versuchen mit intrakavitärer mdm2-AS-ODN-Applikation über eine kontinuierliche Dauerinfusion, woraufhin eine signifikante Verminderung der Tumormasse nachgewiesen wurde (Würl *et al.*, Manuskript eingereicht). Angesichts dieser Ergebnisse wird ein aus meiner Sicht generelles Problem der hier geschilderten Versuche deutlich: Durch Injektionen in einen Tumor lassen sich wahrscheinlich keine ausreichend konstanten Wirkspiegel liposomal komplexierter DNA an den Tumor bringen. Fußend auf der Tatsache, dass die Eindringtiefe von auf die Oberfläche aufgetragenen Lipid-DNA-Komplexen ca. 20 Zellschichten beträgt (Hsiao *et al.*, 1997), ist nach Injektion ein Effekt durch direkte Transfektion nur in einem Bruchteil der Tumorzellen zu erwarten. Bystander-Effekte könnten jedoch nicht unerheblich zu deutlich größeren Auswirkungen beitragen (Liebermann *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997). Über erfolgreiche *in-vivo*-Therapien mit intratumoraler Injektion gibt es zumindest vielfältige Veröffentlichungen (Akpoyiye & Hersh, 1999; Yerushalmi *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2001). Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint auch die Forderung nach möglichst kleinen Tumoren, damit 1. die Wahrscheinlichkeit einer spontanen intratumoralen Nekrosebildung so gering wie möglich gehalten wird und 2. der mindestens notwendige Diffusionsweg der Lipid-DNA-Komplexe sinkt. Der Übergang auf ein modifiziertes Tumormodell in Form des intraperitonealen Wachstums erscheint auch unter dem Aspekt sinnvoll, als dass durch wiederholte respektive kontinuierliche Applikation, wie sie intrakavitär leicht durch Implantation von Pumpensystemen machbar ist, nach Untergang oberflächlicher Gewebsschichten wieder neue Zellverbände erreicht werden können (Hsiao *et al.*, 1997; Namiki *et al.*, 1998). Zusätzlich wären, wie schon angeführt, keine iatrogenen Störungen durch intratumorale Manipulationen und konsekutive Fehlinterpretationen des Gewebsbildes zu befürchten.

### 5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In Bezug auf das im ersten Teil der Arbeit untersuchte phänotypische Verhalten und die daraus geschlussfolgerte Stabilität der Xenotransplantate sollten im weiteren Verlauf Anschlussuntersuchungen mit ausführlicher histologischer Charakterisierung späterer Transplantatgenerationen und dem Vergleich zu den hier beschriebenen Tumoren erfolgen. Nur so ist die Grundlage einer konstant bestehenden Vergleichbarkeit weiterer Ergebnisse aus den folgenden Therapiestudien gewährleistet. Interessant in diesem Zusammenhang könnten eventuelle Ausbildungen neuer Differenzierungsmerkmale, ihr Bezug zu den jeweiligen Therapieprotokollen sowie deren Aussagewert bezüglich der WTS-Pathogenese sein.

Betreffend die Anwendung des liposomalen Gentransfers bei WTS-Xenotransplantaten lassen sich folgende Schlüsse für die Zukunft ziehen:

Die Tumorumfänge sollten aus o.g. Gründen so klein wie möglich gehalten werden. Weiterhin sind größere Fallzahlen zur Absicherung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse erforderlich. Die orientierende Überprüfung einer qualitativen Wirksamkeit der Liposom-DNA-Komplexe ist über intratumorale Injektion wahrscheinlich in ausreichendem Maß praktikabel. Quantitative Vergleichsuntersuchungen sind jedoch besser mit anderen Tumormodellen zu bewerkstelligen. Erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit intraperitoneal wachsenden RD-Xenotransplantaten scheinen denn auch diese These zu untermauern (Würl *et al.*, Manuskript eingereicht), wobei sowohl die geforderte Größenreduktion der Tumoren (disseminiert intraperitoneal wachsend) als auch eine kontinuierliche Applikation der therapeutischen DNA-Konstrukte gewährleistet ist. Als ebenfalls Erfolg versprechend ist die Applikation in Form einer isolierten Extremitätenperfusion bei entsprechend lokalisierten Tumoren einzuschätzen. So konnte Milas (Milas *et al.*, 1997) die Effizienz der Methode mit einem adenoviralen Vektor an Ratten mit Sarkomen der Extremitäten nachweisen. Der Vorteil der Vorgehensweise ist offensichtlich – mit sehr geringen systemischen Nebenwirkungen kann eine ansonsten letale Dosis der Droge an den Tumor gebracht werden, ohne darüber hinaus mit Nadeln Störungen im Gewebsverband zu verursachen. Eine Charakterisierung der Pharmakokinetik der Lipoplexe im Normal- bzw. WTS-Gewebe wäre außerdem möglich. Weiterhin ist gewährleistet, dass, zumindest in ausreichend vitalen Tumoren, jede Tumorzelle Kontakt zu den Lipoplexen bekommt.

Da in der Behandlung der WTS das Lokalrezidiv ein immenses Problem darstellt (Zornig *et al.*, 1992; Weiss & Goldblum, 2001), besonders an chirurgisch kompliziert angehbaren Lokalisationen (z.B. Gefäß-Nerven-Bündel-infiltrierende Tumoren), ist dessen Beherrschung als eines der Hauptziele in der WTS-Therapie zu sehen. So ist es vorstellbar, dass in Kombination mit anderen Therapieverfahren, wie z.B. chirurgischer Resektion und intraoperativer Nachbehandlung des Resektionsbettes mit Lipoplexen (Spülung, Depot), ein Prognosevorteil für WTS-Patienten erzielt werden kann. Der Vorteil der Vorgehensweise begründet sich in der Möglichkeit einer lokal höheren Konzentration der Lipoplexe ohne das Risiko systemischer Nebenwirkungen.

## **6 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an den Xenotransplantaten von insgesamt drei WTS-Zelllinien durchgeführt. Dabei handelte es sich um zwei Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RD, 45/92) und eine Zelllinie eines undifferenzierten Sarkomes (US8/93). In der Absicht, ein *in-vivo*-Modell für weiterführende Untersuchungen im Hause zu etablieren, wurden zunächst WTS-Xenotransplantate per s.c.-Injektion auf der Nacktmaus erzeugt und im Folgenden weitertransplantiert.

Im ersten Teil der Arbeit standen die histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Analyse der Xenotransplantate über insgesamt drei Generationen und der Vergleich mit den Primärtumoren, soweit vorhanden, im Vordergrund. Dabei konnte bei allen drei Zelllinien eine Stabilität im Phänotyp über den Zeitraum der Transplantationen, sowohl auf lichtmikroskopischer als auch auf ultrastruktureller Ebene, nachgewiesen werden. Die Tumoren waren innerhalb einer Transplantationsserie in ihren morphologischen Charakteristika mit geringen Variationen in Zellbild, Gewebsformation und Differenzierungsgrad einander ähnlich, im Vergleich zum Primärtumor (45/92, US8/93) zeigten sich keine neu hinzu gekommenen bzw. verloren gegangenen Differenzierungsmerkmale.

Die Befunde stehen im Einklang mit den Erfahrungen anderer Autoren und unterstreichen die generelle Eignung des Xenotransplantatmodells für kommende Gentransfer-Studien.

Des Weiteren wurden unter dem Aspekt einer ersten praktischen Austestung Gentransferversuche *in vivo* durchgeführt, deren Ergebnisse der zweite Teil der

Arbeit diskutiert. Dabei zeigten sich erwartungsgemäß erhebliche Unterschiede im Vergleich zu den an der Zellkultur gewonnenen Ergebnissen. Dennoch konnten erste qualitative Aussagen gemacht werden: Eine Therapie mit intratumoraler Injektion von Lipid, Lipid-wtp53-Plasmiden und Lipid-mdm2-AS-ODNs zeigte z.B. bei RD-Xenotransplantaten deutliche Unterschiede im Nekroseausmaß in zentralen Tumorbereichen. Der Nachweis einer signifikant verringerten Tumormasse gelang jedoch nicht. Die Methode der intratumoralen Injektion ist im Hinblick auf kommende Versuche kritisch zu überdenken, was u.a. durch signifikante Erfolge bei intrakavitärer Gentransfer-Therapie von RD-Xenotransplantaten (Würl *et al.*, Manuskript eingereicht) untermauert wird.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit sollten eine vergleichende Untersuchung verschiedener Applikationswege für die DNA-Konstrukte sowie die morphologische Charakterisierung der Tumoren nach weiteren Transplantationsgenerationen Grundlage künftiger Experimente zur Transfektion und Wachstumsinhibierung von WTS-Xenotransplantaten mittels wtp53-Plasmiden und mdm2-AS-ODNs sein.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aamdal S., Fodstad O., Nesland J.M. & Pihl A. (1985) Characteristics of human tumour xenografts transplanted under the renal capsule of immunocompetent mice. *Br.J.Cancer* **51**, 347-356.
2. Agrawal S. (1996) Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends.Biotechnol.* **14**, 376-387.
3. Agrawal S., Jiang Z., Zhao Q., Shaw D., Cai Q., Roskey A., Channavajjala L., Saxinger C. & Zhang R. (1997) Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 2620-2625.
4. Akporiaye E.T. & Hersh E. (1999) Clinical aspects of intratumoral gene therapy. *Curr.Opin.Mol.Ther.* **1**, 443-453.
5. Attanoos R.L., Appleton M.A. & Gibbs A.R. (1996) Primary sarcomas of the lung: a clinicopathological and immunohistochemical study of 14 cases. *Histopathology* **29**, 29-36.
6. Bennett G.S., Fellini S.A., Toyama Y. & Holtzer H. (1979) Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J.Cell Biol.* **82**, 577-584.
7. Berger D.P., Engelhardt R. & Mertelsmann R. (1997) *Das rote Buch 1997/98: Hämatologie und internistische Onkologie*. ecomed, Landsberg/Lech.
8. Brooks J.J. (1982) Immunohistochemistry of soft tissue tumors. Myoglobin as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Cancer* **50**, 1757-1763.
9. Brooks J.J. (1986) The significance of double phenotypic patterns and markers in human sarcomas. A new model of mesenchymal differentiation. *Am.J.Pathol.* **125**, 113-123.
10. Brooks J.J. (1996) Immunohistochemistry in the differential diagnosis of soft tissue tumors. In *Soft tissue tumors*. Eds S.W. Weiss & J.J. Brooks. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 65-128.
11. Budach V., Bamberg M., Donhuijsen K., Schmidt U., van Beuningen D. & Stuschke M. (1986) Serial xenotransplantation of a human embryonal carcinoma in experimental urology. *J.Urol.* **136**, 1143-1147.

12. Carter R.L., McCarthy K.P., Machin L.G., Jameson C.F., Philp E.R. & Pinkerton C.R. (1989) Expression of desmin and myoglobin in rhabdomyosarcomas and in developing skeletal muscle. *Histopathology* **15**, 585-595.
13. Chao T.C. & Greager J.A. (1997) Experimental pulmonary sarcoma metastases in athymic nude mice. *J.Surg.Oncol.* **65**, 123-126.
14. Chen L., Agrawal S., Zhou W., Zhang R. & Chen J. (1998) Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 195-200.
15. Chen P.L., Scully P., Shew J.Y., Wang J.Y. & Lee W.H. (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**, 1193-1198.
16. Coonrod A., Li F.Q. & Horwitz M. (1997) On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther.* **4**, 1313-1321.
17. Cordon-Cardo C., Latres E., Drobnjak M., Oliva M.R., Pollack D., Woodruff J.M., Marechal V., Chen J., Brennan M.F. & Levine A.J. (1994) Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* **54**, 794-799.
18. Corson J.M. & Pinkus G.S. (1981) Intracellular myoglobin - a specific marker for skeletal muscle differentiation in soft tissue sarcomas. An immunoperoxidase study. *Am.J.Pathol.* **103**, 384-389.
19. Crnalic S., Hakansson I., Boquist L., Lofvenberg R. & Brostrom L.A. (1997) A novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma developed using orthotopic transplantation of intact tumor tissue into tibia of nude mice. *Clin.Exp.Metastasis* **15**, 164-172.
20. d'Amore E.S., Tollot M., Stracca-Pansa V., Menegon A., Meli S., Carli M. & Ninio V. (1994) Therapy associated differentiation in rhabdomyosarcomas. *Mod.Pathol.* **7**, 69-75.
21. Dawson P.J., Kluskens L.F., Colston J. & Fieldsteel A.H. (1982) Transplantation of human malignant tumors to the athymic rat. *Cancer* **50**, 1151-1154.
22. De Giovanni C., Nanni P., Nicoletti G., Ceccarelli C., Scotlandi K., Landuzzi L. & Lollini P.L. (1989) Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res.* **9**, 1943-1949.

23. Densmore C.L., Kleinerman E.S., Gautam A., Jia S.F., Xu B., Worth L.L., Waldrep J.C., Fung Y.K., T'Ang A. & Knight V. (2001) Growth suppression of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol gene therapy with PEI-p53 complexes. *Cancer Gene Ther.* **8**, 619-627.
24. Donhuijsen K., Budach V., van Beuningen D. & Schmidt U. (1988) Instability of xenotransplanted soft tissue sarcomas. Morphologic and flow cytometric results. *Cancer* **61**, 68-75.
25. Emoto M., Iwasaki H., Kikuchi M., Ishiguro M., Kubota T., Izumi H., Shirakawa K. & Kaneko Y. (1992) Two cell lines established from mixed mullerian tumors of the uterus. Morphologic, immunocytochemical, and cytogenetic analyses. *Cancer* **69**, 1759-1768.
26. Eusebi V., Bondi A. & Rosai J. (1984) Immunohistochemical localization of myoglobin in nonmuscular cells. *Am.J.Surg.Pathol.* **8**, 51-55.
27. Eusebi V., Ceccarelli C., Gorza L., Schiaffino S. & Bussolati G. (1986) Immunocytochemistry of rhabdomyosarcoma. The use of four different markers. *Am.J.Surg.Pathol.* **10**, 293-299.
28. Felix C.A., Kappel C.C., Mitsudomi T., Nau M.M., Tsokos M., Crouch G.D., Nisen P.D., Winick N.J. & Helman L.J. (1992) Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **52**, 2243-2247.
29. Fisher C. (1990) The value of electronmicroscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas: a study of 200 cases. *Histopathology* **16**, 441-454.
30. Fleury-Feith J., Kheuang L., Zeng L., Bignon J., Boutin C., Monnet I. & Jaurand M.C. (1995) Human malignant mesothelial cells: Variability of ultrastructural features in established and nude mice transplanted cell lines. *J.Pathol.* **177**, 209-215.
31. Flørenes V.A., Mælandsmo G.M., Forus A., Andreassen A., Myklebost O. & Fodstad Ø. (1994) MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J.Natl.Cancer Inst.* **86**, 1297-1302.
32. Fogh J., Bean M.A. & Brügger J. (1978) Comparison of a human tumor cell line before and after growth in the nude mouse. In *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*. Hrsg. J. Fogh & B.C. Giovanella. Academic Press, New York, S. 215-234.
33. Freedman D.A., Wu L. & Levine A.J. (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol.Life Sci.* **55**, 96-107.

34. Gaffney E.F., Dervan P.A. & Fletcher C.D. (1993) Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adulthood. Analysis of 11 cases with definition of diagnostic criteria. *Am.J.Surg.Pathol.* **17**, 601-609.
35. Gao W.Y., Storm C., Egan W. & Cheng Y.C. (1993) Cellular pharmacology of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells. *Mol.Pharmacol.* **43**, 45-50.
36. Gard D.L. & Lazarides E. (1980) The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* **19**, 263-275.
37. Garvin A.J., Stanley W.S., Bennett D.D., Sullivan J.L. & Sens D.A. (1986) The in vitro growth, heterotransplantation, and differentiation of a human rhabdomyosarcoma cell line. *Am.J.Pathol.* **125**, 208-217.
38. Germani A., Fusco C., Martinotti S., Musaro A., Molinaro M. & Zani B.M. (1994) TPA-induced differentiation of human rhabdomyosarcoma cells involves dephosphorylation and nuclear accumulation of mutant P53. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **202**, 17-24.
39. Gershwin M.E., Ikeda R.M., Kawakami T.G. & Owens R.B. (1977) Immunobiology of heterotransplanted human tumors in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* **58**, 1455-1461.
40. Giovanella B.C., Stehlin J.S. & Williams L.J.J. (1974) Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* **52**, 921-930.
41. Goren M.P. (1991) Rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas of childhood. *Curr.Opin.Oncol.* **3**, 677-683.
42. Greene H.S.N. (1952) The significance of the heterologous transplantability of human cancer. *Cancer* **5**, 24-44.
43. Gruchala A., Niezabitowski A., Wasilewska A., Sikora K., Rys J., Szklarski W., Jaszcz A., Lackowska B. & Herman K. (1997) Rhabdomyosarcoma. Morphologic, immunohistochemical, and DNA study. *Gen.Diagn.Pathol.* **142**, 175-184.
44. Grünbaum U., Meye A., Bache M., Bartel F., Würfl P., Schmidt H., Dunst J. & Taubert H. (2001) Transfection with mdm2-antisense or wtp53 results in radiosensitization and an increased apoptosis of a soft tissue sarcoma cell line. *Anticancer Res.* **21**, 2065-2071.

45. Hajdu S.I. (1979) *Pathology of Soft Tissue Tumors*. Lea & Febiger, Philadelphia, S. 39
46. Hajdu S.I., Lemos L.B., Kozakewich H., Helson L. & Beattie E.J.J. (1981) Growth pattern and differentiation of human soft tissue sarcomas in nude mice. *Cancer* **47**, 90-98.
47. Harris C.C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**, 1442-1455.
48. Harrison D., Sauthoff H., Heitner S., Jagirdar J., Rom W.N. & Hay J.G. (2001) Wild-type adenovirus decreases tumor xenograft growth, but despite viral persistence complete tumor responses are rarely achieved--deletion of the viral E1b-19-kD gene increases the viral oncolytic effect. *Hum.Gene Ther.* **12**, 1323-1332.
49. Hartig R., Huang Y., Janetzko A., Shoeman R., Grub S. & Traub P. (1997) Binding of fluorescence- and gold-labeled oligodeoxyribonucleotides to cytoplasmic intermediate filaments in epithelial and fibroblast cells. *Exp.Cell Res.* **233**, 169-186.
50. Hashimoto H., Daimaru Y., Takeshita S., Tsuneyoshi M. & Enjoji M. (1992) Prognostic significance of histologic parameters of soft tissue sarcomas. *Cancer* **70**, 2816-2822.
51. Hashimoto H., Daimaru Y., Tsuneyoshi M. & Enjoji M. (1990) Soft tissue sarcoma with additional anaplastic components. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 27 cases. *Cancer* **66**, 1578-1589.
52. Hinze R., Schagdarsurengin U., Taubert H., Meye A., Würl P., Holzhausen H.J., Rath F.W. & Schmidt H. (1999) Assessment of genomic imbalances in malignant fibrous histiocytomas by comparative genomic hybridization. *Int.J.Mol.Med.* **3**, 75-79.
53. Hollowood K. & Fletcher C.D. (1995) Malignant fibrous histiocytoma: morphologic pattern or pathologic entity? *Semin.Diagn.Pathol.* **12**, 210-220.
54. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. & Harris C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
55. Hsiao M., Tse V., Carmel J., Tsai Y., Felgner P.L., Haas M. & Silverberg G.D. (1997) Intracavitary liposome-mediated p53 gene transfer into glioblastoma with endogenous wild-type p53 in vivo results in tumor suppression and long-term survival. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233**, 359-364.

56. Ishii S., Yamawaki S., Saki T., Usui M., Ubayama Y., Minami A., Yagi T., Isu K. & Kobayashi M. (1983) Characteristics of human soft tissue sarcomas in xenografts and in vitro. *Clin.Orthop.* 251-261.
57. Jones S.N., Hancock A.R., Vogel H., Donehower L.A. & Bradley A. (1998) Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 15608-15612.
58. Katenkamp D. (1988) Cellular heterogeneity. Explanation for changing of tumor phenotype and biologic behavior in soft tissue sarcomas. *Pathol.Res.Pract.* **183**, 698-705.
59. Katenkamp D. & Kosmehl H. (1995) Epidemiologie, Ätiologie und Pathologie der Weichgewebssarkome. *Onkologe* **1**, 86-92.
60. Katenkamp D., Kosmehl H. & Langbein L. (1988) In adequate tumor surgery of chemically induced soft tissue sarcomas - an experimental approach for induction of metastasis formation? *Exp.Pathol.* **34**, 209-215.
61. Katenkamp D., Kosmehl H. & Neupert G. (1987) Experimentally induced metastases of malignant fibrous histiocytomas xenotransplanted into nude mice from an established sarcoma cell line (RFS). *Exp.Pathol.* **31**, 83-88.
62. Kindblom L.G., Seidal T. & Karlsson K. (1982) Immuno-histochemical localization of myoglobin in human muscle tissue and embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma. *Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.[A.]* **90**, 167-174.
63. Kodet R. (1989) Rhabdomyosarcoma in childhood. An immunohistological analysis with myoglobin, desmin and vimentin. *Pathol.Res.Pract.* **185**, 207-213.
64. Kondo S., Barnett G.H., Hara H., Morimura T. & Takeuchi J. (1995) MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* **10**, 2001-2006.
65. Kosmehl H., Langbein L. & Katenkamp D. (1989) Histological and immunohistochemical findings in experimental rhabdomyosarcomas. Comparisons between original tumors, tumor recurrences and allotransplants in nude mice. *Exp.Pathol.* **36**, 81-88.
66. Kosmehl H., Langbein L. & Katenkamp D. (1990) Experimental rhabdomyosarcoma with regions like malignant fibrous histiocytoma (MFH) - a true double phenotypic pattern? *J.Pathol.* **160**, 135-140.
67. Krishan A. (1998) When a human tumor xenograft is not a human tumor. *Cancer* **83**, 1889-1890.

68. Kubbutat M.H., Jones S.N. & Vousden K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
69. Kuroki M. (1984) A new human osteosarcoma strain (Os-Beppu) with a high rate of pulmonary metastasis in nude mice. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **14**, 49-56.
70. Kyriazis A.P., Kyriazis A.A., McCombs W.B. & Kereiakes J.A. (1981) Biological behavior of human malignant tumors grown in the nude mouse. *Cancer Res.* **41**, 3995-4000.
71. Leach F.S., Tokino T., Meltzer P., Burrell M., Oliner J.D., Smith S., Hill D.E., Sidransky D., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (1993) p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* **53**, 2231-2234.
72. Lesoon-Wood L.A., Kim W.H., Kleinman H.K., Weintraub B.D. & Mixson A.J. (1995) Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum.Gene Ther.* **6**, 395-405.
73. Liebermann D.A., Hoffman B. & Steinman R.A. (1995) Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* **11**, 199-210.
74. Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A. & Jacks T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**, 847-849.
75. Markhede G., Angervall L. & Stener B. (1982) A multivariate analysis of the prognosis after surgical treatment of malignant soft-tissue tumors. *Cancer* **49**, 1721-1733.
76. Matsui T., Imai T., Han J.S., Awakura T., Taniyama H., Osame S., Nakagawa M. & Ono T. (1991) Bovine undifferentiated alveolar rhabdomyosarcoma and its differentiation in xenotransplanted tumors. *Vet.Pathol.* **28**, 438-445.
77. McAllister R.M., Melnyk J. & Finklestein J.Z. (1969) Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* **24**, 520-526.
78. Meye A. (2001) *Molekulare Charakterisierung (p53, p16<sup>INK4A</sup>, mdm2) humaner Weichteilsarkome und Etablierung von nichtviralen DNA-Transfektions- und Therapiestrategien in vitro*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
79. Meye A., Würfl P., Bache M., Bartel F., Grünbaum U., Mansa-ard J., Schmidt H. & Taubert H. (2000) Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene. *Cancer Lett.* **149**, 181-188.

80. Mierau G.W. & Favara B.E. (1980) Rhabdomyosarcoma in children: ultrastructural study of 31 cases. *Cancer* **46**, 2035-2040.
81. Milas M., Feig B., Yu D., Oriuchi N., Cromeens D., Ge T., Wong F.C., Kim E.E. & Pollock R. (1997) Isolated limb perfusion in the sarcoma-bearing rat: a novel preclinical gene delivery system. *Clin.Cancer Res.* **3**, 2197-2203.
82. Milas M., Yu D., Lang A., Ge T., Feig B., El-Naggar A.K. & Pollock R.E. (2000) Adenovirus-mediated p53 gene therapy inhibits human sarcoma tumorigenicity. *Cancer Gene Ther.* **7**, 422-429.
83. Molenaar W.M., Oosterhuis J.W. & Kamps W.A. (1984) Cytologic differentiation in childhood rhabdomyosarcomas following polychemotherapy. *Hum.Pathol.* **15**, 973-979.
84. Molenaar W.M., Oosterhuis J.W., Oosterhuis A.M. & Ramaekers F.C. (1985) Mesenchymal and muscle-specific intermediate filaments (vimentin and desmin) in relation to differentiation in childhood rhabdomyosarcomas. *Hum.Pathol.* **16**, 838-843.
85. Motoyama T., Watanabe H. & Yamamoto T. (1986) Embryonal rhabdomyosarcoma in nude mice and in vitro. *Acta Pathol.Jpn.* **36**, 1495-1505.
86. Mukhopadhyay T., Maxwell S.A. & Roth J.A. (1995) *P53 supressor gene*. 1. Aufl., Springer, New York.
87. Namiki Y., Takahashi T. & Ohno T. (1998) Gene transduction for disseminated intraperitoneal tumor using cationic liposomes containing non-histone chromatin proteins: cationic liposomal gene therapy of carcinomatosa. *Gene Ther.* **5**, 240-246.
88. Nanni P., De Giovanni C., Nicoletti G., Del Re B., Scotlandi K. & Lollini P.L. (1989) Human rhabdomyosarcoma cells in nude mice as a model for metastasis and differentiation. *Invasion Metastasis* **9**, 231-241.
89. Neckers L.M. & Iyer K. (1997) Non-Antisense effects of antisense oligonucleotides. In *Antisense oligodeoxynucleotides and antisense RNA: novel pharmacological and therapeutic agents*. Hrsg. B. Weiss, CRC Press, Boca Raton, Fla., S. 79-89.
90. Neulat-Duga I., Sheppel A., Marty C., Lacroux F., Pourrat J., Caveriviere P. & Delsol G. (1984) Metastases of human tumor xenografts in nude mice. *Invasion Metastasis* **4** , 209-224.

91. Nielsen L.L., Dell J., Maxwell E., Armstrong L., Maneval D. & Catino J.J. (1997) Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts. *Cancer Gene Ther.* **4**, 129-138.
92. Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L. & Vogelstein B. (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83.
93. Ordóñez N.G. (1998) Application of immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas: a review and update. *Adv.Anat.Pathol.* **5**, 67-85.
94. Pardee A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
95. Pathak S., Nemeth M.A. & Multani A.S. (1998) Human tumor xenografts in nude mice are not always of human origin: a warning signal. *Cancer* **83**, 1891-1893.
96. Pathak S., Nemeth M.A., Multani A.S., Thalmann G.N., von Eschenbach A.C. & Chung L.W. (1997) Can cancer cells transform normal host cells into malignant cells? *Br.J.Cancer* **76**, 1134-1138.
97. Paulus W., Slowik F. & Jellinger K. (1991) Primary intracranial sarcomas: histopathological features of 19 cases. *Histopathology* **18**, 395-402.
98. Phillips B. & Gazet J.C. (1967) Growth of 2 human tumour cell lines in mice treated with antilymphocyte serum. *Nature* **215**, 548-549.
99. Pollock R.E., Lang A., Ge T., Sun D., Tan M. & Yu D. (1998) Wild-type p53 and a p53 temperature-sensitive mutant suppress human soft tissue sarcoma by enhancing cell cycle control. *Clin.Cancer Res.* **4**, 1985-1994.
100. Povlsen C., Rygaard J. & Fogh J. (1982) Long term growth of human tumors in nude mice: Evaluation of stability. In *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*, 2. Aufl., Hrsg. J. Fogh & B.C. Giovanella, Academic Press, New York, S. 79-93.
101. Riede U.N. & Schaefer H.E. (1995) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
102. Roholl P.J., Elbers H.R., Prinsen I., Claessens J.A. & Van Unnik J.A. (1990) Distribution of actin isoforms in sarcomas: an immunohistochemical study. *Hum.Pathol.* **21**, 1269-1274.
103. Roholl P.J., Rutgers D.H., Rademakers L.H., De Weger R.A., Elbers J.R. & Van Unnik J.A. (1988) Characterization of human soft tissue sarcomas in nude mice. Evidence for histogenic properties of malignant fibrous histiocytoomas. *Am.J.Pathol.* **131**, 559-568.

104. Roth J.A. & Cristiano R.J. (1997) Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J.Natl.Cancer Inst.* **89**, 21-39.
105. Rygaard J. & Povlsen C.O. (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **77**, 758-760.
106. Santoro A., Tursz T., Mouridsen H., Verweij J., Steward W., Somers R., Buesa J., Casali P., Spooner D. & Rankin E. (1995) Doxorubicin versus CYVADIC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *J.Clin.Oncol.* **13**, 1537-1545.
107. Sawada M., Terada N., Yamamoto R., Nishizawa Y., Wada A., Mori Y., Sakamoto H. & Tanizawa O. (1992) Establishment and characterization of human uterine leiomyosarcoma heterotransplanted into nude mice. *Int.J.Cancer* **52**, 124-129.
108. Scheule R.K. & Cheng S.H. (1996) Gene transfer into mammalian cells using synthetic cationic lipids. In *Artificial self-assembling systems for gene delivery*. Hrsg. P.L. Felgner, American Chemical Society, Washington DC, S. 177-190.
109. Schmidt D., Reimann O., Treuner J. & Harms D. (1986) Cellular differentiation and prognosis in embryonal rhabdomyosarcoma. A report from the Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study 1981 (CWS 81). *Virchows Arch.A.Pathol.Anat.Histopathol.* **409**, 183-194.
110. Schmidt H., Korber S., Hinze R., Taubert H., Meye A., Würfl P., Bache M., Holzhausen H.J., Dralle H. & Rath F.W. (1998) Detection of numerical chromosomal changes in 20 malignant fibrous histiocytomas by FISH. *Int.J.Oncol.* **12**, 395-402.
111. Schmidt U., Donhuijsen K., Metz K.A. & Leder L.D. (1996) Variability of differentiation patterns in xenotransplanted spindle cell sarcomas: a histomorphological, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Ultrastruct.Pathol.* **20**, 131-140.
112. Schmidt U., Stüben G., Stuschke M. & Donhuijsen K. (1997) Ultrastructural evidence for divergent and alternating differentiations in spindle cell sarcoma xenografts. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* **29**, 187-195.
113. Seidal T., Kindblom L.G. & Angervall L. (1988) Alveolar and poorly differentiated rhabdomyosarcoma. A clinicopathologic, light-microscopic, ultrastructural and immunohistochemical analysis. *APMIS* **96**, 825-838.

114. Selvakumaran M., Reed J.C., Liebermann D. & Hoffman B. (1994) Progression of the myeloid differentiation program is dominant to transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis in M1 myeloid leukemic cells. *Blood* **84**, 1036-1042.
115. Sharkey F.E. & Fogh J. (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* **3**, 341-360.
116. Skalli O., Gabbiani G., Babai F., Seemayer T.A., Pizzolato G. & Schurch W. (1988) Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. II. Rhabdomyosarcomas. *Am.J.Pathol.* **130**, 515-531.
117. Steinau H.U. & Biemer E. (1990) Resektionsmethodik und funktionelle Wiederherstellungschirurgie maligner Weichgewebstumoren der Extremitäten. *Langenbecks.Arch.Chir.* **375**, 239-245.
118. Stratton M.R., Moss S., Warren W., Patterson H., Clark J., Fisher C., Fletcher C.D., Ball A., Thomas M. & Gusterson B.A. (1990) Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* **5**, 1297-1301.
119. Suit H.D., Mankin H.J., Wood W.C. & Proppe K.H. (1985) Preoperative, intraoperative, and postoperative radiation in the treatment of primary soft tissue sarcoma. *Cancer* **55**, 2659-2667.
120. Swisher S.G., Roth J.A., Nemunaitis J., Lawrence D.D., Kemp B.L., Carrasco C.H., Connors D.G., El-Naggar A.K., Fossella F., Glisson B.S., Hong W.K., Khuri F.R., Kurie J.M., Lee J.J., Lee J.S., Mack M., Merritt J.A., Nguyen D.M., Nesbitt J.C., Perez-Soler R., Pisters K.M., Putnam J.B., Richli W.R., Savin M. & Waugh M.K. (1999) Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 763-771.
121. Takase B., Yamazaki Y., Manabe S., Miaki H. & Mori K. (1971) Heterotransplantation of cultured human osteogenic sarcoma cells. *Gan.No.Rinsho.* **17**, 134-141.
122. Tallini G., Parham D.M., Dias P., Cordon-Cardo C., Houghton P.J. & Rosai J. (1994) Myogenic regulatory protein expression in adult soft tissue sarcomas. A sensitive and specific marker of skeletal muscle differentiation. *Am.J.Pathol.* **144**, 693-701.
123. Taubert H., Koehler T., Meye A., Bartel F., Lautenschläger C., Borchert S., Bache M., Schmidt H. & Würfl P. (2000) mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. *Mol.Med.* **6**, 50-59.

124. Taubert H., Meye A. & Würfl P. (1996) Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res.* **56**, 4134-4136.
125. Taubert H., Meye A. & Würfl P. (1998) Sarcomas and p53 mutations. *Mol.Med.* **4**, 365-372.
126. Taubert H., Schmidt H., Würfl P., Hinze R., Meye A., Bache M., Berger D., Holzhausen H.J., Dralle H. & Rath F.W. (1997) Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivate clones. *Int.J.Oncol.* **11**, 521-526.
127. Teoh G., Urashima M., Ogata A., Chauhan D., DeCaprio J.A., Treon S.P., Schlossman R.L. & Anderson K.C. (1997) MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood* **90**, 1982-1992.
128. Tierney J.F., Mosseri V., Stewart L.A., Souhami R.L. & Parmar M.K. (1995) Adjuvant chemotherapy for soft-tissue sarcoma: review and meta-analysis of the published results of randomised clinical trials. *Br.J.Cancer* **72**, 469-475.
129. Tortora G., Caputo R., Bianco R., Damiano V., Pomatico G. & Bianco A.R. (1999) Antitumor activity of a novel MBO antisense MDM2 and cooperative activity with other antitumor agents in vitro and in vivo. *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* **40**, 730-730.
130. Tortora G., Caputo R., Damiano V., Bianco R., Chen J., Agrawal S., Bianco A.R. & Ciardiello F. (2000) A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. *Int.J.Cancer* **88**, 804-809.
131. Trump B.F., Berezsky I.K., Chang S.H. & Phelps P.C. (1997) The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol.Pathol.* **25**, 82-88.
132. Tsokos M., Howard R. & Costa J. (1983) Immunohistochemical study of alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Lab.Invest.* **48**, 148-155.
133. Turturro F., Heineke H.L., Drevyanko T.F., Link C.J.J. & Seth P. (2000) Adenovirus-p53-mediated gene therapy of anaplastic large cell lymphoma with t(2;5) in a nude mouse model. *Gene Ther.* **7**, 930-933.
134. Ueyama Y., Ohsawa N., Tamaoki N. & Nomura T. (1975) Heterotransplantation of human neoplasms in nude mice. *Keio.J.Med.* **24**, 415-421.
135. Virkajarvi N., Paakko P. & Soini Y. (1997) Association between p53 overexpression, cell proliferation, tumor necrosis and extent of apoptosis in operated pancreatic adenocarcinoma. *APMIS* **105**, 765-772.

136. Vlassov V.V., Balakireva L.A. & Yakubov L.A. (1994) Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **1197**, 95-108.
137. Wang H., Cai Q., Zeng X., Yu D., Agrawal S. & Zhang R. (1999) Antitumor activity and pharmacokinetics of a mixed-backbone antisense oligonucleotide targeted to the R1alpha subunit of protein kinase A after oral administration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 13989-13994.
138. Wang H., Nan L., Yu D., Agrawal S. & Zhang R. (2001) Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel therapeutic approach to human breast cancer: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Clin.Cancer Res.* **7**, 3613-3624.
139. Wang H., Zeng X., Oliver P., Le L.P., Chen J., Chen L., Zhou W., Agrawal S. & Zhang R. (1999) MDM2 oncogene as a target for cancer therapy: An antisense approach. *Int.J.Oncol.* **15**, 653-660.
140. Weiss B. (1997) *Antisense oligodeoxynucleotides and antisense RNA: novel pharmacological and therapeutic agents* . CRC Press, Boca Raton, Fla.
141. Weiss S.W. & Goldblum J.R. (2001) *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*. 4. Aufl., Mosby, St. Louis, London, Philadelphia (usw.).
142. Wu X., Bayle H., Olson D. & Levine A.J. (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**, 1126-1132.
143. Würfl, P., Bartel, F., Meye, A., Kappler, M., Bache, M., Schmidt, H., Holzhausen, H. J., Schönfelder, M., & Taubert, H. (Manuskript eingereicht) Growth reduction of a xenotransplanted human soft tissue sarcoma by MDM2 antisense therapy via implanted osmotic minipumps.
144. Würfl P., Meye A., Schmidt H., Lautenschläger C., Kalthoff H., Rath F.W. & Taubert H. (1998) High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene* **16**, 1183-1185.
145. Würfl P., Taubert H., Meye A., Berger D., Lautenschläger C., Holzhausen H.J., Schmidt H., Kalthoff H., Rath F.W. & Dralle H. (1997) Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **123**, 502-508.
146. Xu M., Kumar D., Srinivas S., Detolla L.J., Yu S.F., Stass S.A. & Mixson A.J. (1997) Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum.Gene Ther.* **8**, 177-185.

147. Xu Y. & Szoka F.C. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616-5623.
148. Yerushalmi N., Brinkmann U., Brinkmann E., Pai L. & Pastan I. (2000) Attenuating the growth of tumors by intratumoral administration of DNA encoding Pseudomonas exotoxin via cationic liposomes. *Cancer Gene Ther.* **7**, 91-96.
149. Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A. & Welsh M.J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J.Biol.Chem.* **270**, 18997-19007.
150. Zhan M., Yu D., Lang A., Li L. & Pollock R.E. (2001) Wild type p53 sensitizes soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by down-regulating multidrug resistance-1 expression. *Cancer* **92**, 1556-1566.
151. Zhang R., Zeng X.F., Oliver P., Chen J. & Agrawal S. (1999) Inhibition of MDM2 oncogene expression as a new approach to cancer therapy: in vitro and in vivo studies. *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* **40**, 484-484.
152. Zornig C., Thoma G., Weh H.J., Krull A. & Schwarz R. (1992) Die Kompartimentresektion als Therapie der Wahl bei subfascialen Weichteilsarkomen am Beispiel des Oberschenkels. *Chirurg* **63**, 581-586.
153. Zou Y., Zong G., Ling Y.H., Hao M.M., Lozano G., Hong W.K. & Perez-Soler R. (1998) Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J.Natl.Cancer Inst.* **90**, 1130-1137.
154. Zou Y., Zong G., Ling Y.H. & Perez-Soler R. (2000) Development of cationic liposome formulations for intratracheal gene therapy of early lung cancer. *Cancer Gene Ther.* **7**, 683-696.

## 8 Thesen

1. Das Nacktmausmodell ist geeignet für die Generierung phänotypisch konstanter WTS-Xenotransplantate der Zelllinien 45/92, RD und US8/93, wobei die phänotypische Konstanz Grundvoraussetzung der Vergleichbarkeit von Ergebnissen nachfolgender Gentransferstudien ist.
2. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit der Theorie in Einklang zu bringen, dass das MFH den „final common pathway“ der WTS-Progression darstellt.
3. Die erhoffte Langzeitstabilität der Xenotransplantate kann trotz bisheriger Konstanz des Phänotyps nur vermutet werden.
4. Myoglobin-, Desmin- und Vimentin-Expression korrelieren bei den Rhabdomyosarkom-Xenotransplantaten mit De- bzw. Differenzierung im histologischen Bild.
5. Die Elektronenmikroskopie ist entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit nicht immer in der Lage, immunhistochemisch nachgewiesene Intermediärfilamente ebenfalls zu detektieren.
6. Die Applikation von DNA-Konstrukten per Injektion in einen solide wachsenden Tumor ist kritisch zu überdenken, auch wenn eine Vielzahl von Autorenmeinungen dieser Ansicht entgegen steht.
7. Kleinere Tumordurchmesser oder flächenhaft-disseminiertes Tumorstadium, die kontinuierliche Applikation der DNA-Konstrukte sowie die Untersuchung größerer Fallzahlen sind Voraussetzungen für Erfolg versprechende Anschlussuntersuchungen.
8. Der Mechanismus einer vermuteten p53-induzierten Nekrosebildung ist bislang nicht vollständig erklärt.
9. Der theoretisch schlüssige Therapieansatz einer wtp53- bzw. mdm2-AS-ODN-Transfektion wird in seiner praktischen Anwendbarkeit für die Lipofektion bei WTS grundsätzlich bestätigt.
10. Die zukünftige Anwendung liposomal komplexierter wtp53-Plasmide und mdm2-AS-ODNs im Rahmen klinischer Studien ist aus dem heutigen Blickwinkel vor allem in Kombination mit anderen Therapieverfahren sinnvoll.

## Tabellarischer Lebenslauf

- Name:** Albrecht Waschke, geb. am 02.05.1974 in Jena
- Ehefrau:** Anja Waschke, geb. Schwenke, geb. am 02.01.1974 in Greifswald  
Referendarin für das Gymnasiale Lehramt (Deutsch/Biologie)
- Eltern:** Renate Waschke, geb. Gosch, geb. am 26.04.1949 in Chemnitz,  
Diplom-Chemikerin und Ernst-Joachim Waschke, geb. am 02.10.1949  
in Dessau, Professor für Altes Testament an der Theologischen  
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle
- Geschwister:** Catharina und Bernhard Waschke

**Ausbildung:** Schulbesuch

1980 – 1988	Mittelschule Hanshagen
1988 – 1992	Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Greifswald Spezialklasse für neue Sprachen
August 1992	Abitur
10/1992 – 12/1993	Zivildienst in der Johanna-Odebrecht-Stiftung Greifswald
<u>Studium</u>	
SS 1994	Studium der Theologie an der MLU Halle
WS 1994	Beginn des Medizinstudiums an der MLU Halle
September 1996	Physikum
August 1997	1. Staatsexamen
September 1999	2. Staatsexamen
Praktisches Jahr	Innere Medizin (Elisabethkrankenhaus Halle) Chirurgie (Hôpital régional Delémont, Schweiz) Neurologie (Uniklinik Halle)
November 2000	3. Staatsexamen
Seit März 2001	AiP in der Neurochirurgie der Universität Rostock

**Tätigkeiten außerhalb des Studiums:**

1996 – 1999	Tutor im Präparierkurs sowie im gehirnanatomischen Kurs am Anatomischen Institut in Halle
-------------	--

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, März 2002

Albrecht Waschke

## Danksagung

Danken möchte ich zuallererst Herrn Prof. Dr. Friedrich Wilhelm Rath für die Überlassung des Themas, die anschaulichen Einführungen in die Welt der Weichteilsarkom-Histologie sowie die geduldigen, fruchtbringenden Gespräche und Hinweise.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Helge Taubert für die hilfreiche, freundschaftliche Unterstützung und Betreuung im Rahmen der Experimente sowie für den regen Gedankenaustausch und die konstruktive Kritik.

In diesem Zusammenhang möchte ich ebenfalls den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Weichteilsarkome“ danken, namentlich Dr. rer. nat. Axel Meye und PD Dr. med. habil. Peter Würfl für die freundliche Kooperation.

Weiterhin haben mich unterstützt Herr Prof. Dr. Hans-Jürgen Holzhausen mit der Durchsicht der Elektronenmikroskopien und der Einführung in die speziellen Aspekte bei den Weichteilsarkomen, Herr Dr. med. Raoul Hinze mit seinen scharfsinnigen Anregungen und Frau Dr. Hannelore Schmidt mit der Anfertigung der Chromosomenanalysen.

Zu danken habe ich Herrn Prof. Dr. Dralle, Direktor der Klinik für Allgemeinchirurgie, für die Überlassung der Proben der Primärtumoren.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich danken: den technischen Assistentinnen der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung, namentlich Frau Ilona Wiederhold, Frau Ute Rolle und Frau Monika Wolf, Frau Gabriele Bauer im Immunhistochemie-Labor, Frau Fischer aus der Elektronenmikroskopie-Abteilung sowie den Assistentinnen des Routine-Labors.

Auch in Rostock erfuhr ich freundliche Unterstützung durch Frau Lukat aus der Grafik-Abteilung des Institutes für Pathologie der Universität Rostock, die mir bei der Anfertigung der Fotografien zur Seite stand.

Mit ihrer Geduld und Aufmunterung in Phasen der Resignation sowie der Korrektur des Manuskripts trägt nicht zuletzt meine Frau Anja maßgebenden Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit.