

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Renata Mendoza, geb. Zavatzka

### **„Untersuchung des Wachstums- und Metastasierungsverhaltens humaner, nichtkleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien nach retroviralem Endostatin-Gentransfer im murinen Xenotransplantationsmodell“**

Die hohe Morbidität, Mortalität und steigende Inzidenz der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) erfordern die Entwicklung neuer alternativer Therapieansätze. Eine potentielle Alternative zu den etablierten Strategien zur Behandlung des NSCLC ist die Hemmung der Tumervaskularisierung (Antiangiogenese), wodurch die Tumorzellen von der Nährstoffversorgung abgeschnitten werden und der Tumor nicht weiter wachsen oder sich zurückbilden kann. Dieser Effekt kann z. B. mit dem Angiogenesehemmer Endostatin erzielt werden. Da eine kontinuierliche langfristige Verabreichung von Endostatin zur Sicherung des Therapieerfolges nötig ist, scheint die retroviral vermittelte Übertragung des Endostatin-Gens eine geeignete Alternative zur systemischen Applikation von Endostatin zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Therapieeffekt von humanem Endostatin auf humane mit dem Endostatin-Gen retroviral transduzierte nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien (KNS 62, Colo 699) im murinen Xenotransplantationsmodell untersucht. Für die Untersuchungen im Tiermodell wurden insgesamt 64 Scid-beige Mäuse des Stammes C.B-17/IcrHsd Scid-bg verwendet, denen Zellen der beiden Bronchialkarzinomzelllinien entweder subkutan oder orthotop in die Lunge implantiert wurden.

Das Endostatin-Gen wurde gemeinsam mit der Sekretionssequenz und einem Neomycin-Resistenzgen mit Hilfe eines VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Vektors (tjmother) in die Tumorzellen integriert. Der benutzte retrovirale Vektor basiert auf dem *Moloney murine leukemia virus* und ist replikationsdefekt. Als Kontrolle zur jeweiligen mit dem Endostatin-Gen transduzierten Zelllinie (KNS 62 TJ Endo, Colo 699 TJ Endo) diente die entsprechende mit dem „leeren“ Vektor transduzierte Zelllinie (KNS 62 TJ mother, Colo 699 TJ mother).

Der in vitro Nachweis von Endostatin erfolgte mittels ELISA im Zellkulturüberstand. Dabei war der Endostatingehalt bei beiden TJ Endo Zelllinien signifikant erhöht gegenüber den TJ mother Zelllinien, wobei die Zelllinie KNS 62 TJ Endo im Vergleich zu Colo 699 TJ Endo eine mehrfach höhere Menge von Endostatin produzierte.

Die antiangiogene Wirksamkeit des von den Zelllinien KNS 62 TJ Endo und Colo 699 TJ Endo produzierten Endostatins wurde in vitro im "tube formation assay" an murinen Herzendothelzellen getestet. Mittels Zellkulturüberstand der Zelllinien Colo 699 TJ Endo bzw. KNS 62 TJ Endo, nicht aber der Kontrollen Colo 699 TJ mother bzw. KNS 62 TJ mother, konnte die Ausbildung gefäßartiger Formationen deutlich gestört bzw. gänzlich verhindert werden.

Im Tierversuch zeigte sich eine signifikante Verzögerung der Proliferation der subkutan gewachsenen Tumore, wenn die Tumorzellen mit dem Endostatin-Gen transduziert waren.

Bei orthotoper Tumorzellimplantation war nur bei KNS 62 TJ Endo eine verringerte Anzahl pleuroviszeraler Metastasen und kleinere Primärtumoren zu beobachten. Das Überleben der Tiere, denen endostatinproduzierende Zellen transplantiert wurden, war um 23,3 % (Colo 699 TJ Endo) bzw. 41,3 % (KNS 62 TJ Endo) verlängert. Der Überlebensvorteil war jedoch nur im Falle der Zelllinie KNS 62 TJ Endo signifikant. Im Falle der Zelllinie Colo 699 wurde weder in Bezug auf das Überleben noch hinsichtlich des Primärtumorwachstums und der Metastasierungsrate ein signifikanter Unterschied zwischen TJ Endo und TJ mother ermittelt.

Die Endostatin-Konzentration im Serum von Mäusen, denen Zellen der Zelllinie KNS 62 TJ Endo implantiert wurden, war im heterotopen wie auch im orthotopen Modell signifikant erhöht. Immunhistochemisch sowie mittels Westernblot wurde ein ausgeprägter Gehalt an Endostatin und eine verringerte Mikroblutgefäßdichte in den aus KNS 62 TJ Endo Zellen entstandenen subkutanen Tumoren nachgewiesen. Im Falle der Zelllinie Colo 699 entstand dies bezüglich kein Unterschied zwischen den aus TJ Endo- bzw. TJ mother- Zellen entstandenen subkutanen Tumoren.

Insgesamt ist zu sagen, dass es nach retroviralem Endostatin-Genstransfer in nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien zu einer Sekretion von funktionsfähigem humanem Endostatin kam, das das Tumorwachstum hemmen kann. Die antitumorale Wirkung entsprach prinzipiell dem therapeutischen Effekt nach systemischer Applikation von humanem Endostatin bei der Behandlung von NSCLC. Die Endostatinsekretion nach Genstransduktion war bei den verwendeten NSCLC Zelllinien unterschiedlich hoch und korreliert mit der therapeutischen Wirksamkeit. Das weist darauf hin, dass die Effizienz der Endostatin-Genherapie möglicherweise vom Typ des NSCLC abhängig ist. Die antiangiogene Therapie von NSCLC mittels Endostatingen-Übertragung erscheint trotzdem vielversprechend. Allerdings erscheinen weitere Experimente zur Klärung offener Fragen und noch bestehender Probleme notwendig.

## **8. SUMMARY**

Renata Mendoza, geb. Zavatzka

**“Investigation on the growth and metastatic behaviour of human non-small cell lung cancer cell lines after retroviral endostatin gene transfer in a murine xenotransplantation model”**

The high morbidity, mortality and increasing incidents of non-small cell lung cancer (NSCLC) require the development of more effective therapy modalities. A promising alternative to established strategies is the inhibition of tumor vascularization (antiangiogenesis) resulting in inhibition of the tumor cells' nutrient supply and ultimately in cessation of tumor growth and even shrinkage of the tumor. This effect can be accomplished with the angiogenesis inhibitor endostatin. Since a continuous long-term administration of endostatin is necessary for the therapy to be successful, retroviral gene transfer of endostatin seems to be a suitable alternative to its systemic application.

The present investigation describes the therapeutic effect of retroviral endostatin gene transfer into human NSCLC cell lines (KNS 62 and Colo 699) in a murine xenotransplantation model with 64 Scid-beige mice of the strain C.B-17/IcrHsd Scid-bg. NSCLC cells were transduced with the VSV-G pseudotyped retroviral vector (tjmother), containing the human endostatin gene along with a signal sequence for a proper secretion and the neomycin resistance gene (KNS 62 TJ Endo, Colo 699 TJ Endo). This vector was derived from the Moloney murine leukemia virus and is replication-defective. Control cells were transduced with the empty vector (KNS 62 TJ mother, Colo 699 TJ mother).

Upon quantitative evaluation of endostatin secretion in supernatants of cultured cells by ELISA, both endostatin transduced cell lines showed a statistical significant endostatin secretion in comparison to controls. Endostatin concentrations in conditioned medium from KNS 62 TJ Endo cells were much higher than in that from Colo 699 TJ Endo cells.

The supernatant from KNS 62 TJ Endo, but not that of KNS 62 TJ mother, cells led to a complete inhibition of the tube formation of murine heart endothelial cells in a tube formation assay. The supernatant from Colo 699 TJ Endo cells had a similar but slightly weaker effect.

In vivo, the growth of subcutaneous tumors was significantly delayed in endostatin transduced tumors of both cell lines. Orthotopic tumor growth and the number of pleural metastases were significantly reduced in endostatin transduced KNS 62 tumors. Survival of animals bearing orthotopic tumors was extended by 23.3 % in the case of Colo 699 TJ Endo and by 41 % for KNS 62 TJ Endo cells, compared to control mice bearing tumors from empty vector transduced cells. Median survival time was significantly increased in mice bearing KNS 62 TJ Endo tumors, whereas in mice harboring Colo 699 TJ Endo tumors no significant differences were observed respect to life span, growth of tumors, or metastases.

Increased levels of endostatin were detected in sera of mice with subcutaneous as well as orthotopic KNS 62 TJ Endo tumors, but were absent in sera from all mice with Colo 699 TJ Endo tumors. Likewise, endostatin synthesis, as detected by immunohistochemistry and western blot analysis, as well as endostatin function, as measured by a decrease in microvessel density in subcutaneous tumors, could only be demonstrated for KNS 62 TJ Endo.

Taken together, the retroviral transfer of the endostatin gene to NSCLC tumor cells resulted in secretion of functional endostatin. The anti-tumor effect after endostatin gene transfer may underlie the therapeutical effect of systemically administered human endostatin. The NSCLC cell lines employed differ in their endostatin production following endostatin gene transfer raising the possibility that the efficiency of gene therapy is critically dependent on the cell type used. However, despite the need for improvements the endostatin gene therapy seems to be a promising approach for the treatment of NSCLC.