Untersuchungen zur Charakterisierung der Bystander-Effekte bei einer *in vivo* Therapie mit Suizidgenen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

vorgelegt von

Heike Corban-Wilhelm

geb. in Trier

Mainz, Februar 2001

Die vorliegende Arbeit wurde erstellt am

Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg

Forschungsschwerpunkt Radiologische Diagnostik und Therapie

Abteilung: Klinische Kooperationseinheit Strahlentherapeutische Onkologie

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Jahr der mündlichen Prüfung: 2001

Je mehr man schon weiß, je mehr hat man noch zu lernen. Mit dem Wissen nimmt das Nichtwissen in gleichem Grade zu, oder vielmehr das Wissen des Nichtwissens.

(Friedrich von Schlegel)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Krebs und seine Entstehung 1

1.1.1 Karzinogenese 2

1.2 Ansätze zur Krebstherapie 3

1.2.1 Konventionelle Krebstherapie 3

1.2.2 Gentherapie in der Onkologie 5

1.2.2.1 Gen-Ersatz-Therapie 7

1.2.2.2 Antisense-Therapie 8

1.2.2.3 Tumorvakzination 8

1.2.2.4 Medikamenten-Resistenzgen-Therapie 9

1.2.2.5 Suizidgen-Therapie 9

1.3 Eigenschaften der Suizidgene Thymidinkinase und Cytosin Deaminase 11

1.3.1 Herpes simplex Virus I Thymidinkinase 11

1.3.2 Escherichia coli Cytosin Deaminase 13

1.4 Voraussetzungen für eine Suizidgen-Therapie 14

1.4.1 Tumor pH-Wert 14

1.4.2 Bystander Effekte 15

1.4.3 Aufbau der Gap-junctions 17

1.5 Ziele der Arbeit 19

2 Material und Methoden 20

2.1 Material 20

2.1.1 Zelllinien 20

2.1.2 Lösungen und Chemikalien 22

2.1.3 Verbrauchsmaterial 24

2.1.4 Geräte 25

2.2 Methoden der Zellkultur 26

2.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen 26

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen 27

2.3 Zytotoxische Untersuchungen 28

2.3.1 Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Vitalität von Zellen 28

2.3.2 MTS-Assay 30

2.4. Tierversuche 30

2.4.1 Tiere und Tierhaltung 31

2.4.2 Tumormodell 31

2.4.3 Tumortransplantation 32

2.4.4 Behandlung der Tiere mit Pro-Drugs 33

2.4.5 Tötung, Sektion und Organkonservierung 34

2.5 Methoden zur Proteinchemie 35

2.5.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe und Zellen 35

2.5.2 Quantifizierung des Proteinsgehalts 36

2.5.3 Fällung von Proteinen durch organische Lösungsmittel 38

2.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) 38

2.5.5 Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blotting) 41

2.5.6 Färbung mit Ponceau S 41

2.5.7 Nachweis von Proteinen auf Blot-Membranen mit immunchemischen Methoden 42

2.6 Immunologische Techniken 44

2.6.1 Konservierung von Geweben und Zellen 44

2.6.2 Immunhistochemischer Nachweis mit alkalischer Phosphatase 45

2.6.3 Immunhistochemischer Nachweis mit 3,3´-Diaminobenzidin 48

2.6.4 Immunhistochemischer Nachweis mit Fluoreszenzfarbstoffen 50

2.7 ^{19}F-NMR Messungen 51

2.8 Statistik 53

2.8.1 Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauß 53

2.8.2 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier 53

2.8.3 Log-Rank Test 54

2.8.4 Varianzanalyse nach Duncan 54

3 Ergebnisse 55

3.1 Eigenschaften der modifizierten AT-1 Zelllinien 55

3.1.1 Bestimmung der Verdopplungszeit von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen 55

3.1.2 Nachweis und Lokalisation der Fremdproteine in AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen 57

3.1.3 Der zytotoxische Einfluss der Pro-Drugs Ganciclovir und 5-Fluorocytosin auf AT-1, AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen 58

3.2 Wirksamkeit der Pro-Drugs auf AT-1/CDglyTK Tumore *in vivo* 61

3.3 Lokaler-Bystander-Effekt *in vivo* 67

3.3.1 *In vivo* Untersuchungen der AT-1/GFP Zelllinie 67

3.3.2 Einfluss der Pro-Drugs auf nicht suizidgen-tragende Zellen *in vivo* 70

3.3.3 Morphologische Untersuchungen zur Bestimmung des Verhältnisses AT-1/GFP zu AT-1/CDglyTK bei unterschiedlichen Zellmischungsverhältnissen *in vivo* 73

3.3.4 Bystander-Effekt der AT-1/CDglyTK Zellen auf AT-1/GFP Zellen *in vivo* 75

3.4 Der Bystander-Effekt im Thymidinkinase / Ganciclovir System **79**

3.4.1 Gap-junction Ausbildung in den verschiedenen AT-1 Tumoren 79

3.4.2 Modulation des Bystander-Effektes mit Hilfe von Apigenin 81

3.4.3 Connexin Nachweis in Apigenin behandelten Zellen 84

3.5 Der Bystander-Effekt im Cytosin Deaminase / 5-Fluorocytosin System **85**

3.5.1 *In vitro* Bystander-Effekt 85

3.5.2 Sensitivität der AT-1 Zellen auf 5-Fluorouracil 86

3.5.3 Bestimmung der metabolisierten 5-Fluorouracil Menge in AT-1/CDglyTK Zellen mittels ^{19}F-NMR 88

3.5.4 ^{19}F-NMR Untersuchungen zum Abbauweg von 5-Fluorouracil 90

3.6 Distaler-Bystander-Effekt **93**

3.6.1 Histologische Untersuchungen 93

3.6.2 Modell zur Therapie einer gleichzeitig auftretenden Metastase 95

3.6.3 Aktivierung eines immunologischen Gedächtnisses 97

4 Diskussion **99**

5 Zusammenfassung **120**

6 Literaturverzeichnis **122**

7 Konferenzbeiträge **134**

7.1 Vorträge 134

7.2 Poster 134

8 Danksagung **135**

9 Lebenslauf **137**

Abkürzungen

Abkürzung	Name
µM	Mikromolar
5-FC	5-Fluorocytosin
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ACV	Acyclovir
ADA	Adenosin Deaminase Mangelerkrankung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	entmineralisiertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bystander-Effekt
CD	Cytosin Deaminase
CDglyTK	Fusionsprotein aus Cytosin Deaminase und Thymidinkinase
CMV	Cytomegalie Virus
CO_2	Kohlendioxid
Cx	Connexin
DAPI	Diamidinophenylindol
DDT	Dithiothreithol
DHFU	Dehydro-5-fluorouracil
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Diphosphat
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FBAL	?-Fluoro-?-alanin
FCS	Fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GCV	Ganciclovir
GFP	Green Fluorescent Protein
gly	Glycin-Spacer
h	Stunde
Hepes	4-(-Hydroxyethyl-)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSV	Herpes simplex-Virus
i.p.	Intraperitoneal
IC_{50}	Inhibitionskonzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

kDa	Kilodalton
LTR	Long terminal repeat
M	Molar
mA	Milliampere
MDR	Multiple Drug Resistance
min	Minuten
MØ	Makrophagen
MP	Monophosphat
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Molekulargewicht
myc	Myelocytoblastoma
NMR	Kern Magnet Resonanz
OD	optische Dichte
p.a.	per Analysis
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH_e	Extrazellulärer pH-Wert
pH_i	Intrazellulärer pH-Wert
PNA	Peptide Nucleic Acid
Rb	Retinoblastom Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SPF	Specific pathogen free
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracetat
TK	Thymidinkinase
TP	Triphosphat
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen per Minute
V	Volt
VDZ	Verdopplungszeit

1 Einleitung

1.1 Krebs und seine Entstehung

Der Begriff „Krebs“ steht für maligne Tumore, die aufgrund abnormer Vergrößerungen eines Gewebes durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entstehen. Sie unterscheiden sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie die Fähigkeit zur Metastasenbildung [Varmus und Weinberg, 1994]. Des weiteren vermehren sie sich unabhängig von Wachstumsfaktoren, reagieren unempfindlich auf Wachstumsinhibitoren, entgehen der Apoptose und sind fähig, die Angiogenese aufrechtzuerhalten (Abb.1.1) [Hanahan und Weinberg, 2000].

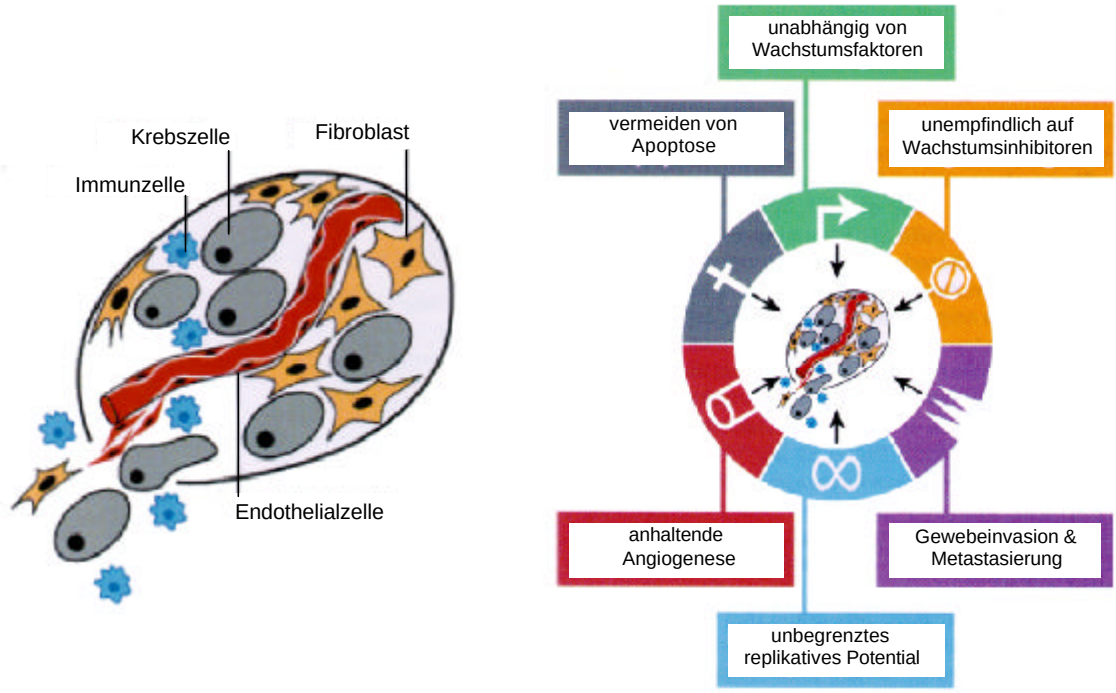


Abb. 1.1: Heterogenität des Tumorgewebes und die wichtigsten Eigenschaften von Tumoren [Hanahan und Weinberg, 2000]

Generell verlieren Krebszellen vielfach ihre gewebe- und organspezifischen Eigenschaften. Sie richten ihre Energie hauptsächlich auf ihre Proliferation und

nicht mehr darauf, die Funktionen von Geweben oder Organen aufrechtzuerhalten. Dieser Verlust von Differenzierungsmerkmalen kennzeichnet vor allem schnellwachsende, aggressive Tumore.
Die Klassifizierung der Tumore erfolgt nach den Geweben und Zelltypen ihrer Entstehung (Tabelle 1.1). So bezeichnet man Karzinome als Tumore, die aus Epithelzellen stammen, und Sarkome als die Tumore, die mesodermalen Ursprungs sind.

Tabelle 1.1: Einteilung der Tumortypen [aus Varmus und Weinberg, 1994]

Zelltyp	Gewebe	Tumor
Epithel	Brust (Milchsekretion)	Adenokarzinome (aus sekretorischem Gewebe)
	Leber	
	Haut	Plattenepithelkarzinome
	Schleimhäute	
Bindegewebe	Knorpel	Chondrosarkome
	Knochen	Osteosarkome
	Muskeln	Rhabdosarkome
	Blutgefäße	Angiosarkome
Blutbildendes System	Knochenmark, Milz	Lymphome, Myelome, Leukämien
Nerven	Zentralnervensystem	Gliome, Astrozytome, Medulloblastome

1.1.1 Karzinogenese

Zellen unterliegen einer strikten Kontrolle von Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Die Störung dieses Gleichgewichts kann die Entartung der Zelle zur Folge haben. Krebs kann aus jeder sich teilenden Zelle hervorgehen, wobei die Neoplasie meist von einer einzigen transformierten Zelle abstammt. Die Entwicklung einer gesunden Zelle zur Krebszelle verläuft in langsamen Schritten über einen Mehrstufenprozeß, bei dem die Anhäufung von Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen zur Ausbildung eines transformierten Phänotyps beiträgt [Weinberg, 1989].

Bei der Karzinogenese unterscheidet man zwischen der **Initialphas**e, d.h. der irreversiblen Transformation der Zellen durch die Aktivierung von Protoonkogenen, und der **Latenzphase**, dem malignen Wachstum der transformierten Zelle durch wiederholten Kontakt mit dem Karzinogen oder durch andere Faktoren. Im Laufe des Wachstums entstehen Mutationen und Differenzierungen, so dass im Tumor eine heterogene Zellpopulation erscheint. Zum Teil kann es in dieser Phase schon zur Metastasierung kommen. Bei der **Tumormanifestation** kommt es dann zu erkennbaren Ansammlungen transformierter Zellen mit starker Tendenz zu Wachstum und Metastasierung.

1.2 Ansätze zur Krebstherapie

Da die Erkrankung an Krebs in den Industrieländern mindestens ein Viertel der Bevölkerung umfasst, ist eine rechtzeitige Erkennung und eine wirksame Behandlung, durch Entfernen oder Zerstörung der Krebszellen, notwendig. Hierzu stehen bei der konventionellen Krebstherapie die Operation, die Bestrahlung und die Chemotherapie zur Verfügung. Bei molekular-therapeutischen Ansätzen hingegen werden folgende Strategien verfolgt: Tumorvakzination, Gen-Ersatz-Therapie, Antisense-Therapie, Medikamenten-Resistenzgen-Therapie und Suizidgen-Therapie. Im folgenden werden nun die oben genannten Krebstherapien näher erläutert.

1.2.1 Konventionelle Krebstherapie

Dreißig bis vierzig Prozent der soliden Tumore werden früh genug erkannt, um sie durch eine Operation, eine Behandlung mit Gammastrahlen, mit Protonen oder Neutronen, zu heilen.
Die **Operation** zur Behandlung von nicht-metastasierenden Tumoren ist die einzige Therapieform, bei der sich nachprüfen lässt, ob der Tumorherd inklusive

des invasiven Randsaums vollständig beseitigt wurde, da das entfernte Gewebe bei der pathologischen Überprüfung einen geschlossenen Kranz normaler Zellen zeigen sollte. Der entscheidende Nachteil ist jedoch, dass sehr großräumig gesundes Gewebe entfernt werden muss, um mikroskopische Ausläufer des Tumors zu erfassen. Bei einer **Strahlenbehandlung** im Bereich des Tumors, die meistens von außen, seltener durch lokales Einbringen winziger radioaktiver Strahlungsquellen in den Körper vorgenommen wird (Brachytherapie), werden den Zellen massive genetische Schäden zugefügt, die letal für die Zellen sind oder diese in die Apoptose treiben. Außer der Erhaltung normalen Gewebes hat die Strahlentherapie gegenüber dem chirurgischen Entfernen eines Tumors den Vorteil, dass die mikroskopischen Auswüchse um den Tumor mit erfasst werden [Hellmann und Vokes, 1996; de Vita et al., 1995].

Da die Strahlentherapie wie auch die chirurgische Entfernung des Tumors oft unzureichend sind, wird häufig die **Chemotherapie** in Kombination mit diesen Behandlungsformen eingesetzt. Im Gegensatz zur konventionellen, adjuvanten Chemotherapie, die nach vorausgegangener Bestrahlung bzw. Operation verabreicht wird, um eine Beseitigung überlebender Krebszellen innerhalb des Tumorherdes und vor allem von Metastasen zu gewährleisten, erfolgt die Induktions-Chemotherapie als einleitende Maßnahme zur nachfolgenden Bestrahlung. Mittels dieser Methode lassen sich systemische Mikrometastasen bereits früh behandeln. Bei diversen Formen der Leukämie und Lymphomen lassen sich auch Erfolge mit monochemotherapeutischen Maßnahmen erzielen [Tannock, 1998; de Vita et al., 1995]. Die meisten der derzeit systemisch oder lokal eingesetzten zytostatischen Medikamente oder Wirkstoffkombinationen sind Antimetabolite, die die DNA-Replikation stören (z.B. Methotrexat, 5-Fluorouracil, Gemcitabin). Weiterhin werden Topoisomerase-Hemmer (z.B. Doxorubicin, Etoposide), alkylierende Wirkstoffe (z.B. Cyclophosphamid, Chlorambucil) oder pflanzliche Alkaloide, die die Zellteilung verhindern (z.B. Vinblastin, Vinorelbin, Paclitaxel), eingesetzt [Tannock, 1998; Hellmann und Vokes, 1996]. Aufgrund ihrer proliferationshemmenden Eigenschaften zeigen

die meisten antineoplastischen Substanzen eine hämatotoxische Wirkung und sind daher nur eine begrenzte Zeit einsetzbar.
Ungeachtet der Wirkungsweise greifen die heute verfügbaren Chemotherapeutika die Krebszellen nicht sehr gezielt an. Da sie auch für gesundes Gewebe toxisch sind, insbesondere für schnell proliferierende Gewebe wie Knochenmark, Haarfolikel und die Schleimhaut von Mund, Rachen und Darm, ist die Chemotherapie mit starken Nebenwirkungen gekoppelt, was den Behandlungserfolg gefährdet. Die Wirksamkeit vieler antikanzerogener Stoffe wird eingeschränkt durch akute Dosis-limitierende Zytotoxizität, durch therapieinduzierte Spättoxizität und durch das Auftreten einer vererbten oder im Laufe der Behandlung erworbenen Medikamenten-Mehrfachresistenz (multiple drug resistance, MDR) von Tumorzellen. Trotz mancher Erfolge bei bestimmten Krebsarten ist die Gesamtbilanz der Chemotherapie als alleinige Therapie zum jetzigen Zeitpunkt nicht besonders günstig.

1.2.2 Gentherapie in der Onkologie

Der Begriff der Gentherapie umfasst ausschließlich die somatische Gentherapie, in der alle Verfahren mit dem Ziel zusammengefasst werden, Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms zu behandeln. Sämtliche Therapieansätze laufen darauf hinaus, ein therapeutisches Gen in die Zielzellen einzuschleusen, dort zur Expression zu bringen und damit eine veränderte Funktion der Zellen zu erreichen.
Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die effiziente und reproduzierbare Einschleusung und Expression eines gewünschten Gens in geeignete Zellen. Meist wird der **Gentransfer *ex vivo*** durchgeführt, bei dem die Zielzellen (z.B. Lymphozyten, hämatopoetische Stammzellen oder Leberzellen) aus dem Organismus isoliert, in Zellkultur mit dem gewünschten Gen transfiziert und schließlich in den Organismus reimplantiert werden. Für den *in vivo* Gentransfer werden zur Zeit virale und nicht-virale Gentransportrverfahren entwickelt. **Virale Transfermethoden** benutzen spezielle, genetisch modifizierte Viren (virale

Vektoren) als Transportvehikel für genetisches Material. Am häufigsten werden replikationsdefiziente Retro- und Adenoviren verwendet. Retrovirale Vektoren haben den Vorteil, dass sie das gewünschte Gen in das Genom von sich teilenden Zielzellen integrieren und damit zu einer stabilen Genexpression in Mutter- und Tochterzellen führen können. Im Gegensatz dazu können adenovirale Vektoren auch nicht-proliferierende Zielzellen effizient transfizieren. Das gewünschte Gen wird aber nicht in das Genom integriert, die Genexpression ist lediglich transient und wird durch eine antivirale Immunantwort zusätzlich limitiert. Eine transiente Genexpression kann auch mit einer Reihe von **nicht-viralen Transfermethoden** erreicht werden, wie zu Beispiel durch die direkte Injektion von nackter DNA, durch Liposomen oder durch einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer (Abb. 1.2).

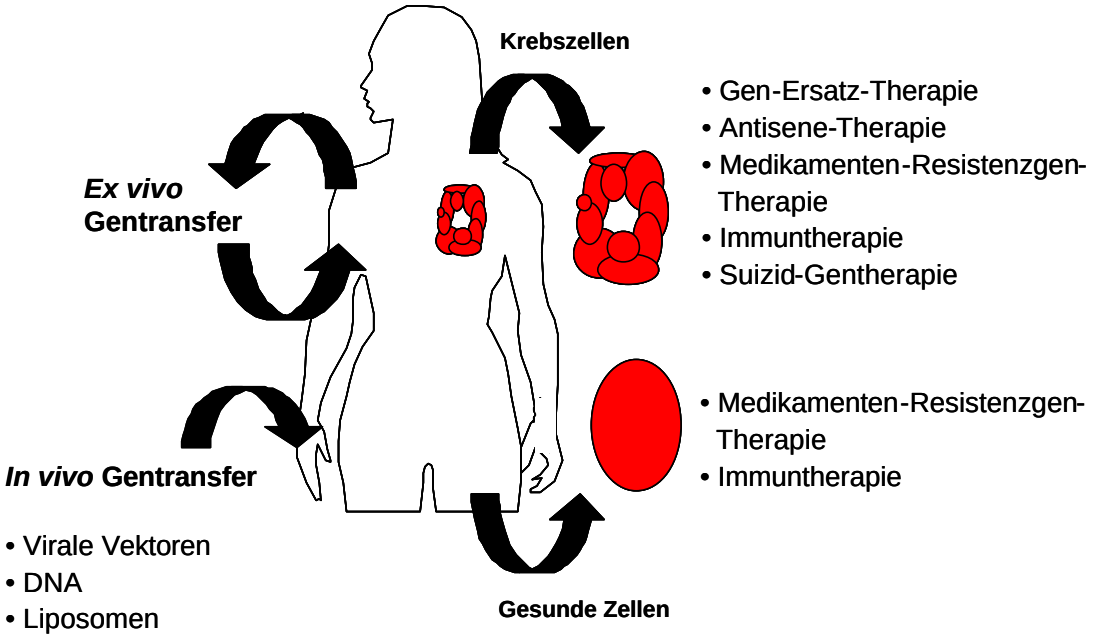


Abb. 1.2: Möglichkeiten der somatischen Gentherapie [in Anlehnung an: Huber, 1998]

Historisch gesehen war die Gentherapie zunächst auf die Korrektur erblicher Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. der Adenosin-Deaminase-Mangel-erkrankung (ADA), die Mukoviszidose oder die Glukocerebrosidase-Defizienz beschränkt, da der jeweilige genetische Defekt durch die Einführung einer normalen funktionsfähigen Kopie des krankheitsverursachenden Gens

möglicherweise zu korrigieren war. Mit der erfolgreichen Entwicklung retroviraler Vektoren gelang es erstmals, eine ausreichende Expression des ADA-Gens in murinen sowie in humanen Knochenmarkszellen zu erreichen, woraufhin das erste humane Gentherapie-Experiment an einem 4 Jahre alten Kind mit ADA-Mangel durchgeführt wurde [Blaese et al., 1990].
Mittlerweile beschränkt sich die Gentherapie nicht nur auf den Ausgleich genetischer Defekte, sondern verfolgt noch weitere Ansätze.

1.2.2.1 Gen-Ersatz-Therapie

Die Gen-Ersatz-Therapie (Gene-replacement-therapy) zielt auf die Verhinderung einer Onkogenexpression durch den Austausch von deletierten oder mutierten Tumorsuppressorgenen (*p53, Rb*) [Fujiwara et al, 1994; Huang et al, 1988] oder von bestimmten Onkogenen (Abb. 1.3).

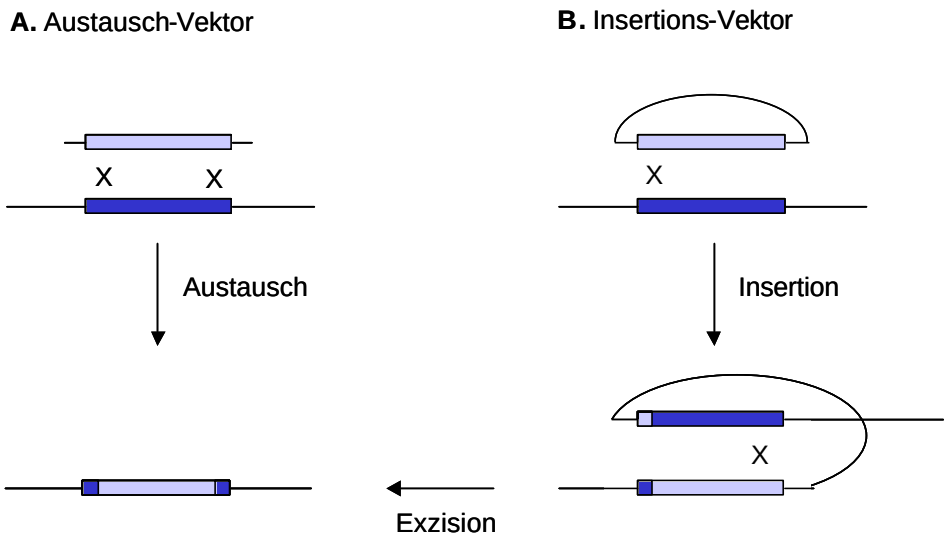


Abb. 1.3: Darstellung der Austausch- und Insertions-Vektoren für eine Gen-Ersatz-Therapie
— nicht-homologe chromosomale und Vektor DNA
▬ homologe Region im Chromosom
▭ homologe Region im Vektor
X Position des Austausches während der Rekombination

1.2.2.2 Antisense-Therapie

Die Antisense-Therapie ist eine sequenzspezifische Therapie, bei der mittels der Hybridisierung von Antisense-Oligonukleotiden die Transkription und/oder Translation dominanter Onkogene verhindert wird (Abb. 1.4), und es folglich zur Inhibition von Proteinen kommt, die für das Überleben der Tumorzellen essentiell sind (z.B. *myc*) [Nielsen, 1999; Scanlon et al., 1995].

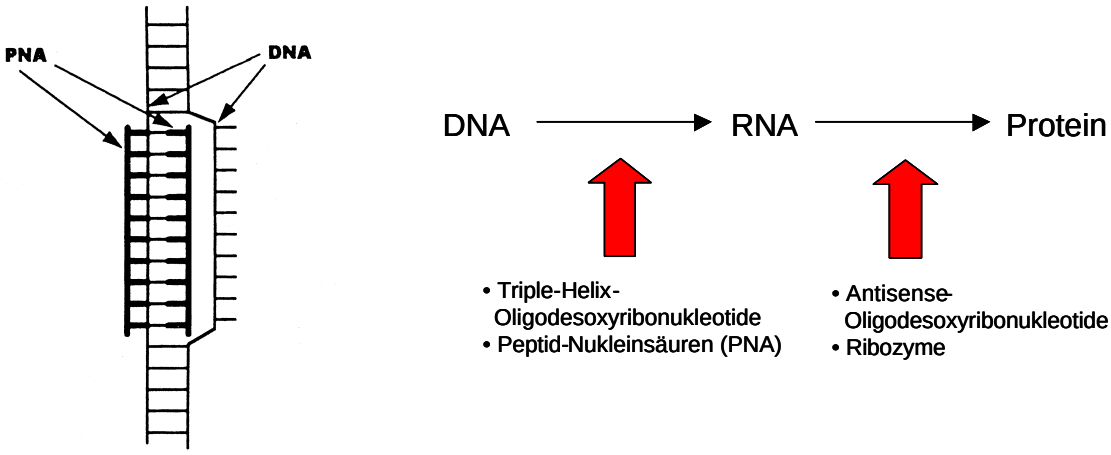


Abb. 1.4: Die Antisense Gentherapie kann entweder auf der Ebene der Gentranskription durch Triple-Helix bildende Oligonukleotide oder Peptide Nucleic Acids (PNA, Peptid-Nukleinsäure) erfolgen oder auf der Translationsebene durch Antisense-Oligonukleotide oder Ribozyme.

1.2.2.3 Tumorvakzination

Die Immunabwehr von Tumorzellen kann durch das Einschleusen von immunstimulatorischen Zytokingenen, wie zum Beispiel Interleukin-1? (IL-1?), IL-2 und IL-4, erhöht werden [Krauss et al., 1998]. Dazu werden Tumorzellen aus dem Patienten isoliert, in Kultur mit immunstimulierenden Genen transfiziert und dann dem Patienten subkutan reinjiziert. Tumorvakzinationsstudien werden vor allem bei Melanom, Kolonkarzinom und Nierenzellkarzinom durchgeführt.

Des weiteren können tumorinfiltrierende T-Lymphozyten *in vitro* genetisch so verändert werden, dass sie tumorzerstörende Faktoren, wie zum Beispiel Tumor-Nekrose Faktor-? (TNF-?), sezernieren [Hwu et al., 1993].

1.2.2.4 Medikamenten-Resistenzgen-Therapie

Der Transfer des Multi-Drug-Resistenz-1 Gens (*MDR-1*) in hämatopoetische Stammzellen verleiht diesen Zellen eine Resistenz gegenüber einer nachfolgenden Hochdosis Chemotherapie [Licht et al., 1995]. Dies erlaubt den Einsatz höherer Dosen von Chemotherapeutika zur effektiveren Tumorbekämpfung. Ein anderer Ansatz dieser Therapieform verfolgt die Abschaltung von Drug-Resistenz-Genen in Tumorzellen zur vorübergehenden Erhöhung der Chemosensitivität dieser Zellen.

1.2.2.5 Suizidgen-Therapie

Die meisten konventionell eingesetzten Chemotherapeutika verursachen beträchtliche Nebenwirkungen im Normalgewebe. Die Identifizierung von antimikrobiellen und antiviralen Enzymen, die normalerweise nicht in tierischen Zellen vorkommen, könnte es ermöglichen, die Ursachen für die hohen Nebenwirkungen einer Chemotherapie herabzusetzen. Diese Enzyme sind in der Lage nicht oder wenig toxische Medikamentenvorläufer (Pro-Drugs) in toxische Stoffwechselprodukte zu konvertieren. Nach der gentechnischen Veränderung der Tumorzelle mit den Suizidgenen und der Verabreichung einer Pro-Drug kann im Tumor das toxische Stoffwechselprodukt hergestellt werden, was zum Tod der Zelle führt (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Übersicht häufig eingesetzter Suizidgene

Enzym	Herkunft	Pro-Drug	Drug	Bystander Effekt	Referenz
Cytosin Deaminase (CD)	E. coli oder Saccharomyces	5-Fluorocytosin	5-Fluorouracil	Ja, Diffusion	Mullen et al., 1992 Austin & Huber, 1993
Thymidinkinase (HSV-TK)	Herpes simplex Virus-I	Ganciclovir	Ganciclovir-Monophosphat	Ja, Gap-junctions	Moolten, 1986 Culver et al., 1992 Chen et al., 1994
Guanosin-Xanthine-Phosphoribosyl-Transferase	E. coli	6-Thioxanthine (6-TX), 6-Thioguanin (6-TG)	6-TX- oder 6-TG-Monophosphat	?	Tamiya et al., 1996 Ono et al., 1997
Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP)	E. coli	6-Methylpurin-2-desoxy-ribosid	6-Methylpurin	Ja, Diffusion	Sorcher et al., 1994 Hughes et al., 1995
Thymidinkinase (VZV-TK)	Varizella Zoster Virus	Ara-M, BVDU	Ara-ATP, BVDU-Triphosphat	Ja, (?)	Huber et al., 1991 Grignet-Debrus et al., 1997

1.3 Eigenschaften der Suizidgene Thymidinkinase und Cytosin Deaminase

1.3.1 Herpes simplex Virus I Thymidinkinase

Eines der am besten untersuchten Suizidgene ist das *Herpes simplex* Virus Typ-I Thymidinkinase-Gen (HSV-1 TK). Die humane sowie die virale Thymidinkinase katalysieren die Phosphorylierung von Thymidin. Dieser Wiedergewinnungsprozess („salvage pathway“) ist ein Teil der DNA-Synthese, welches es den Zellen ermöglicht, Thymidin zurückzugewinnen. Des weiteren ist HSV-1 TK in der Lage, die nicht toxischen antiviralen Nukleosid-analoga Ganciclovir (GCV) und Acyclovir (ACV) in Nukleotid Monophosphat Derivate (GCV-MP und ACV-MP) umzuwandeln. Diese GCV- und ACV-Monophosphate werden durch endogene zelluläre Kinasen in die entsprechenden Di- und Triphosphate unter ATP-Verbrauch katalysiert (Abb. 1.5) [Miller und Miller, 1982; Miller und Miller, 1980]. Die Triphosphate von ACV und GCV wirken stark toxisch auf proliferierende Zellen. ACV-Triphosphate (ACV-TP) bewirken nach Einbau in die DNA einen Kettenabbruch aufgrund ihrer

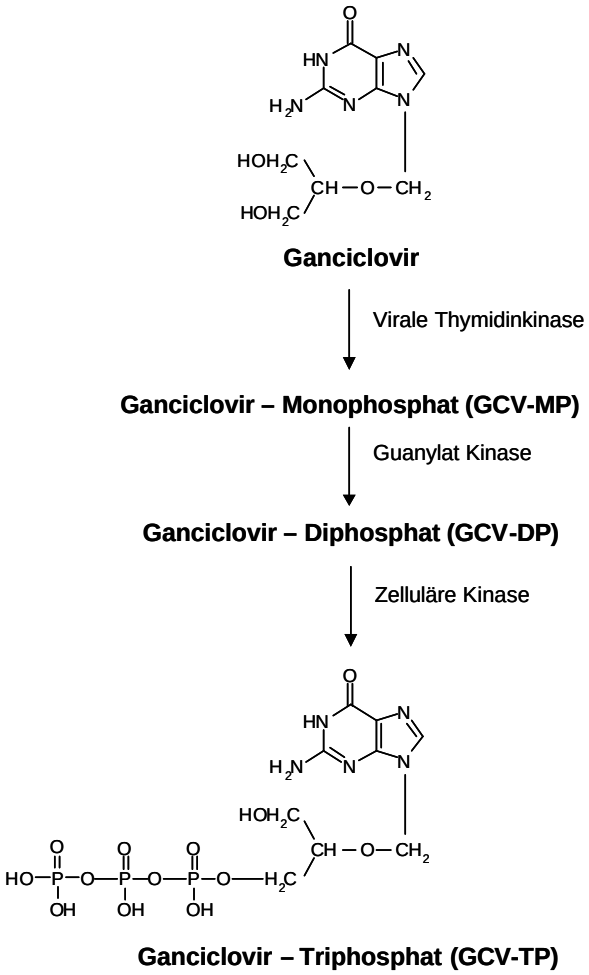
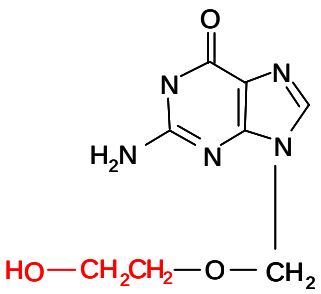


Abb 1.5: Metabolisierung von Ganciclovir durch die HSV-1 Thymidinkinase und durch zelluläre Kinasen bis zum zytotoxischen Ganciclovir-Triphosphat [nach Faulds und Heel, 1990]

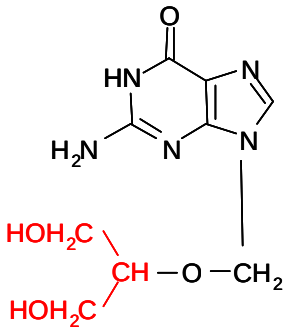
fehlenden terminalen 3´-OH Gruppe (Abb. 1.6) [Reardon and Spector, 1989; Elion, 1980]. Auf der anderen Seite besitzen GCV-Triphosphate (GCV-TP) eine terminale OH-Gruppe, was die kontinuierliche Elongation der DNA zur Folge hat (Abb. 1.6). Die Inkorporation dieser falschen Guanosin Nukleotide (GCV-TP) führt zu Basenfehlpaarung („base-pair mismatch“), DNA-Fragmentierung, Schwesterchromatidenaustausch und schließlich zur letalen genomischen Instabilität [Haynes et al. 1996; Thurst et al., 1996; Hamzeh und Lietman, 1991]. Ferner wirken ACV-TP und GCV-TP als Inhibitoren der zellulären DNA-Polymerase, wodurch die DNA-Synthese blockiert wird [Ilsley et al., 1995]. Die Vorteile von GCV liegen in der längeren Halbwertszeit von GCV-TP ($t_{½}$ = 16,5 h) im Vergleich zu ACV-TP ($t_{½}$ = 1 - 4 h) [Biron et al., 1985; Elion et al., 1983] und dem kleineren K_m Wert von GCV (45-66 µM) als der von ACV (426 µM) für die HSV-Thymidinkinase [Gambir et al., 1999]. Des weiteren ist Ganciclovir effektiver und weniger toxisch als Acyclovir.



Acyclovir

$t_{½}$ = 1 - 4 h

K_m = 426 µM



Ganciclovir

$t_{½}$ = 16,5 h

K_m = 45-66 µM

Abb.1.6: Strukturformel, Halbwertszeit und K_m-Wert der beiden Pro-Drugs Acyclovir und Ganciclovir

1.3.2 Escherichia coli Cytosin Deaminase

Die Cytosin Deaminase (CD) ist ein Enzym, welches in Bakterien und Pilzen exprimiert wird, aber in tierischen Zellen nicht vorkommt. Es katalysiert die Deaminierung von Cytosin zu Uracil [Danielsen et al., 1992; Andersen et al., 1989; Kilstrup et al., 1989]. Das Antimycotikum 5-Fluorocytosin (5-FC) wird durch die CD deaminiert, und es entsteht die antineoplastische Substanz 5-Fluorouracil (5-FU) [Polak und Scholer, 1975], welche Bestandteil vieler Chemotherapeutika ist. In Kombination mit Bestrahlung wird 5-FU als Strahlensensibilisator zur Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt. 5-FU wird anschließend durch zelluläre Enzyme zu 5-Fluorouridin-5´-triphosphat (5-FdUTP) und 5-Fluoro-2´-desoxyuridin-5´-monophosphat (FdUMP) metabolisiert, wodurch das Enzym Thymidylat-Synthase inhibiert wird, was zur Blockierung der DNA, RNA und Protein-Synthese führt (Abb. 1.7).

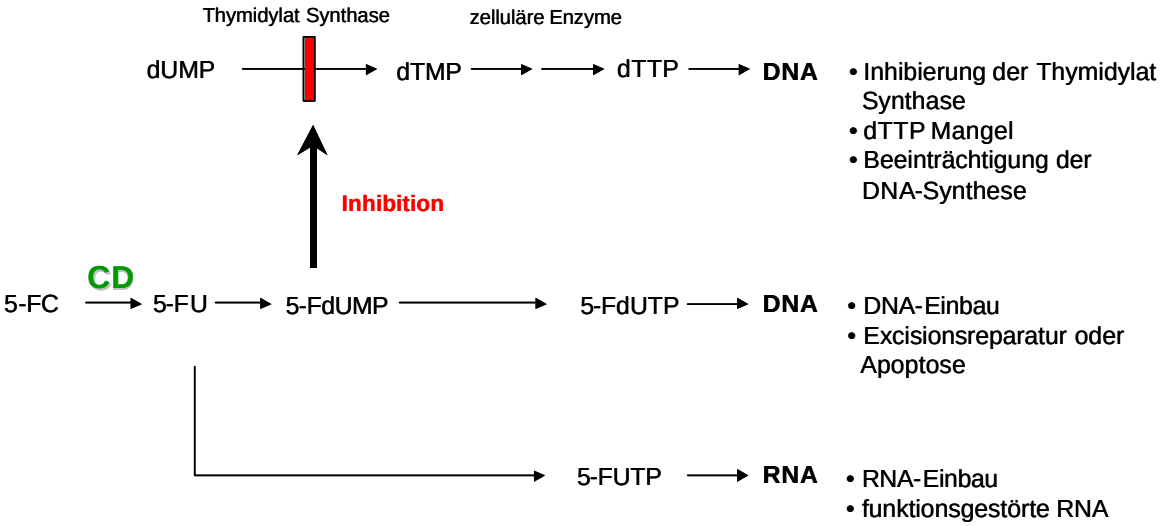


Abb.1.7: Metabolismus von 5-Fluorocytosin in Cytosin Deaminase (CD) exprimierenden Tumorzellen [nach Calabresi und Chabner, 1995].

5-FC	: 5-Fluorocytosin	MP	: - monophosphat
5-FU	: 5-Fluorouracil	TP	: - triphosphat
FdUMP	: 5-Fluoro-2´-desoxyuridin-5´-MP	dUMP	: 2´-Desoxyuridin-5´-MP
FdUTP	: 5-Fluoro-2´-desoxyuridin-5´-TP	dTMP	: 2´-Desoxythymidin-5´-MP
FUTP	: 5-Fluoro-2´-oxyuridin-5´-TP	dTTP	: 2´-Desoxythymidin-5´-TP

1.4 Voraussetzungen für eine Suizidgen-Therapie

Um eine erfolgreiche Suizidgen-Behandlung durchführen zu können, muss gewährleistet sein, dass die eingesetzten Medikamentenvorstufen (Pro-Drugs) in die Zellen eingeschleust werden können und die entstehenden Drugs die umliegenden Zellen erreichen. Voraussetzungen hierfür sind ein entsprechendes Tumormilieu und eine ausreichende Anzahl an Gap-junctions.

1.4.1 Tumor pH-Wert

Die Aufnahme chemotherapeutischer Medikamente ist vom pH-Wert des Tumors abhängig. Im Tumor liegt ein pH-Gradient vor, welcher den Transport der Therapeutika, sei er aktiv oder passiv, beeinflusst. Die Toxizität chemotherapeutischer Medikamente ist sowohl vom intrazellulären pH_i-Wert als auch vom extrazellulären pH_e-Wert abhängig. Vergleicht man die extrazelluläre H^+-Konzentration von Tumoren mit Normalgeweben, so findet man im Tumorgewebe eine höhere H^+-Konzentration (pH_e 6,8) als im Normalgewebe (pH_e 7,4). Messungen des intrazellulären pH-Wertes zeigen, dass sowohl das Tumor- als auch das Normalgewebe einen neutralen pH-Wert von 7,2 besitzen [Gerweck, 1998]. Die durchschnittliche Differenz zwischen pH_e und pH_i ist ungefähr +0,2 pH-Einheiten im Normalgewebe und -0,2 bis -0,6 pH-Einheiten im Tumorgewebe ($\Delta pH = pH_e - pH_i$) [Gerweck, 1998]. Dies bedeutet, dass der pH-Gradient vom Interstitium zum Tumor ($pH_i > pH_e$) umgekehrt zu dem vom Interstitium zum Normalgewebe ($pH_i < pH_e$) ist [Stubbs, 1998].
Die Tumor Retention von Chemotherapeutika ist abhängig vom ?pH. Steigt der pH_i oder fällt der pH_e, so steigt die Konzentration z.B. von 5-FU innerhalb der Zellen von soliden Tumoren (Abb. 1.8) [Stubbs et al., 2000].

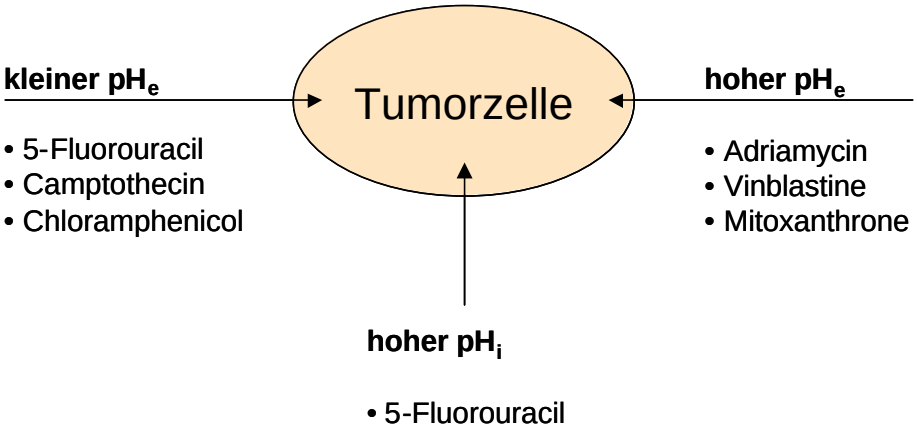


Abb.1.8: Modulation des Tumor pH-Wertes (Erhöhung oder Senkung), der zur Erhöhung der Aufnahme der oben gezeigten chemotherapeutischen Medikamente notwendig ist [Stubbs et al., 2000].

1.4.2 Bystander-Effekte

Bei der Transfektion eines bestehenden Tumors mit einem Suizidgen können nicht alle Zellen innerhalb des Tumorverbandes erreicht werden. Um eine erfolgreiche Therapie zu gewährleisten, müssen aber auch die umliegenden nicht transfizierten Zellen mit toxischen Metaboliten versorgt werden. Dies wird durch den sogenannten **Lokalen-Bystander-Effekt** erreicht, bei dem die toxischen Substanzen entweder über den Weg der Gap-junctions an die nicht suizidgen-tragende Zelle weitergegeben werden oder die entstehenden Metabolite sich über den Weg der freien Diffusion im Tumor verteilen können.
5-Fluorouracil (5-FU) passiert die Cytoplasmamembran und erreicht das umliegende Gewebe über den Weg der freien Diffusion. Es ist kein spezieller Mechanismus notwendig, die aktivierte Pro-Drug im Gewebe zu verteilen. Gancilclovir-Triphosphat, ein geladenes Molekül, ist nicht in der Lage, die Zellen über den Diffusionsweg zu verlassen. Es benötigt vielmehr spezielle Kanäle, wie die Gap-junctions, um in eine Nachbarzelle zu gelangen (Abb. 1.9).

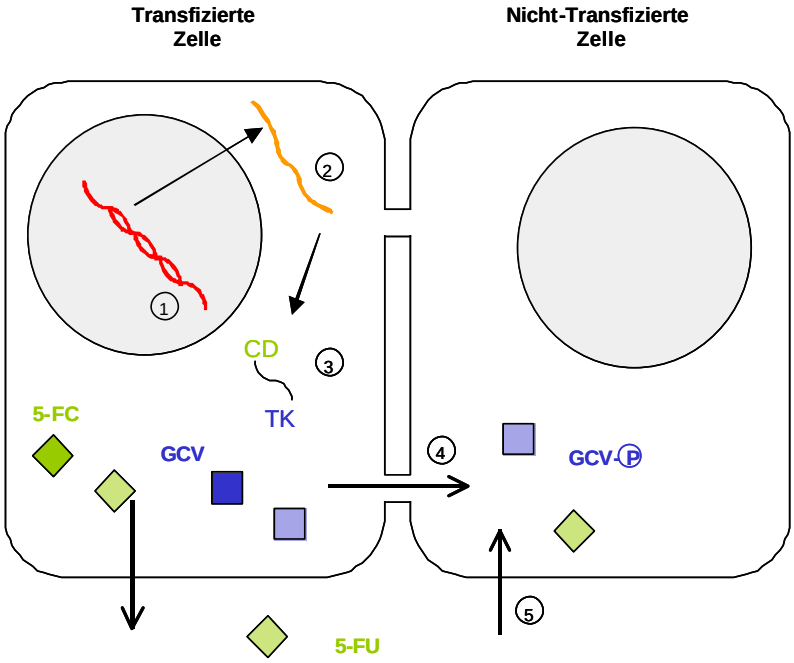


Abb.1.9: Bystander-Effekt: Die suizidgentragende Zelle **(1)** transkribiert eine Suizidgen mRNA **(2)**, woraus das Fusionsprotein Cytosin Deaminase/Thymidinkinase translatiert wird **(3)**. Dieses katalysiert dann die Umsetzung von 5-FC in 5-FU und GCV in GCV-Ⓟ. GCV-Ⓟ wird über die Gap-junctions **(4)** in die nicht suizidgen-tragende Zelle transportiert. 5-FU passiert die Cytoplasmamembran und erreicht die nicht transfizierte Zelle über den Weg der freien Diffusion **(5)**.

Zusätzlich zum Lokalen-Bystander-Effekt gibt es noch einen **Distalen-Bystander-Effekt**, der über das Immunsystem vermittelt wird (Abb. 1.10). Histologische Untersuchungen von Tumoren unter einer Pro-Drug Therapie zeigen eine inflammatorische Infiltration von Makrophagen und T-Zellen. Hierdurch kann es zur Aktivierung eines immunologischen Gedächtnisses kommen, welches zu einem späteren Zeitpunkt Tumorabsiedlungen erkennt. Die Infiltration von NK-Zellen kann zu einem direkten Erkennen und Bekämpfen von Tumorabsiedlungen führen.

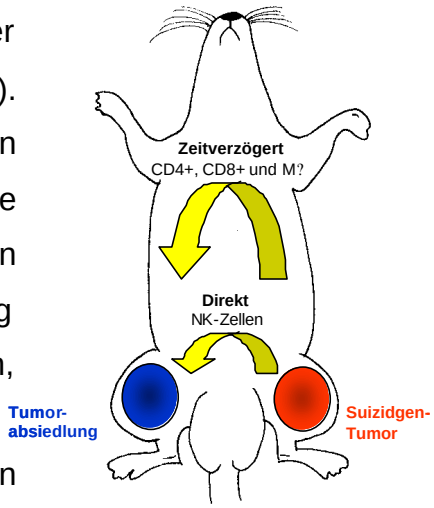


Abb. 1.10: Distaler-Bystander-Effekt

1.4.3 Aufbau der Gap-junctions

Gap-junctions sind Cluster von interzellulären Kanälen zwischen benachbarten Zellen. Der molekulare Transport durch den Kanal ist relativ unspezifisch und erfolgt mittels passiver Diffusion, was ihn von anderen Membrankanälen unterscheidet.

Gap-junctions werden aus Connexonen gebildet, welche aus 6 hexagonal angeordneten Connexin-Molekülen bestehen, die einen Kanal mit einem Durchmesser von ~1,5 nm formen. Dieser erlaubt den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen (< 1 kDa) zwischen benachbarten Zellen ohne die Involvierung des extrazellulären Raums. Zur Zeit sind 13 Connexin-Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Gewebespezifität bekannt [Kumar und Gilula, 1996]. Aufgrund unterschiedlicher Connexin-Moleküle und deren Kombinationsmöglichkeiten können die Kanäle durch verschiedenartige Connexone gebildet werden (Abb. 1.11). Dies verleiht den Kanälen eine unterschiedliche Permeabilität und erlaubt somit eine Diskriminierung der zu transportierenden Moleküle.

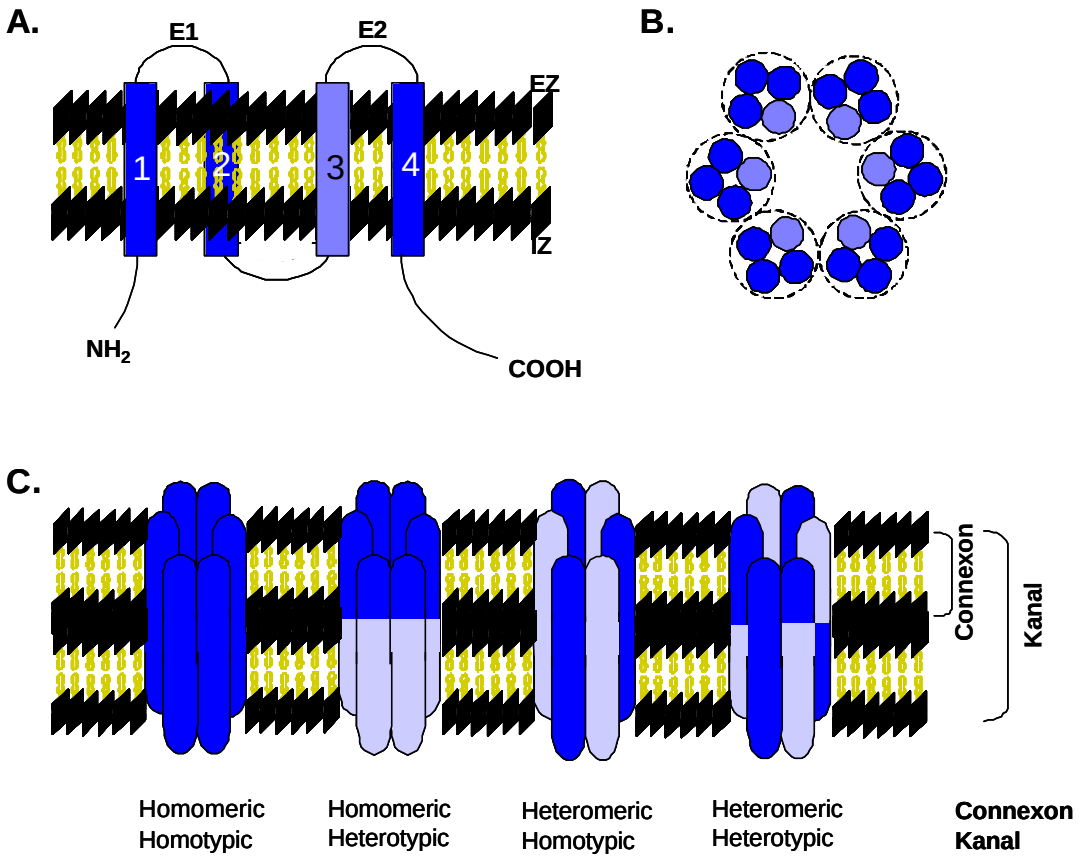


Abb.1.11: Connexin, Connexon und Gap-junctions: **(A.)** Transmembran Topologie des Connexins. Das Protein durchzieht die Membran viermal, mit zwei kleinen extrazellulären Bereichen (E1 und E2). Der N- und C-Terminus sind im intrazellulären Raum lokalisiert. Die dritte transmembrane Region ist reich an hydrophoben Aminosäuren und kleidet den Innenraum des Kanals aus **(B.)**. Die vier transmembranen Bereiche und die extrazellulären Loops sind hochkonservierte Bereiche zwischen den Connexinen, wohingegen der intrazelluläre zytoplasmatische Bereich variiert. **(C.)** Homomeric versus Heteromeric Connexons: Zellen exprimieren viele unterschiedliche Connexine gleichzeitig, somit kann das Connexon entweder aus einem Typ von Connexinproteinen gebildet werden (homomeric Connexon) oder aber aus unterschiedlichen (heteromeric Connexon). Homotype versus Heterotype Kanäle: Die beiden Connexone, welche einen funktionsfähigen Kanal formen, können entweder identisch (homotyper Kanal) oder aber verschieden (heterotyper Kanal) sein. Die Komplexität und Flexibilität könnten die Voraussetzungen sein für die Regulierung der unterschiedlichen Moleküle, die den Kanal passieren wollen [nach Li und Herlyn, 2000; Kumar und Gilula, 1996].

1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Dissertation sollten die Vor- und Nachteile einer Suizidgen-Therapie mit zwei verschiedenen Suizidgenen, Cytosin Deaminase und Thymidinkinase, analysiert werden. Dabei sollten folgende Punkte untersucht werden:

Die Etablierung eines *in vivo* Tumormodells mit genetisch veränderten Zelllinien (AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK) auf Copenhagen Ratten

Die Wirkung der Pro-Drugs 5-Fluorocytosin und Ganciclovir als Einzelgabe und als Kombinationsgabe auf das Tumorwachstum und die lokale Tumorkontrolle

Der Einfluss der Suizidgen-transduzierten Tumorzellen auf nicht-suizidgen-tragende Tumorzellen unter einer Pro-Drug Therapie im Hinblick auf Tumorwachstum und Tumorkontrolle (Lokaler-Bystander-Effekt)

Die Voraussetzungen für einen Bystander-Effekt:

A: Ausbildung von Gap-junctions in unterschiedlichen Tumoren zum Transport des phosphorylierten Ganciclovirs

B: Untersuchungen zum Stoffwechselweg des 5-Fluorocytosins und Bestimmung der Konzentration des gebildeten 5-Fluorouracils *in vitro*

Immunhistologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Induktion eines Distalen-Bystander-Effektes unter einer Suizidgen-Therapie

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

AT-1 (Ratten Prostata-Adenokarzinom)

Das Dunning-Ratten-Prostatakarzinom R3327 AT-1 geht auf einen Spontantumor zurück, den W.F. Dunning 1961 (University of Florida) aus der Prostata einer 22 Monate alten männlichen Copenhagen Ratte entnahm [Dunning, 1963] (s. Kapitel 2.4.2).

Da das Tumormodell sowohl in der Zellkultur als auch im Tier etabliert ist, ermöglicht dies sowohl *in vitro* Untersuchungen als auch syngene tierexperimentelle Studien am gleichen Modell.

Medium: RPMI + 10% FCS + 2 mM Glutamin

Herkunft: Dr. J.T. Isaacs, Baltimore, USA

AT-1/CDglyTK Zellen

AT-1 Zellen wurden retroviral mit dem bifunktionalen Fusionsgen pWZLneoCDglyTK (Abb. 2.1) transduziert [(beschrieben in) Rogulski et al, 1997]. Die Selektion der CDglyTK$^+$ Zellen erfolgte mit dem Antibiotikum Geneticin (G418, 500 µg/mL).

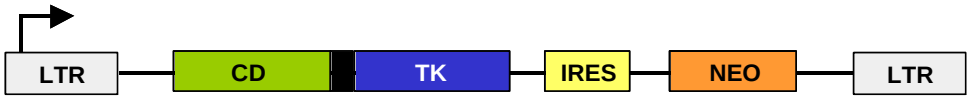


Abb. 2.1.: Bifunktionales Fusionsgen pWZLneoCDglyTK. Gezeigt sind die LTRs des Moloney murine leukemia Viruses (⚀), das Fusiongen bestehend aus Cytosin Deaminase (CD) (■), gekoppelt an die Thymidinkinase (TK) (■) über einen Glycin-Spacer (■), dem sich die „internal ribosome entry site“ (IRES) (□) und das Neomycin-Resistenzgen (■) anschließen.

AT-1/GFP Zellen

AT-1 Zellen wurden mit dem pEGFP-Plasmid von Clontech (Abb. 2.2) mittels Lipofektin (Gibco), nach Vorschrift des Herstellers, transfiziert. Die Selektion der AT-1/GFP^{+} Zellen erfolgte mit Geneticin (G418, 500 µg/mL).

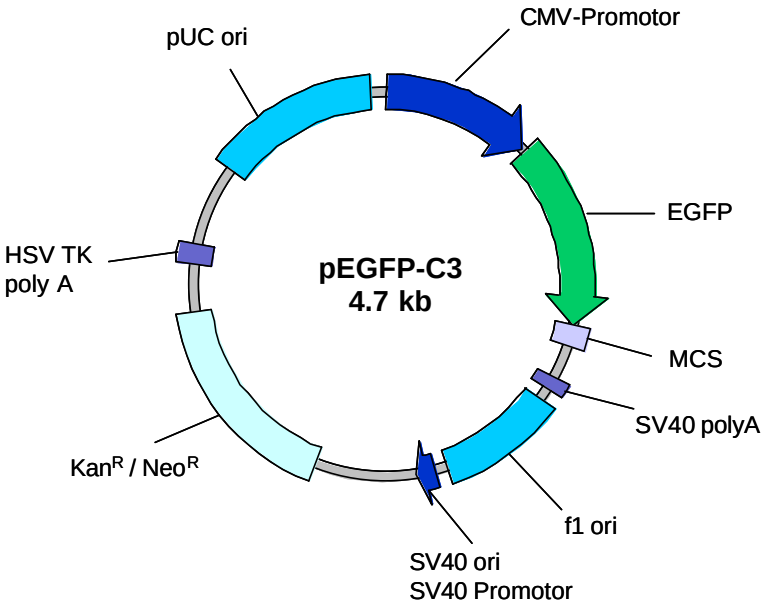


Abb. 2.2: pEGFP-C3 Plasmid (nach Clontech)

2.1.2 Lösungen und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in per Analysis (p.A.) Qualität eingesetzt.

	Ansatz	Endkonzentration
Acryl-/Bisacrylamid (30/0,8)	150 g Acrylamid (Sigma) 4 g Bisacrylamid (Sigma) 500 mL Aqua bidest. filtrieren, Dunkel, 4°C	30,0 % 0,8 %
Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen (Moviol)	10 g Moviol (Sigma) in 303 mg Tris (Merck) 50 mL Aqua bidest. ü.N. rühren 12 g Glycerin (Riedel-de Ha?n) 2 g DABCO (Sigma) 100 mg Natriumazid (Sigma) hinzufügen, 1h rühren, pH auf 8,2 einstellen 30 min mit 4000 Upm zentrifugieren, in Plastik-Pasteurpipetten aliquotieren, verschließen und bei –20°C lagern	
1x Elektrodenpuffer	3,0 g Tris (Sigma) 14,0 g Glycin (Merck) 1,0 g SDS (Serva) 1000 mL Aqua bidest. pH 8,8	25,0 mM 192,0 mM 0,1 %
Fast Red Färbelösung (kurz vor jeder Färbung frisch ansetzen)	12,5 mL 0,2 M Tris-Maleinsäure 3,5 mL 1M NaOH (Merck) 12,0 mg Levamisol (Sigma) 50,0 mL Aqua bidest. pH 7.9 - 8.1 10,0 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Sigma) in 0,5 mL Dimethylformamid (Sigma) lösen dieses tropfenweise in 49 mL des obigen Puffers geben 40 mg Fast Red (Sigma) in 1mL Puffer lösen beide Lösungen vereinigen und in eine Standküvette abfiltrieren	

	Ansatz	Endkonzentration
Kontinuierlicher Transfer-Puffer nach Bjerrum & Schafer-Nielsen	5,8 g Tris (Sigma) 2,9 g Glycin (Merck) 0,375 g SDS (Serva) 200 mL Methanol (Riedel-de Ha?n) 1000 mL Aqua bidest.	48,0 mM 39,0 mM 0,0375 % 20,0 %
1x PBS	8,00 g NaCl (Merck) 0,20 g KCl (Merck) 1,42 g Na_2HPO_4 (Merck) 0,27 g KH_2PO_4 (Merck) 1000 mL Aqua bidest. pH 7,4 mit HCl (Riedel-de Ha?n)	137,0 mM 2,7 mM 10,0 mM 2,0 mM
10x PBS	80,0 g NaCl (Merck) 2,0 g KCl (Merck) 14,2 g Na_2HPO_4 (Merck) 2,7 g KH_2PO_4 (Merck) 1000 mL Aqua bidest. pH 7,4 mit HCl (Riedel-de Ha?n)	1,37 M 27,0 mM 100,0 mM 20,0 mM
2x Probenpuffer	3 g Tris (Sigam) 20 g Glycerin (Riedel-deHa?n) 4 g SDS (Serva) 74 mg EDTA (Merck) 620 mg DDT (Sigma) 100 mg Bromphenolblau (Merck) 100 mL Aqua bidest. pH 6,8 vor Gebrauch: 950 µL 2x Probenpuffer + 50 µL ?-Mercaptoethanol (Merck)	250 mM 20 % 4 % 2 mM 40 mM 0,1 % 5 %
Speichermedium	25,7 g Saccharose (Merck) 0,4 g $MgCl_2$ * 6 H_2O Merck) 150 mL 1x PBS 150 mL Glycerin (Riedel-de Ha?n), wasserfrei zufügen bei –20°C aufbewahren	
1x TBS	8,0 g NaCl (Merck) 0,2 g KCl (Merck) 2,0 g Tris (Sigma) 1000 mL Aqua bidest. pH 7,4 mit HCl (Riedel-de Ha?n)	137,0 mM 2,7 mM 16,5 mM

	Ansatz	Endkonzentration
10x TBS	80,0 g NaCl (Merck) 2,0 g KCl (Merck) 20,0 g Tris (Sigma) 1000 mL Aqua bidest. pH 7,4 mit HCl (Riedel-de Ha?n)	1,37 M 27,0 mM 165,0 mM
Tris-Maleinsäure Puffer	6,06 g Tris (Sigma) 5,80 g Maleinsäure (Merck) 250 mL Aqua bidest.	0,2 M 0,2 M
0,5%-ige Trypanblau-Lösung	0,5 g Trypanblaufarbstoff (Merck) 0,9 g NaCl (Merck) 100 mL Aqua bidest.	0,5 % 0,9 %

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
96-Napf Platten	Falcon
Deckgläser 24 x 36, 24 x 46	R. Langenbrinck
Dia-Film	AGFA
ECL Hyperfilm MP (Röntgenfilm)	Amersham Pharmacia
Einmal-Pipetten 1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 25mL	Falcon
Einmal-Spritzen 1mL, 5mL, 10mL, 25mL	Becton Dickinson
Filterpapier GB004	Schleicher & Schuell
Injektionskanülen	Becton Dickinson
Nitrozellulosemembran	Amersham Pharmacia
Objektträger 76 x 26	R. Langenbrinck
Pipettenspitzen (blau, gelb, weiß)	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,5mL, 1mL (Polypropylen)	Eppendorf
Reaktionsgefäße 12mL, 50mL (Polypropylen)	Falcon
Reaktionsgefäße 5mL, 10mL (Polypropylen)	Greiner
Sterilfilter Milex-GS 0,22µm, 0,45 µm	Millipore
Zellkulturflaschen T24, T75, 175	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner

2.1.4 Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage 2001MP	Sartorius
Blot-Apparatur semi-dry	Pharmacia
Brutschrank	Forma Scientific
Coulter counter ZM	Coulter Electronics
Elektrophorese Apparatur	Biometra
ELISA-Reader	BioRad
Eppendorfpipetten 0-10µL, 20-100µL, 100-1000µL	Eppendorf
Fireboy eco	Tecnomara
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Leica
Kleinbildkamera	Nikon
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph
Mikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon
Mikroskop Olympus CK2	Olympus
Neubauerzählkammer	Supe-Rior
pH Meter Toledo 320	Mettler
Power Supply	Biometra
Reinstwasser System MilliQ	Millipore
Schlittenmikrotom	Reichert Und Jung
Sterilwerkbank	Baker
Taumler	Heidolph
Thermoblock TB!	Biometra
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments
Trockenschrank	Heraeus
Ultraschallbad Sonorex RK31	Bandelin Electronic
Vakuumkonzentrationszentrifuge RVC2-18	Christ
Vortex	Ika-Labortechnik
Waage bis 2,5 kg	Sartorius
Wasserbad für Paraffinschnitte	Medax
Wasserbad MS/2	Lauda
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Es lassen sich zwei Kategorien von Zelllinien unterscheiden: adhärente, das heißt in Monolayer wachsende Zellen, welche sich an die Oberfläche der Kulturflasche anheften, und nicht adhärente Zellen, die als Suspensionen im Medium vorliegen. Haben Kulturen adhärenter Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet, so müssen die Adhäsionsproteine, die die Zellen an die Unterlage und auch untereinander binden, durch Zugabe von Trypsin/EDTA gelöst werden. Das Resultat ist eine Zellsuspension, die aufgeteilt und mit frischem Medium versetzt wird. Bei einer Suspensionskultur entfällt der Schritt der Trypsinierung.

Reagenzien:

Alle Reagenzien werden auf 37°C erwärmt.

Hank´s (Sigma)
Medium: RPMI (Sigma) + 10 % FCS (Sigma) + 2 mM Glutamin (Sigma)
Trypsin/EDTA (Sigma)

Durchführung

1. Adhärente Zellen

Das Medium von den Zellen abziehen und
die Zellen mit 5 mL Hank´s waschen.
1 mL Trypsin/EDTA auf die Zellen geben und diese dann
2-5 min bei 37°C inkubieren.
9 mL Medium zugeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren resuspendieren und vereinzeln.
$1*10^5$ Zellen in eine frische 75 cm^2 große Kulturflasche geben und 15 mL frisches Medium hinzufügen.
Die Zellen werden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert.

2. Suspensionszellen

Die Zellsuspension 5 min mit 800 Upm zentrifugieren und anschließend das Pellet in 5 mL Hank´s waschen.
Zellsuspension 5 min mit 800 Upm zentrifugieren,
die Waschlösung entfernen und
das Pellet in 10 mL Medium durch auf- und abpipettieren resuspendieren.
$1*10^6$ Zellen in eine frische 75 cm^2 große Kulturflasche geben und 20 mL frisches Medium hinzufügen.
Die Zellen werden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen können über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff (-196°C) in einer Kältestarre aufbewahrt werden. Gesunde Zellen, welche sich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befinden, suspendiert man in Medium, welches eine hohe Serumkonzentration und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutz enthält. DMSO hat dabei die Funktion, den Wassergehalt der Zellen zu reduzieren. Die Suspension kühlt man mit festgelegter Geschwindigkeit (1°C/min) ab und bewahrt sie dann in flüssigem Stickstoff auf.

Benötigt man neue Zellen, so müssen diese rasch bei 37°C aufgetaut und in frischem Medium aufgenommen werden.

Reagenzien:

Hank´s (Sigma)
Medium 1: RPMI (Sigma) + 2 mM Glutamin (Sigma) + 10 % FCS (Sigma)
Medium 2: RPMI (Sigma) + 2 mM Glutamin (Sigma) + 20 % DMSO (Merck)
Medium 3: RPMI (Sigma) + 2 mM Glutamin (Sigma) + 40 % FCS (Sigma)
Trypsin/EDTA (Sigma)

Durchführung:

1. Einfrieren von Zellen

Das Medium von den Zellen abziehen und
die Zellen mit 5 mL Hank´s waschen.
1 mL Trypsin/EDTA auf die Zellen geben und diese dann
2 min bei 37°C inkubieren.
9 mL Medium ? zugeben und die Zellen durch auf- und abpipettieren resuspendieren und vereinzeln.
Die Zellsuspension 5 min mit 800 Upm zentrifugieren und das
Zellpellet in soviel Medium ?? aufnehmen, dass eine Zellzahl von $1*10^6$ Zellen pro 750 µL Medium ?? mit 40% FCS vorliegt. Es werden 750 µL entnommen und zu
750 µL Medium ??? mit 20% DMSO (4°C) pipettiert.
Die Zellen sofort auf Eis stellen und dann im Kryostat herunterkühlen.

2. Auftauen von Zellen

Alle Reagenzien werden auf 37°C erwärmt.

Die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnehmen und sofort bei 37°C auftauen.
Die Zellen aus dem Kryoröhrchen in eine 25 cm^2 Kulturflasche mit 5 mL Medium überführen und 24 h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 inkubieren.
Am folgenden Tag erfolgt ein Mediumwechsel und die Zellen werden wie unter 2.2.1 beschrieben weiterkultiviert.

2.3 Zytotoxische Untersuchungen

Zytotoxische Untersuchungen dienen dazu, die Toxizität einer Substanz zu bestimmen. Dies geschieht mittels Proliferationsanalyse, bei der man entweder die Zellzahlen lebender und toter Zellen bestimmt oder die metabolisch aktiven Zellen mittels eines MTS-Assays nachweist.

2.3.1 Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Vitalität von Zellen

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig. Die maximale Aufnahme findet bei pH 7,5 statt. Weiterhin haben die Temperatur, die Färbedauer sowie die Farbstoffkonzentration einen Einfluss auf die Färbung.

Reagenzien:

0,5%-ige Trypanblau-Lösung
1x PBS
Hank´s (Sigma)
RPMI (Sigma)
Trypsin/EDTA (Sigma)

Durchführung:

1. Präparation der Zellsuspension

Medium abnehmen
Zellen mit Hank´s Lösung waschen
1 min bei 37°C trypsinieren
Zellen in serumfreien RPMI aufnehmen

2. Testansatz

360µL 0,5%-ige Trypanblau-Färbelösung (vorgewärmt, 37°C)
+ 100µL Zellsuspension
+ 540µL PBS

Zellverdünnung 1:10
0,18%-ige Trypanblau-Färbelösung

Den Testansatz vorsichtig durchmischen, ca. 2-3 min bei 37°C inkubieren und die Zellen sofort in der Neubauer-Zählkammer zählen.

Lebende Zellen: nicht gefärbt
Tote Zellen : blau angefärbt oder schwach blau gefärbt

Sollte die Zellzählung wiederholt werden müssen, muss der Testansatz stets neu gemischt werden, da Trypanblau zytotoxisch ist und bei zunehmender Inkubationszeit die Anzahl der toten Zellen zunimmt.

3. Berechnung

Prozentsatz lebender Zellen

$$\textbf{\% lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen + gefärbte Zellen}} \times 100$$

Anzahl der Zellen insgesamt

Zellen pro mL = ? pro Großfeld x Verdünnungsfaktor x 10^4

Gesamtanzahl Zellen = Zellen pro mL x Gesamtvolumen der Zellsuspension

2.3.2 MTS-Assay

Lebende, metabolisch aktive Zellen sind in der Lage Tetrazolium-Salze in eine farbige Formazan Verbindung umzuwandeln; tote Zellen sind hierzu nicht in der Lage. Die Umsetzung des MTS ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]; Owen´s Reagenz) in das wässrig lösliche Formazan erfolgt durch Dehydrogenase Enzyme, welche in metabolisch aktiven Zellen zu finden sind. Die Absorption des Formazans liegt bei 490 nm und ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur.

Reagenzien:

Apigenin (Sigma)
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)
RPMI ohne Phenolrot (Sigma) + 5% FCS (Sigma) + 2 mM Glutamin (Sigma)

Durchführung:

$1*10^3$ Zellen/Napf werden in einer 96-Napf Platte in 100µL farblosem RPMI ausgesät.
Nach 24h erfolgt die erste Proliferationsmessung. Hierzu werden PMS und MTS in einem Verhältnis 1:20 gemischt und je 20µL zu jedem Ansatz pipettiert. Die Platten werden 90 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgt bei 490 nm im ELISA-Reader.
Bei den restlichen Platten wird ein Mediumwechsel durchgeführt und die zu untersuchende Substanz zu den Zellen gegeben. Es erfolgt alle 24h eine Messung der Proliferation.

2.4 Tierversuche

Um eine Aussage über die therapeutische Wirksamkeit einer Substanz oder neuer Behandlungsmethoden zu treffen, müssen diese zuerst im Tierversuch untersucht werden.

2.4.1 Tiere und Tierhaltung

Für alle Tierversuche werden juvenile männliche Copenhagen Ratten (Harlan-Winkelmann, USA), mit einem Gewicht von 180 ? 20 g, verwendet. Die Tiere werden zu zweit in Macrolon-Käfigen (Größe III), bei 24 ? 1 °C, 50 ? 10 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Hell-Dunkel Rhythmus gehalten. Den Tieren steht Trinkwasser und pelletiertes Alleinfutter (Atromin?) *ad libitum* zur Verfügung. Autoklaviertes Weichholzgranulat dient als Käfigeinstreu und wird zweimal wöchentlich erneuert. Die Tiere werden frühestens eine Woche nach Lieferung für Versuchzwecke herangezogen. Herkunft und Haltung stellen sicher, dass die Tiere frei von Nager spezifischen pathogenen Keimen (specific pathogen free, SPF) sind.

A. B.

Abb. 2.3: Tierhaltung. Die Fotos zeigen die Haltung von jeweils zwei Copenhagen Ratten in Macrolon-Käfigen (Größe III) am DKFZ.

2.4.2 Tumormodell

Das Dunning-Ratten-Prostatakarzinom R3327 AT-1 Tumormodell geht auf einen Spontantumor zurück, den W.F. Dunning 1961 (University of Florida) aus der Prostata einer 22-monatigen männlichen Copenhagen Ratte entnahm [Dunning, 1963]. Zu Beginn handelte es sich um ein langsam wachsendes (Volumenverdopplungszeit (VDZ): 15-20 Tage), hormonabhängiges, gut differenziertes Adenokarzinom mit einer Metastasierungsrate unter 1%. Daraus

entwickelte sich 1977 durch Transplantation auf eine kastrierte Ratte die hormon-insensitive Sublinie R3327-HI. Der AT-1 entstand 1976 spontan aus dem Ursprungstumor R3327-H und ist charakterisiert durch ein schnelles Wachstum (VDZ: 2,7 Tage), Hormonunabhängigkeit, langsame Metastaseneinwanderung in die Lymphknoten und die Histologie eines anaplastischen Karzinoms [Isaacs und Coffey, 1983]. Die Vorteile dieses Tumormodells liegen darin, dass es sich um ein langsam wachsendes Adenokarzinom handelt, das spontan auf einem Tier und eindeutig in der Prostata entstand, und dessen Histologie und biochemisches Profil eine große Ähnlichkeit mit dem humanen Prostatakarzinom aufweist [Issacs et al. 1978]. Der Tumor wurde 1987 von J.T. Isaacs (John Hopkins University, Baltimore USA) dem DKFZ zur Verfügung gestellt.

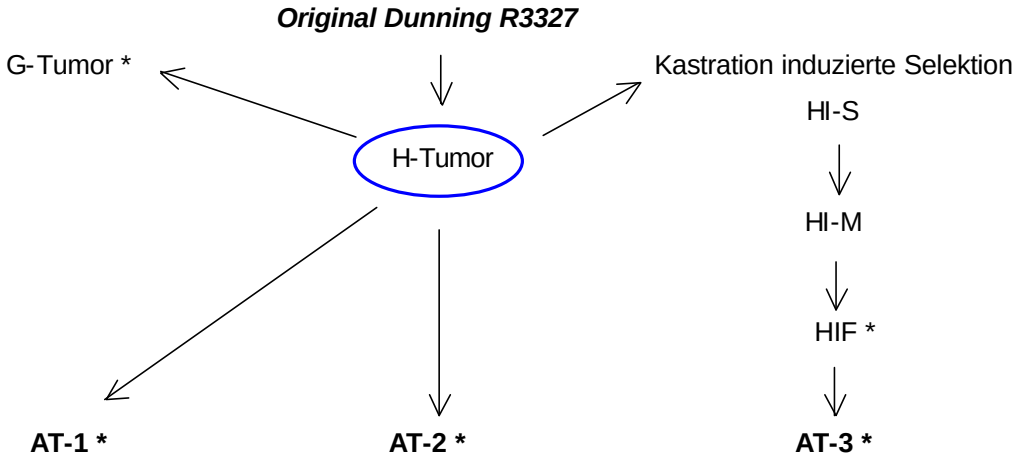


Abb. 2.4: Entwicklung der Dunning-Tumor-Sublinien [nach Isaacs et al., 1986]
Tumor Sublinien mit etablierten kontinuierlichen Zelllinien

2.4.3 Tumortransplantation

Für die Transplantation werden die Ratten kurz mit CO_2 betäubt und anschließend mit einer Mischung aus Halothan (Hoechst), Distickstoffmonoxid (Messer Griesheim) und Sauerstoff (Messer Griesheim) (Verhältnis: 1,5% Halothan : 35% N_2O : 60% O_2) anästhesiert. Nach Rasur und Desinfektion des Hinterbeins werden entweder kleine AT-1 Tumorfragmente in eine Hauttasche

transplantiert oder eine Zellsuspension von $1*10^6$ Zellen pro 300µL RPMI subkutan injiziert. Das Tumorwachstum wird dreimal wöchentlich kontrolliert und durch die Bestimmung der Länge und Breite des Tumors (Länge > Breite), wird über die Formel zur Berechnung des ellipsoiden Volumens das Tumorvolumen (V_T) berechnet.

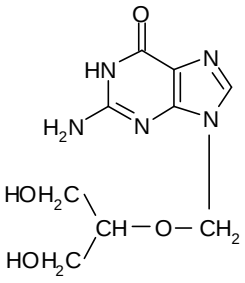
Tumorvolumen (V_T) [mm^3] = (Breite [mm] * 2) * Länge [mm] * ? * 4/3

Etwa zwei Wochen nach der Transplantation hat der Tumor eine Größe von ca. 8*8 bis 10*10 mm erreicht, dies entspricht einem Tumorvolumen von 300 - 500 mm^3.

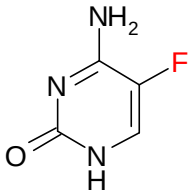
2.4.4 Behandlung der Tiere mit Pro-Drugs

Bei Erreichen eines Tumorvolumens von 300 - 500 mm^3 wird mit einer Pro-Drug Therapie begonnen, bei der die Tiere alle 24 Stunden, über einen Zeitraum von 14 Tagen die Medikamente intraperitoneal (i.p.) injiziert bekommen. Die Tiere werden einmal wöchentlich gewogen, und danach wird für jedes Tier die entsprechende Medikamentenmenge eingewogen. Die Pro-Drugs werden jeden Tag frisch zubereitet.

Ganciclovir
MW = 151 g/mol



5-Fluorocytosin
MW = 129 g/mol



Reagenzien:

0,9%-ige NaCl-Lösung steril (Braun Melsungen AG)
5-Fluorocytosin (Sigma)
Ganciclovir (Cymeven? , Roche)

Durchführung:

1. Ganciclovir (GCV)

Behandlungsmenge: 30 mg/kg
GCV liegt als Na-GCV vor (543 mg Na-GCV ? 500 mg GCV), d.h. die Einwaage ist mit dem Faktor 1,086 zu multiplizieren, um die absolute GCV-Menge zu erhalten.
GCV in 1 mL 0,9%-ige NaCl-Lösung lösen und den Tieren injizieren.

2. 5-Fluorocytosin (5-FC)

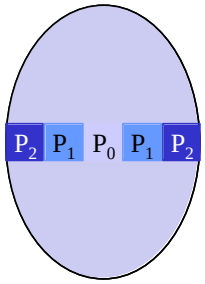
Behandlungsmenge: 500 mg/kg
5-FC mit 1 mL 0,9%-ige NaCl-Lösung verse zen und 30 min ins Ultraschallbad stellen, bis eine feine Suspension entstanden ist. Diese dann in eine 1 mL Spritze aufziehen und den Tieren i.p. injizieren.

3. Ganciclovir & 5-Fluorocytosin in Kombination

Behandlungsmenge: 30 mg/kg (GCV) & 500 mg/kg (5-FC)
Die Substanzen zusammen wiegen und mit 1 mL 0,9%-ige NaCl- .ösung versetzen und 30 min ins Ultraschallbad stellen, bis eine feine Suspension entstanden ist. Diese dann in eine 1 mL Spritze aufziehen und den Tieren i.p. injizieren.

2.4.5 Tötung, Sektion und Organkonservierung

Alle Tiere werden am Versuchsende durch Inhalation von CO_2 (Messer Griesheim) getötet. Bei einer Totalsektion wird kontrolliert, ob sich Metastasen gebildet haben und Niere, Leber und Tumor entnommen. Die Aufteilung des Tumors für verschiedene Untersuchungen und Konservierungen wird wie folgt vorgenommen:



1. Paraformaldehydkonservierung - Histologie
2. Kryokonservierung in Isopentan - FACS Messung
3. Kryokonservierung in fl. Stickstoff - Proteinbestimmung
   oder in Isopentan - Histologie

Für die histologischen Untersuchungen werden Tumor und Organstücke der Größe 10*10 mm entweder in 4% Paraformaldehyd (4°C) konserviert oder in -140°C kaltes Isopentan getaucht (siehe Kapitel 2.6).

2.5 Methoden zur Proteinchemie

Zur Bestimmung der Ausbildung von Gap-junctions innerhalb des Tumorgewebes und des Zellverbandes wurden Proteinextraktionen und der Nachweis von unterschiedlichen Gap-junction Proteinen auf Nitrozellulose-membranen (Western-Blot) durchgeführt.

2.5.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe und Zellen

Die Methode basiert auf der Eigenschaft der RNA, in einem Zweiphasensystem aus Phenol, Chloroform und Guanidinthiocyanat (pH 4) in der wässrigen Phase zu verbleiben, während DNA und Proteine in die organische Phase gehen oder sich in der Interphase anreichern. In einer Weiterentwicklung hat P. Chomczynski [1993] die Methode dahingehend modifiziert, dass über eine sequenzielle Präzipitation gleichzeitig RNA, DNA und Proteine aus Zellen und Geweben isoliert werden können.

Reagenzien:

1x PBS
Chloroform (Roth)
Ethanol (Riedel-de Ha?n)
Stickstoff (Messer Griesheim), flüssig
TRIzol-Reagenz (Gibco)

Durchführung:

1. Lyse und Homogenisierung

A. Gewebe

Gewebe nach Entnahme schnell in kleine Stücke schneiden und in flüssigem Stickstoff einfrieren. Gewebe bei –80°C lagern.
Vor der Extraktion Gewebestücke wiegen und 50 – 200 mg in einen 5 mL Potter geben.
Pro 100 mg Gewebe 1 mL TRIzol-Reagenz zugeben, sofort homogenisieren und dann 5 min bei RT lysieren lassen.

B. Monolayer Kulturen

Zellen nach Entfernen des Mediums einmal mit 1x PBS waschen.
Pro 10 cm^2 Kulturflasche 0,3 mL TRIzol-Reagenz zugeben. Die Zellen 5 min bei RT lysieren lassen, und dann mit einem Zellschaber abkratzen und in einen Potter überführen.
Die lysierten Zellen homogenisieren, um die viskose hochmolekulare DNA zu zerkleinern.

2. Isolierung der RNA

Zu den lysierten Proben 0,2 mL Chloroform pro mL TRIzol zugeben, 20 sec verwirbeln und 2-3 min bei RT stehen lassen.
Phasen durch Zentrifugation mit 4000 Upm, 15 min bei 4°C trennen.
Die obere farblose wässrige Phase mit der isolierten RNA entfernen und die untere Phase und die Interphase mit der isolierten DNA und den Proteinen weiterverarbeiten.

3. Isolierung der Proteine und Entfernen der DNA

Pro mL ursprünglich verwendeten TRIzol-Reagenz 0,3 mL Ethanol zugeben, mischen und 2-3 min bei RT stehen lassen.
DNA in der Kälte (4°C) mit 2000 Upm 5 min zentrifugieren.
Überstand, der die Proteine enthält, in ein neues PP-Röhrchen überführen und die Proteinkonzentration bestimmen.

2.5.2 Quantifizierung des Proteingehalts

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford [1976] beruht auf dem Nachweis der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brillantblau G250 an Proteine. Der Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste

sowie im geringerem Maße an einige basische und aromatische Aminosäurereste.

Der Farbstoff liegt in saurer Lösung hauptsächlich in der protonierten, kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) vor. Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird dagegen die im Gleichgewicht mit der kationischen Form entstehende anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, welche ein Absorptionsmaximum von 595 nm (blau) besitzt [Compton und Jones, 1985].

Die Methode nach Bradford musste etwas modifiziert werden, da die im TRIzol enthaltenden Phenole die Farbreaktion erheblich stören. Aus diesem Grund muss der verwendete Standard ebenfalls in TRIzol gelöst werden, und die Gesamtmenge an TRIzol muss in jedem Ansatz gleich sein.

Reagenzien:

Aqua bidest.
Bradford Reagenz (BioRad)
BSA (Boehringer Mannheim) [2µg/µL] in TRIzol
TRIzol (Gibco)

Durchführung:

Pipettierschema für Mikrotitierplatte:

Konz. [µg/µL]	**0**	**1**	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**15**	**20**
BSA	?	0,5 µL	1 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL	7,5 µL	10 µL
TRIzol	10 µL	9,5 µL	9 µL	8 µL	7 µL	6 µL	5 µL	2,5 µL	?
H_2O	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL	190 µL
Reagenz	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

3-fach Bestimmung:	
Probe	5 µL
TRIzol	5 µL
H_2O	190 µL
Reagenz	20 µL

Ansätze durch mehrmaliges auf- und ab pipettieren gut mischen, 5 min bei RT inkubieren und im ELISA-Reader bei 595 nm die Absorption bestimmen.
Mit den Kalibrierungsdaten eine lineare Regression durchführen und anhand der Geradengleichung die unbekannte Proteinkonzentration bestimmen.
Durch Dividieren der bestimmten Proteinmenge durch das Volumen der Messprobe (5 µL) erhält man die Konzentration [µg/µL] des Proteins in der Ausgangslösung.

2.5.3 Fällung von Proteinen durch organische Lösungsmittel

Proteine können aus verdünnten Lösungen durch organische Lösungsmittel ausgefällt und zusätzlich gereinigt werden. Meist werden Lösungsmittel benutzt, die vollkommen mit Wasser mischbar sind und analog den Proteinen hydrophobe und polare Anteile besitzen, wie z.B. Aceton oder Alkohole. Die Lösungsmittel stören durch ihre spezifischen Eigenschaften die Wechselwirkung des Wassers mit den Proteinen. Die Hydratisierung der Proteine und die Dielektrizitätskonstante der Lösung nimmt mit steigender Lösungsmittelkonzentration ab. Die elektrostatische Anziehungskraft zwischen entgegengesetzt geladenen oder polaren Gruppen der Proteine wird dadurch erhöht, bis hin zur festen Assoziation und damit zur Ausfällung der Moleküle [Eckert und Kartenbeck, 1997].

Reagenzien:

Aceton (Roth)

Durchführung:

Proteinlösung 1:3 mit Aceton (-20°C) mischen und 10 min bei –20°C inkubieren.
Präzipitiertes Protein mit 13000 Upm 10 min zentrifugieren.
Das Sediment in einer Vakuum-Konzentrationszentrifuge trocknen und für die Elektrophorese vorbereiten.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Eine Auftrennung von Proteinen - ausschließlich nach Größe - ist nach Behandlung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), zusammen mit Schwefelbrücken spaltenden Thiolreagenzien, wie z.B. ?-Mercaptoethanol, möglich. Dabei werden die Proteine vollkommen denaturiert und gegebenenfalls in ihre Untereinheiten zerlegt. Durch hydrophile Wechselwirkungen kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladung der

Proteine überdeckt wird. Die so gebildeten SDS-Protein-Mizellen besitzen ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach der relativen Molekülgröße erfolgt durch das diskontinuierliche System nach Laemmli [1970]. Die Diskontinuität bezieht sich auf den pH-Wert, die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern und die Gelstruktur. Ein großporiges Sammelgel ist hierbei auf ein engporiges Trenngel aufgelagert. Das Proteingemisch wird im Sammelgel fokussiert und im nachfolgenden Trenngel durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der Gelmatrix retardiert und damit nach dem „Molekularsiebeffekt“ aufgetrennt.

Reagenzien:

0,5 M Tris pH 6.8
1,5 M Tris pH 8.8
10% Ammoniumpersulfat (Sigma)
10% SDS (Serva)
1x Elektrodenpuffer
„low molecular weight calibration kit“ (LMW-Marker) (Amersham Pharmacia)
2x Probenpuffer
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% / 0.8%)
Aqua bidest.
TEMED (Sigma)

Durchführung:

Herstellung der Gele:

	Trenngel			Sammelgel	
	Acrylamid-Konzentration im Gel			Acrylamid-Konzentration im Gel	
	10%	**12,5%**	**15%**	**5%**	**7,5%**
Acryl/Bisacryl-amid	13,3 mL	16,7 mL	20,0 mL	3 mL	4,5 mL
H_2O	15,9 mL	12,5 mL	9,2 mL	10,1 mL	8,6 mL
1,5 M Tris pH 8,8	10 mL	10 mL	10 mL	?	?
0,5 M Tris pH 6,8	?	?	?	4,5 mL	4,5 mL
10% SDS	400 µL	400 µL	400 µL	180 µL	180 µL
10% APS	400 µL	400 µL	400 µL	180 µL	180 µL
TEMED	33 µL	33 µL	33 µL	15 µL	15 µL
	Endkonzentration im Gel: ✍ 0,375 M Tris pH 8,8 ✍ 0,1 % SDS ✍ 0,1 % APS			Endkonzentration im Gel: ✍ 0,125 M Tris pH 6,8 ✍ 0,1 % SDS ✍ 0,1 % APS	

Die Komponenten des gewünschten Trenngels, in der Reihenfolge wie sie oben aufgeführt sind, zusammenpipettieren und langsam in die Gießform, bis 2 cm vom unteren Kammende, gießen.

Die Trenngellösung vorsichtig mit Aqua bidest. überschichten, um eine glatte Trennfläche zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten.

Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen, die Sammelgellösung, wie oben angeben, auf das Trenngel gegossen und der Kamm vorsichtig eingesetzt.

Nach der Polymerisation die Elektrophorese-Einheit zusammenbauen und die Kammern mit Elektrophorese-Puffer füllen.

Die getrockneten Proteinproben werden mit 40 µL 2x Probenpuffer versetzt, 5 min ins Ultraschallbad gestellt, dann für 10 min im Heizblock auf 100°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wird mit 75 mA und maximal 150 V durchgeführt.

2.5.5 Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulose-membran (Western-Blotting)

Der Transfer von Proteinen aus Gelen auf Nitrozellulosemembranen wurde von Towbin et al. [1979] entwickelt.
Ziel dieser Methode ist es, die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel möglichst vollständig auf eine synthetische Membran zu übertragen, so dass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht.

Reagenzien:

Kontinuierlicher Transfer-Puffer nach Bjerrum & Schafer-Nielsen

Durchführung:

Filterpapier und Nitrozellulosemembran werden mit Transfer-Puffer angefeuchtet und die Transfereinheit luftblasenfrei wie folgt aufgebaut:

Kathode:	3 Blatt Filterpapier (GB004 Schleicher und Schuell)
	Gel
	Nitrozellulosemembran (Amersham Phamacia)
Anode:	3 Blatt Filterpapier

Der Transfer erfolgt bei 400 mA für 1 Stunde.

2.5.6 Färbung mit Ponceau S

Die Färbung dient der visuellen Kontrolle des Western-Transfers und der Markierung der Referenz-Proteine.
Der saure Azofarbstoff Ponceau S hat den Vorteil, dass die Färbung reversibel ist [Salinowich und Montelaro, 1986] und dadurch nicht bei den nachfolgenden immunchemischen Nachweisen stört. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Nachweisgrenze von 250-500 ng pro Proteinbande [Montelaro, 1987].

Reagenzien:

1x PBS
Ponceau S-Färbelösung (Sigma)

Durchführung:

Die Nitrozellulosemembran wird nach dem Western-Transfer kurz mit Wasser gespült und
dann unter leichtem Schwenken in der Ponceau S-Färbelösung 1-3 min inkubiert.
Die Markerproteine und Banden werden mit einem wasserfesten Stift markiert und die Färbung durch Waschen mit 1x PBS wieder vollständig entfernt.

2.5.7 Nachweis von Proteinen auf Blot-Membranen mit immunchemischen Methoden

Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, müssen vor der Durchführung der Immunreaktion unspezifische Bindungsstellen für die immunologischen Reagenzien auf der Blot-Membran möglichst vollständig mit einer Magermilchlösung abgesättigt (blockiert) werden. Im Anschluss wird der primäre Antikörper in Magermilchlösung auf die Blot-Membran gegeben. An die Inkubation mit dem **primären Antikörper** schließt sich ein Waschvorgang mit detergenzhaltigen Puffern an, um die nicht-gebundenen und/oder unspezifisch gebundenen Antikörper möglichst vollständig zu entfernen. Es folgt die Inkubation mit dem **sekundären Antikörper**, welcher zur Detektion dient und aus diesem Grunde mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Der Nachweis der Peroxidase erfolgt dann durch die **Chemilumineszenz-Reaktion**. Hierbei wird das Luminol durch eine Meerrettich-Peroxidase / Wasserstoffperoxid katalysierte Oxidation von zyklischem Diacylhydrazin (Luminol) unter alkalischen Bedingungen in einen angeregten Zustand überführt. Unter Lichtemission (Chemilumineszenz) zerfällt das Luminol wieder in seinen Grundzustand. Eine Verstärkung der Chemilumineszenz wird durch die Zugabe von Phenol hervorgerufen [Durrant, 1990]. Dieser Effekt führt zu einer 1000-fachen Verstärkung des Lichts und zudem wird auch die Dauer der Lichtemission verlängert. Das Maximum der Emission liegt bei 428 nm und

kann mit einem blau-sensitiven Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) detektiert werden.

Reagenzien:

Antikörper:

Primärantikörper:
- monoklonaler Maus anti-Connexin 43 (Chemicon)
  1:1000
  detektiert bei 43 kDa
- monoklonaler Maus anti-Connexin 32 (Chemicon)
  1:5000
  detektiert bei 27 kDa
- Kaninchen anti-Maus Connexin 26 (Chemicon)
  1:1000
  detektiert bei 26 kDa

Sekundärantikörper:
- anti-Maus IgG, Peroxidase konjugiert (Amersham Pharmacia Biotech)
  1:2500
- anti-Kaninchen IgG, Peroxidase konjugiert (Amersham Pharmacia Biotech)
  1:2500

10x und 1x TBS
Blockierung: 5% Magermilch (Glücksklee) + 0,1% Tween 20 (Serva) in 1xTBS
ECL Lösungen 1+2 (Amersham Pharmacia Biotech)
Waschpuffer: 0,2% Tween 20 in 1x TBS

Durchführung:

Zum Blockieren wird die Nitrozellulosemembran 30 min mit der Magermilchlösung inkubiert.
Die Membran wird mit ca. 5-10 mL Magermilchlösung, die den primären Antikörper enthält, in eine Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert.
Am nächsten Tag wird die Membran zweimal für 1 min und viermal für 15 min mit dem detergenzhaltigen Waschpuffer gewaschen.
Zur Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden 10-15 mL Magermilchlösung, die den sekundären Antikörper enthält, zur Membran gegeben und eine Stunde bei RT inkubiert.
Die Nitrozellulosemembran wird nochmals zweimal für 1 min und viermal für 15 min mit dem detergenzhaltigen Waschpuffer gewaschen.
Für die Chemilumineszenz-Reaktion werden die beiden Reagenzien zu gleichen Teilen miteinander gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation wird überschüssiges Reagenz entfernt, eine Folie auf die Membran gelegt, auf die dann der Autoradiographiefilm aufgelegt wird.
Die Expositionszeit kann zwischen 15 sec und 60 min liegen.
Die Entwicklung des Filmes erfolgt automatisch.

2.6 Immunologische Techniken

Ziel immunologischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper. Die verwendeten Antikörper können entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC, Texas Red) oder einem Enzym (z.B. alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt sein (**direkte Methode**). Oder aber der spezifische Antikörper wird durch einen zweiten enzym- oder fluoreszenzmarkierten Antikörper, der gegen das F_C-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, detektiert (**indirekte Methode**).

2.6.1 Konservierung von Geweben und Zellen

Ein wichtiger Bestandteil bei den immunologischen Nachweisen von Antigenen in Geweben und Zellen ist die Konservierung. Hierbei steht die Erhaltung der Antigenität, die Zugänglichkeit der Antigenen Determinaten für den Antikörper und die Bewahrung der morphologischen Strukturen im Vordergrund. Die beste Antigenerhaltung garantiert der unfixierte oder mit Aceton oder Methanol nachfixierte Gefrierschnitt. Die Paraformaldehyd (PFA) Fixierung und die Paraffineinbettung des Probenmaterials hat zur Folge, dass einerseits die Antigenität beeinträchtigt wird, anderseits aber auch den Vorteil einer guten Strukturerhaltung. Die Fixation des Gewebes in PFA kann die Bildung übermäßiger Aldehydvernetzungen verursachen, die dann die Gewebsantigene maskieren und deren Nachweis mit dem Primärantikörper verhindern (besonders bei lymphatischem Gewebe). Um die Antigenstelle zu demaskieren, können die Aldehydvernetzungen mit proteolytischen Enzymen angedaut werden (Trypsin, Pepsin, Proteinase K).

Reagenzien:

4% PFA (Merck) in 1x PBS pH 7,4 (4°C)
Flüssiger Stickstoff (Messer Griesheim)
Isopentan (Riedel-de Ha?n) (-140°C)

Durchführung

1. Kryokonservierung

Gewebe entnehmen, in 10*10 mm große Stücke schneiden und sofort in das –140°C kalte Isopentan tauchen.
Das Gewebe mind. 2 min gut durchfrieren lassen, in Probengefäße überführen und das Probenmaterial bei –80°C aufbewahren.

2. Paraformaldehydkonservierung

Gewebe entnehmen, in 10*10 mm große Stücke schneiden und in das vorgekühlte PFA einlegen.
Das Gewebe 24 h bei 4°C fixieren.
Die Paraffineinbettung erfolgt in der histologischen Abteilung des DKFZ, Prof. Dr. Gröne.

2.6.2 Immunhistochemischer Nachweis mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (MW 100 kD), aus dem Darm von Kälbern, hydrolysiert Naphtholphosphatester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole kuppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogenen) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Verschiedene Kombinationen von Substraten und Chromogenen sind möglich.

Substrate:	Chromogene:
Naphthol AS-BI-phosphat	Fast Red TR (rot)
Naphthol AS-MX-phosphat	Fast Blue BB (blau)
Naphthol AS-TR-phosphat	
5-Bromo-4-chlor-3-indoxyl-phosphat	

Die entstehenden Azofarbstoffe sind in alkoholischen und anderen organischen Lösungsmitteln löslich, so dass Einbettmedien auf wässriger Basis verwendet werden müssen.

Reagenzien:

Antikörper für Paraffinschnitte

Primärantikörper:

- monoklonaler Rib5/2 Ratte anti-$CD4^+$ (Dianova/BMA)
  Fixierung: PFA Verdünnung: 1:20
- monoklonaler Ratte anti-$CD8^+$ FITC (Dianova)
  Fixierung: PFA Verdünnung: 1:20
- monoklonaler Ki-M2R anti-Makrophagen (Dianova/BMA)
  Fixierung: PFA Verdünnung: 1:20
- monoklonaler anti-Ratte NKR-P1A (Pharmingen)
  Fixierung: Aceton Verdünnung: 1:20
- polyklonaler Kaninchen anti-Cytosin Deaminase (DKFZ)
  Fixierung: PFA Verdünnung: 1:1000

Sekundärantikörper:

- Ziege anti-Maus IgG, alkalische Phosphatase konjugiert (Dianova) Verdünnung: 1:25

0,1% Triton X-100 (Serva) in 1x PBS
1x PBS
4% PFA (Merck) in 1x PBS pH 7,4 (4°C)
5%-ige BSA Lösung in 1x PBS (Boehringer Mannheim)
Aceton (-20°C) (Roth)
Alkoholische Reihe (100% – 90% - 70% EtOH (Riedel-de Ha?n)
Fast Red Färbelösung
Kaiser´s Glycerin (Merck)
Mayer´s Hämatoxylin (Merck)
Proteinase K (Sigma)
Protein-Blockierungsserum (DAKO)
Xylol (Roth)

Durchführung:

1. Herstellung der Gewebepräparate (Paraffinschnitte)

5 - 8 µm dicke Schnitte herstellen und diese
im 30 - 35°C warmen Wasserbad strecken und auf saubere silanisierte Objektträger aufziehen.
Die Schnitte ü.N. bei 42-45°C im Trockenschrank trocknen und bei RT in dunklen Kästen lagern.
Vor der Immunhistologie die Schnitte 2 x 10 min in Xylol entparaffinieren und über die alkoholische Reihe (100% - 75%) zum 1x PBS führen.

2. Enzymatische Behandlung zur Spaltung von Aldehydquervernetzungen (optional)

Proteinase K [2µg/mL] in 1x PBS (37°C)
Inkubationszeit: 5 min bei 37°C in einer Küvette
2 x 5 min in 1x PBS (4°C) waschen

3. Permeabilisierung

0.1% Triton X-100 in 1x PBS
Inkubationszeit: 5 min bei RT in einer Küvette
2 x 5 min in 1x PBS waschen

4. Blockierung von Hintergrundreaktivitäten

Protein-Blockierserum (DAKO)
Inkubationszeit: 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer
Serum abschütteln

5. Inkubation mit dem Primärantikörper

Primärantikörper (s. oben)
Verdünnung: s. oben in 5% BSA
Inkubationszeit: 1h bei RT in einer feuchten Kammer
Ak abschütteln
2 x 5 min in 1x PBS waschen

6. Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Sekundärantikörper (s. oben)
Verdünnung: s. oben in 5% BSA
Inkubationszeit: 1h bei RT in einer feuchten Kammer
Ak abschütteln
2 x 5 min in 1x PBS waschen

7. Bildung des Azofarbstoffes Fast Red

die Schnitte in der Fast Red Färbelösung 30 min im Dunkeln inkubieren.

8. Gegenfärbung

Mayer´s Hämatoxilin Färbung
Schnitte 1 – 5 min in Hämatoxylin-Lösung stellen
Schnitte 10 min unter schwach laufendem Leitungswasser (alkalisch) bläuen.

9. Eindecken

Kaiser´s Glycerin

2.6.3 Immuncytochemischer Nachweis mit 3,3´-Diaminobenzidin

3,3´-Diaminobenzidin (DAB) wird in Gegenwart des Enzyms Meerrettich-Peroxidase und von Wasserstoffperoxid durch oxidative Polymerisierung und Zyklisierung in ein braungefärbtes unlösliches Phenazin-Polymer umgewandelt [Seligman et al., 1968]. Die Intensität des Farbniederschlages kann durch Ni- und Co-Ionen verstärkt und in einen schiefergrauen Farbton umgewandelt werden [De Blas und Cherwinski, 1983].

Reagenzien:

0,03 % H_2O_2 (Merck) in 1x PBS
0,1 % Triton X-100 (Serva) in 1x PBS
1x PBS
3%-ige PFA (Merck) in 1x PBS
50 mM NH_4Cl (Merck) in 1x PBS pH 7,4
Avidin/Biotin Block (Vectastain)
DAB Reagenz (Vectastain)
Eukitt (Kindler GmbH & Co.)
Methanol (Riedel-de Ha?n)
Primärantikörper: ? Kaninchen anti-Cytosin Deaminase Ak (DKFZ)
? Verdünnung: 1:1000
Vectastain ABC Kit (Vectastain)

Durchführung:

1. Herstellung der Zellpräparate

Saubere, sterile silanisierte Objektträger in eine Petrischale legen, Zellen in die Schale geben, unter den normalen Bedingungen die Zellen kultivieren bis Konfluenz erreicht ist.

2. Herstellung der VECTASTAIN Arbeitslösungen

Blockierserum: 3 Tropfen (?150µL) SL (**gelb**) zu 10 mL Puffer geben
Biotinylierter Ak: 1 Tropfen (?50µL) SL (**blau**) zu 10 mL Puffer geben
ABC-Reagenz: 2 Tropfen Reagenz A (**orange**) zu 10 mL Puffer geben und dann 2 Tropfen Reagenz B (**braun**) hinzufügen, mischen und *30 min* stehen lassen.

3. Fixierung und Permeabilisierung

Die Objektträger in:
3% PFA-Lösung für 5 min bei RT und anschließend
kurz in 1x PBS tauchen. Dann in
50 mM NH_4Cl / 1x PBS (pH 7,4) 10 min RT (quentschen) überführen,

kurz in 1x PBS tauchen. Darauf folgt
-20 °C kaltes Methanol (abs.) für 10 min und dann wieder
kurz in 1x PBS tauchen.
Die Permeabilisierung erfolgt mit 0.1% Triton X-100 5 min bei RT. Anschließend
3 x 5 min in 1x PBS waschen.

4. Blockierung der endogenen Peroxidase

Diese Behandlung ist nur bei biotinylierten Antikörpern notwendig.

0,03% H_2O_2 in 1x PBS
in einer Standküvette 20 min bei RT inkubieren
3 x 10 min in 1x PBS waschen

5. Blockierung

VECTASTAIN Blockierserum aus der Arbeitsflasche
Inkubationszeit: 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
Serum abschütten

6. Blockierung von Avidin/Biotin

1-2 Tropfen VECTASTAIN Avidin-Lösung auf die Schnitte geben
Inkubationszeit: 15 min bei RT in einer feuchten Kammer
15 min in 1x PBS waschen
1-2 Tropfen VECTASTAIN Biotin-Lösung auf die Schnitte geben
Inkubationszeit: 15 min bei RT in einer feuchten Kammer

7. Inkubation mit DAB

Arbeitslösung kurz vor Gebrauch herstellen.

5 mL Aqua bidest. + 2 Tropfen Puffer SL mischen
+ 4 Tropfen DAB SL gut mischen
+ 2 Tropfen Hydrogen Peroxid Lösung gut mischen
+ 2 Tropfen Nickel Lösung
Inkubationszeit: 2 – 10 min bei RT in einer feuchten Kammer
DAB abschütten
1 x 15 min in 1x PBS waschen

8. Eindecken

Eukitt

2.6.4 Immunhistochemischer Nachweis mit Fluoreszenzfarbstoffen

Der Vorteil des immunhistochemischen Nachweises mit Fluoreszenzfarbstoffen liegt darin, dass der sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Cy3 (rot) oder FITC (grün), gekoppelt ist. Bei dieser Technik entfällt der Schritt der Farbumsetzung. Ein Nachteil ist jedoch, dass keine Dauerpräparate entstehen, da die Fluoreszenz mit der Zeit ausbleicht. Auch langes und häufiges Mikroskopieren der Präparate ist aufgrund des Fluoreszenzverlustes nicht möglich.

Reagenzien:

Antikörper für Gefrierschnitte

Primärantikörper:	- polyklonaler Kaninchen anti-GFP (Clontech)	
	Fixierung: PFA	Verdünnung: 1:100
Sekundärantikörper:	- Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert (Dianova)	
		Verdünnung: 1:100
	- Dapi zur Kernfärbung (Dianova)	
		Verdünnung: 1:10 000

0,1% Triton X-100 (Serva) in 1x PBS
1x PBS
4% PFA (Merck) in 1x PBS pH 7,4 (4°C)
5%-ige BSA Lösung in 1x PBS (Boehringer Mannheim)
Dapi (DAKO)
Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen
Protein-Blockierungsserum (DAKO)
Speichermedium

Durchführung:

1. Herstellung der Gewebepräparate (Gefrierschnitte)

5 - 8 µm dicke Schnitte auf saubere silanisierte Objektträger aufziehen.
Die Schnitte 30 min bei RT trocknen lassen und anschließend
10 min bei 4°C in 4% PFA/PBS oder 4°C kaltem Aceton fixieren.
Die Präparate 2 x 10 min 1x PBS waschen und in Speichermedium bei -20°C lagern.
Vor der Immunhistologie die Schnitte 3 x 10 min in 1x PBS waschen, um überschüssiges Speichermedium zu entfernen.

2. Permeabilisierung

0.1% Triton X-100 in 1x PBS
Inkubationszeit: 5 min bei RT in einer Küvette
2 x 5 min in 1x PBS waschen

3. Blockierung von Hintergrundreaktivitäten

Protein-Blockierserum (DAKO)
Inkubationszeit: 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer
Serum abschütteln

4. Inkubation mit dem Primärantikörper

Primärantikörper (s. oben)
Verdünnung: s. oben in 5% BSA
Inkubationszeit: 1h bei RT in einer feuchten Kammer
Ak abschütteln
2 x 5 min in 1x PBS waschen

5. Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Sekundärantikörper (s. oben)
Verdünnung: s. oben in 5% BSA
Inkubationszeit: 1h bei RT in einer feuchten Kammer
Ak abschütteln
2 x 5 min in 1x PBS waschen

6. Kerngegenfärbung

die Schnitte mit 100 µL Dapi-Lösung bedecken und 5 min im Dunkeln inkubieren

7. Eindecken

Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen

2.7 ^{19}F-NMR Messung

Die Kernmagnetische Resonanz (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) Methode kann zur Bestimmung der 5-FC Katabolite und der entstehenden 5-FU Konzentration herangezogen werden.

Die NMR-Methode beruht auf der Tatsache, dass bestimmte Atomkerne ein magnetisches Moment μ besitzen. Die Ursache für das magnetische Moment ist der Spindrehimpuls, den einige Atomkerne aufzeigen. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, kann das magnetische Moment eine von zwei Orientierungen in Bezug auf das Feld annehmen. Die Energiedifferenz

zwischen diesen beiden Zuständen ist der Stärke des angelegten Feldes proportional.

In einem Molekül erzeugen die den Kern umgebenden Elektronen ihrerseits ein schwaches Magnetfeld und schirmen den Kern geringfügig vom Hauptfeld ab. Deshalb unterscheiden sich die Frequenzen der Kerne auf Grund ihrer chemischen Umgebung. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung ? bezeichnet, da durch ihn die verschiedenen Positionen der einzelnen Signale in einem NMR-Spektrum bestimmt werden. Der Wert der chemischen Verschiebung eines Signals in ppm (parts per million) ist wie folgt definiert:

$$\delta = \frac{\omega_{Signal} - \omega_{Referenz}}{\omega_{Referenz}} * 10^6 \text{ ppm}$$

Die Frequenzen ω werden in ppm statt in Hertz angegeben, da sie unabhängig von der Magnetfeldstärke sind. Die übliche Standardfrequenz $\omega_{Referenz}$, auf die die chemische Verschiebung bezogen wird, ist das Signal der Methylgruppe von Tetramethylsilan (TMS), dessen chemische Verschiebung als 0 ppm definiert wird. Aufgrund der Fluorierung wurde zur Messung von 5-FC und dessen Metaboliten Trifluoracetat (TFA) als Standardfrequenz gewählt.

Reagenzien:

1*10^8 Zellen pro Messung
* 5-Fluorocytosin (Sigma)
Isoton II? (Coulter Electronics)
Ringer (Fresenius) / 20mM Hepes pH 7,4 (Serva)
RPMI pH 7,4 – 7,0

Durchführung:

6 Kulturflaschen (T175) mit 0,4*10^6 AT-1/CDglyTK Zellen aussäen.
Bei Erreichen der Konfluenz die Zellen für 4 oder 16 h mit 50 µg/mL oder 100 µg/mL 5-FC inkubieren.

Alle weiteren Schritte bei 4°C durchführen.

Medium von den Zellen abziehen und 5 min bei 4°C mit 4000 Upm zentrifugieren. Medium in eine neues Röhrchen überführen und auf Eis stellen.
Zellen trypsinieren (möglichst kurz), in kalter Ringer/Hepes-Lösung aufnehmen, 5 min bei 4°C mit 4000 Upm zentrifugieren.
Überstand entfernen, Zellen in einem definierten Volumen kalter Ringer/Hepes-Lösung wieder aufnehmen, Zellzahl im „Coulter Counter“ bestimmen und nochmals 5 min bei 4°C mit 4000 Upm zentrifugieren.
Zellpellet in kalter Ringer/Hepes-Lösung, in möglichst kleinem Volumen, in das NMR-Röhrchen überführen und 4 – 5 h messen.
Die Mediummessung erfolgt über Nacht.
Messungen, Auswertungen und Berechnungen erfolgten durch die Spektroskopische Abteilung des DKFZ, Abteilungsleiter Dr. W. Hull.

2.8 Statistik

2.8.1 Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauß

Die Standardabweichung (s_z) des prozentualen Überlebens einer Zellpopulation setzt sich zusammen aus den Mittelwerten (x, y) und den Standardabweichungen (s_x, s_y) der einzelnen Teilgrößen.

$$\sigma_z = \frac{x}{y}\sqrt{\left(\frac{\sigma_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_y}{y}\right)^2}$$

2.8.2 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

In klinischen Studien interessiert das Auftreten einer Krankheit oder der Todesfall. Dabei handelt es sich um eine binäre Variable, das heißt, dass die möglichen Ereignisse mit zwei Symbolen (+,-) charakterisiert werden können.
Das Erreichen des fünffachen Tumorvolumens (1500 mm^3) im Vergleich zum Anfangsvolumen (300 mm^3) wurde als **biologischer Endpunkt T_5** definiert.

2.8.3 Log-Rank Test

Über einen Log-Rank Test kann die statistische Signifikanz eines Experimentes ermittelt werden.

2.8.4 Varianzanalyse nach Duncan

Die Varianzanalyse erlaubt den Vergleich von mehr als zwei Kennwerten. Sie beruht auf der Zerlegung der Gesamtvariabilität der Daten in verschiedene Komponenten.

Die statistischen Auswertungen nach Kaplan-Meier, Log-Rank und Duncan erfordern spezielle statistische Auswerteprogramme, so dass die Statistik der Tierexperimente von Herrn Dr. Dr. I. Zuna (Abteilung: Klinische Kooperationseinheit Strahlentherapeutischer Onkologie) durchgeführt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der modifizierten AT-1 Zelllinien

Zunächst wurden die biologischen Eigenschaften der genmodifizierten AT-1 Zellen, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP, im Vergleich zur Stammzelllinie AT-1 analysiert. Hierzu wurde zuerst die Verdopplungszeit bestimmt, da diese sich aufgrund der Integration fremder Gene verändern kann. Des weiteren wurde die Expression und Lokalisation des Fusionsproteins Cytosin Deaminase - Thymidinkinase (CDglyTK) und des „green fluorescent protein“ (GFP) überprüft. Abschließend wurde analysiert, ob das Fusionsprotein CDglyTK die entsprechenden Pro-Drugs in die zytotoxischen Metabolite konvertieren kann, und wie sensitiv die Zellen auf die Pro-Drugs reagieren.

3.1.1 Bestimmung der Verdopplungszeit von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen

Die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien (AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP) hat zur Folge, dass sich die Verdopplungszeiten gegenüber der Stammzelllinie verändern können. Aus diesem Grund wurden Wachstumskurven der Zelllinien AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP erstellt.

$4*10^4$ Zellen wurden pro 25 cm^2 Kulturflasche ausgesät und alle 24 h die Zellzahl (s. Kapitel 2.3.1) bestimmt (Abb. 3.1).

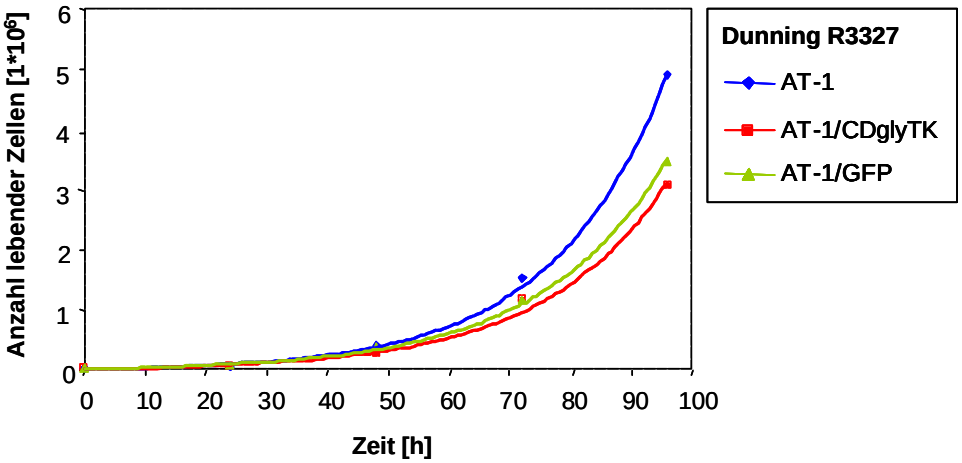


Abb. 3.1: Wachstumskurven von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt und eingezeichnet ist die Standard-abweichung der Einzelmessungen.

Die Verdopplungszeiten der untersuchten Zelllinien wurden über die exponentielle Regression der ermittelten Zellzahlen berechnet (Tabelle 3.1). Die beiden genetisch veränderten Zelllinien weisen Verdopplungszeiten von 14,2 h (AT-1/CDglyTK) und 14,4 h (AT-1/GFP) im Vergleich zur Stammzelllinie AT-1 mit 13,1 h auf.

Tabelle 3.1: Berechnung der Verdopplungszeit von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen

Tumor	**Exponentielle Regression ($Y = a * e^{b*X}$)**	**Regressionskoeffizient (r^2)**	**Verdopplungszeit [h]**
AT-1	$Y = 3{,}0 * 10^4 * e^{0{,}053X}$	0,98	13,1 h
AT-1/CDglyTK	$Y = 2{,}9 * 10^4 * e^{0{,}0487X}$	0,98	14,2 h
AT-1/GFP	$Y = 3{,}4 * 10^4 * e^{0{,}0482X}$	0,99	14,4 h

3.1.2 Nachweis und Lokalisation der Fremdproteine in AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen

Zur Bestimmung der Expression des **Fusionsproteins CDglyTK** wurde ein polyklonaler anti *E.coli* Cytosin Deaminase Antikörper verwendet, der von Herrn Dr. Gebert, Universitätsklinikum Heidelberg, entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde [Haack et al., 1997]. Da es sich bei dem zu untersuchenden Enzym um ein Fusionsprotein handelt, wird durch den Nachweis der Cytosin Deaminase auch zugleich die Thymidinkinase detektiert. AT-1/CDglyTK Zellen und als Kontrolle AT-1 Zellen wurden auf silanisierte Objekträger aufgebracht und ein immuncytochemischer Nachweis durchgeführt (s. Kapitel 2.6.3).
Aus den mikroskopischen Aufnahmen ist zu sehen, dass das Fusionsprotein CDglyTK mittels eines anti-Cytosin Deaminase Antikörpers in AT-1/CDglyTK Zellen nachweisbar ist (Abb. 3.2 (B.)). Das Fusionsprotein liegt in granulärer Struktur im Zytoplasma vor. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 3.2 (A.) die AT-1 Zellen, die keine Granula in ihrem Zytoplasma aufweisen und auch keine positive Reaktion auf den CD-Antikörper zeigen.

A. AT-1 Zellen

B. AT-1/CDglyTK Zellen

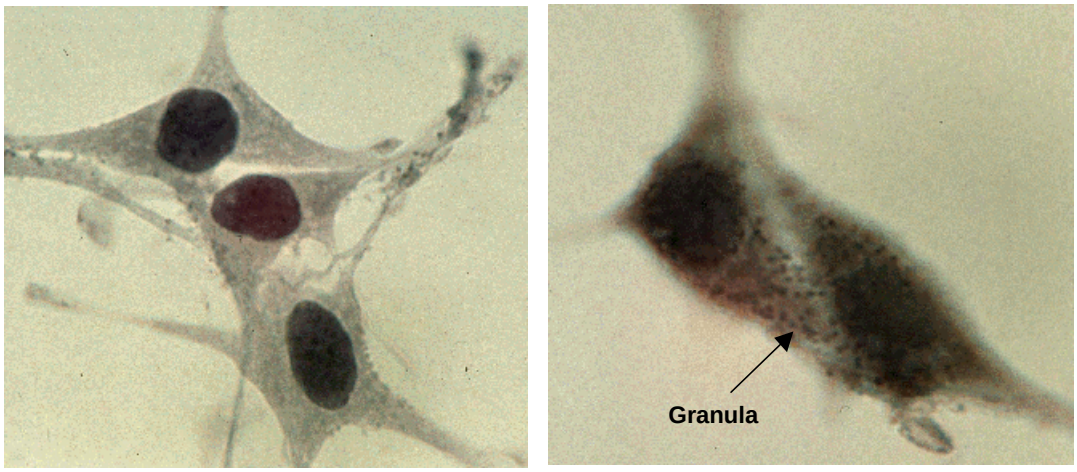


Abb. 3.2: Mikroskopische Aufnahmen von AT-1 Zellen **(A.)** und AT-1/CDglyTK Zellen **(B.)**. Die Zellen (AT-1 und AT-1/CDglyTK) wurden zum Nachweis des Fusionsproteins CDglyTK mit einem polyklonalen anti-Cytosin Deaminase Antikörper behandelt, der über eine DAB-Färbung detektiert wurde. Es ist zu beobachten, dass das Fusionsprotein in Granula angereichert wird (B.) im Gegensatz zur Kontrolle (A.), bei der keine Granula detektierbar sind.

Die Expression und Lokalisation des „**green fluorescent proteins“ (GFP)** in den AT-1/GFP Zellen konnte mittels einer nativen Fluoreszenzaufnahme aus der Zellkultur nachgewiesen werden. Es ist zu beobachten, dass das GFP zytoplasmatisch vorliegt und nicht in Granula verpackt wird (Abb. 3.3).

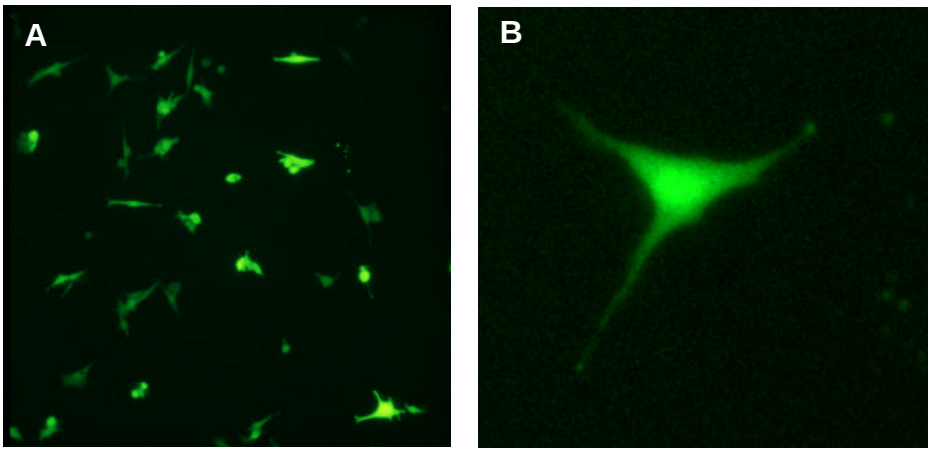


Abb. 3.3: Mikroskopische Aufnahmen von AT-1/GFP. Die Zellen wurden nicht behandelt, sondern direkt aus der Kulturflasche fotografiert. **(A.)** Übersichtsaufnahme und **(B.)** Detailaufnahme einer AT-1/GFP Zelle. Es ist zu beobachten, dass das GFP gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorliegt.

3.1.3 Der zytotoxische Einfluss der Pro-Drugs Ganciclovir und 5-Fluorocytosin auf AT-1, AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen

Die biologische Funktionsfähigkeit ist dann gegeben, wenn das Fusionsprotein CDglyTK die CD- und TK-spezifischen Pro-Drugs zu toxischen Substanzen konvertieren kann. Um die Sensitivität der AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen auf Ganciclovir und 5-Fluorocytosin zu bestimmen, wurde ein konzentrationsabhängiger Proliferationstest durchgeführt. Für jeden Ansatz wurde die Inhibitions-Konzentration IC_{50}, definiert als die Konzentration einer Substanz, die notwendig ist, um 50% der Zellpopulation zu töten, bestimmt.

Zur Bestimmung der IC_{50} der Pro-Drug Metabolite, wurden $1*10^3$ **AT-1/CDglyTK** Zellen in 96-Napf Platten ausgesät und nach 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von:

Ganciclovir (GCV) 0 - 0,01 - 0,02 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 µg/mL und
5-Fluorocytosin (5-FC) 0 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 50 - 100 µg/mL inkubiert.

Da die **AT-1 und AT-1/GFP** Zellen nicht in der Lage sind, zytotoxische Pro-Drug Metabolite zu synthetisieren, wurden höhere Pro-Drug Konzentrationen eingesetzt, um die toxische Wirkung der Medikamente zu bestimmen:

Ganciclovir (GCV) 0 - 10 - 25 - 50 - 100 - 150 - 200 - 500 µg/mL,
5-Fluorocytosin (5-FC) 0 - 100 - 250 - 500 - 750 - 1000 - 2500 - 5000 µg/mL.

Über einen Zeitraum von 168 h wurde alle 24 h ein Proliferationstest (s. Kapitel 2.3.2) durchgeführt.

Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen die dosisabhängige Zytotoxizität von Ganciclovir und 5-Fluorocytosin auf AT-1/CDglyTK, AT-1 und AT-1/GFP Zellen, dargestellt als prozentuales Zellüberleben bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle nach 144 h Inkubation. Diese Darstellung ermöglicht die Ermittlung der Inhibitionskonzentration IC_{50} von 5-FC und GCV der jeweilige Zelllinie (Tabelle 3.2).

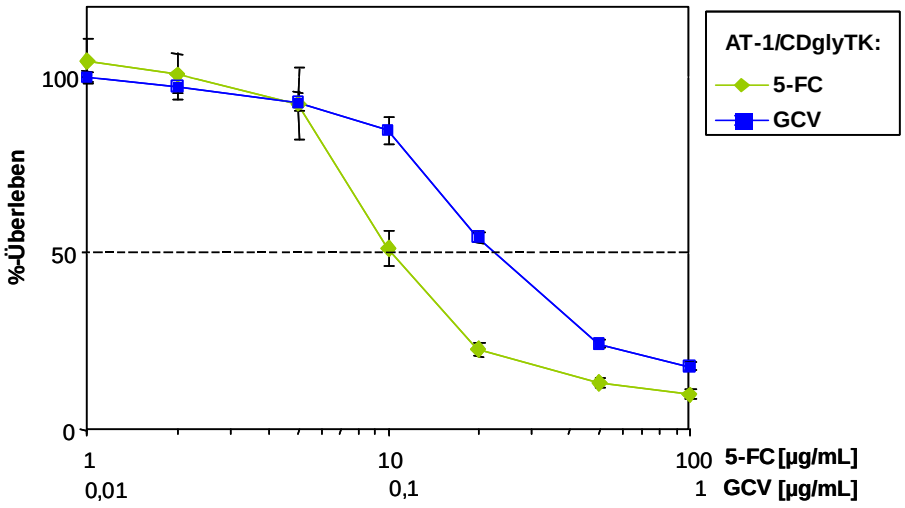


Abb. 3.4: Darstellung des prozentualen Zellüberlebens der AT-1/CDglyTK Zellen bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von 5-Fluorocytosin und Ganciclovir nach 144 h Inkubation. Eingetragen ist die Standardabweichung einer unabhängigen Vierfach-Bestimmung, berechnet nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauß (s Kapitel 2.8.1).

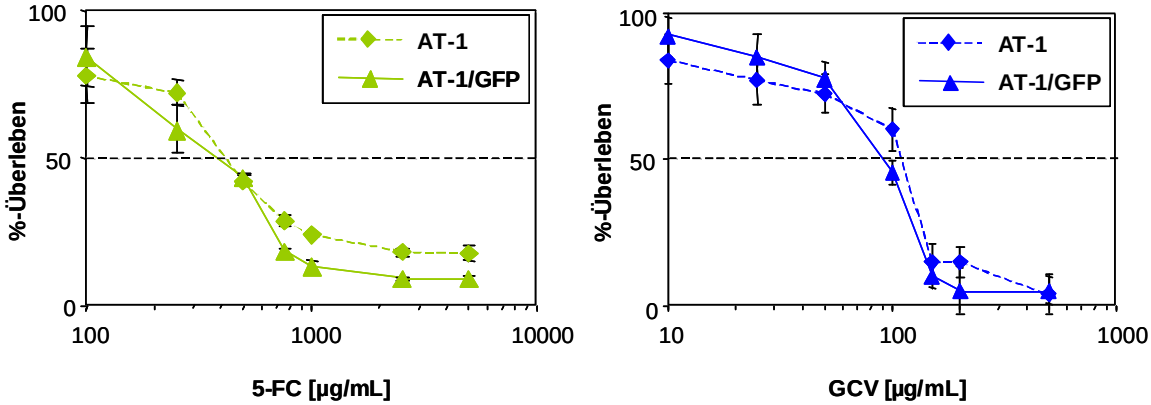


Abb. 3.5: Darstellung des prozentualen Zellüberlebens der AT-1 und AT-1/GFP Zellen bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von 5-Fluorocytosin und Ganciclovir nach 144 h Inkubation. Eingetragen ist die Standardabweichung einer unabhängigen Vierfach-Bestimmung, berechnet nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauß (s Kapitel 2.8.1).

Tabelle 3.2: *In vitro* Zytotoxizität der Pro-Drugs und deren therapeutischer Index

	IC_{50} *			**Therapeutischer Index ****	
Zellen Dunning R3327	**AT-1**	**AT-1/ GFP**	**AT-1/ CDglyTK**	**AT-1**	**AT-1/ GFP**
5-Fluorocytosin	400 µM	400 µM	77,5 µM	5,2	5,2
Ganciclovir	421 µM	372 µM	1 µM	421	372

***** **IC_{50}** ist definiert als die Konzentration einer Pro-Drug, die notwendig ist, um 50% der Zellpopulation zu töten

**** Therapeutischer Index**, ist der Quotient aus der IC_{50} der nicht suizidgen-tragenden Zelllinien durch die IC_{50} der suizigen-tragenden Zelllinie AT-1/CDglyTK

Es ist zu beobachten, dass die AT-1/CDglyTK Zellen sensitiver auf eine Behandlung mit den Pro-Drugs 5-FC und GCV reagieren als die AT-1 und AT-1/GFP Zellen.

Der therapeutische Index ist der Quotient aus der IC_{50} der nicht suizidgen-tragenden Zelllinien durch die IC_{50} der suizidgen-tragender Zelllinie AT-1/CDglyTK. Er gibt Auskunft über mögliche Nebenwirkungen während einer Therapie. Je größer der Index, desto geringer sind die zu erwartenden

Nebenwirkungen bei gleichzeitig höherer Tumorwirkung. Aus Tabelle 3.2 ist ersichtlich, dass bei Therapie mit 5-FC eher mit Nebenwirkungen zu rechnen ist, da hier der therapeutische Index mit 5,2 im Vergleich zu der GCV Therapie sehr klein ist.

3.2 Wirksamkeit der Pro-Drugs auf AT-1/CDglyTK Tumore *in vivo*

Im vorherigen Kapitel wurde die Sensitivität der AT-1/CDglyTK Zellen auf ihre Pro-Drugs *in vitro* bestimmt. Im folgenden sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Applikation der Pro-Drugs als Einzeltherapie und als Kombinationstherapie auf einen AT-1/CDglyTK Tumor und auf das Tier hatten.

Zur Bestimmung des therapeutischen Effekts der Systeme CD/5-FC und TK/GCV wurden $1*10^6$ AT-1/CDglyTK Zellen subkutan auf den Oberschenkel männlicher Copenhagen Ratten inokuliert. Die Behandlung der Tiere begann bei Erreichen eines Tumorvolumens von ca. 300 mm^3 (ungefähr 8-12 Tage nach Inokulation). Folgende Gruppeneinteilung wurde vorgenommen:

1. Keine Behandlung [n = 5]
   (Gruppe: keine Behandlung)
2. i.p. Injektion von 1mL physiol. Kochsalzlösung [n = 5]
   (Gruppe: NaCl)
3. i.p. Injektion von 500 mg/kg Körpergewicht
   5-Fluorocytosin [n = 7]
   (Gruppe: 5-FC)
4. i.p. Injektion von 30 mg/kg Körpergewicht Ganciclovir [n = 6]
   (Gruppe: GCV)
5. i.p. Injektion von 500 mg/kg 5-FC & 30 mg/kg Körpergewicht
   GCV [n = 7]
   (Gruppe: 5-FC & GCV).

Die Medikamente wurden einmal täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen gegeben. Dreimal wöchentlich wurde das Tumorvolumen bestimmt.

Während der Behandlung mit den Pro-Drugs zeigten alle Tiere einen Rückgang des Tumors (Abb. 3.6). Eine Therapie mit 5-Fluorocytosin, Ganciclovir oder beiden Pro-Drugs gleichzeitig führt zu lokalen Tumorkontrollen in den 100% transduzierten AT-1/CDglyTK Tumoren.

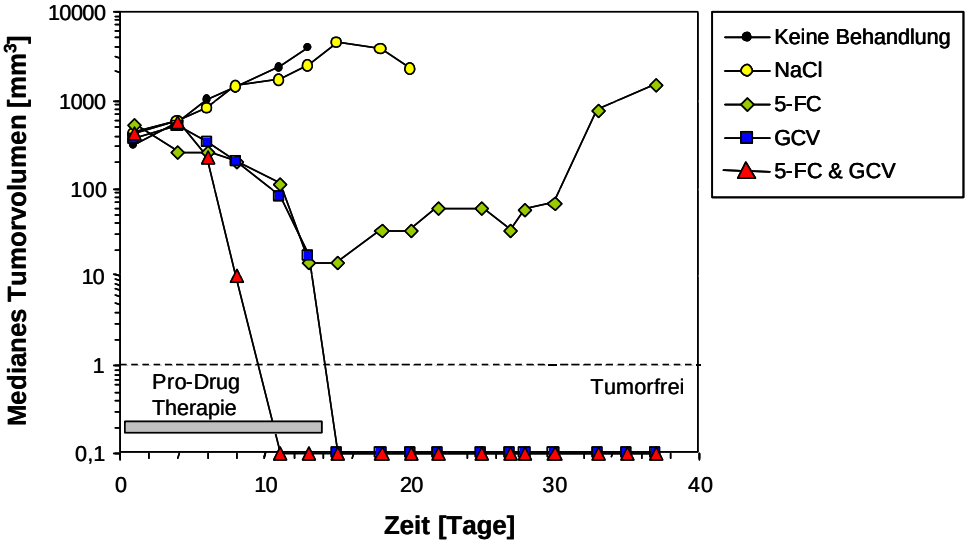


Abb. 3.6: Wirksamkeit von 5-FC, GCV und der Kombination 5-FC & GCV auf subkutane AT-1/CDglyTK Tumore. Die tägliche Injektion von 5-FC (500 mg/kg), GCV (30 mg/kg) und 5-FC (500mg/kg) & GCV (30 mg/kg) zusammen startete am Tag 1 (? 300 mm^3) und wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen fortgesetzt. Gezeigt ist das mediane Tumorvolumen von 5 Ratten aus den Gruppen ohne Behandlung und mit NaCl-Injektion, von 6 Ratten aus der Gruppe GCV und von 7 Ratten aus den Gruppen 5-FC und 5-FC & GCV.

Um die Signifikanz der Behandlung darzustellen, wurden die Daten einer Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier unterzogen. Als Endpunkt wurde das Überleben bei T_5 herangezogen. Aus der Abbildung 3.7 wird ersichtlich, dass nach Beendigung der 14-tägigen Therapie 3 von 7 Ratten in der Gruppe 5-FC einen Tumorrückgang, aber keine lokale Tumorkontrolle zeigten. Die Tumore begannen wieder zu wachsen, als kein 5-FC mehr injiziert wurde. Das gleiche wurde bei einem Tier aus der Gruppe GCV beobachtet. Im Gegensatz zur 5-FC & GCV Gruppe, bei der nach 11 Tagen Behandlung kein Tumor mehr

nachweisbar war. Bei den Tumoren, die lokale Tumorkontrollen aufwiesen, konnte in den darauffolgenden 180 Tagen keine Rezidiv-Bildung beobachtet werden (Tabelle 3.3). Zudem ist in der kumulativen Überlebensanalyse zu sehen, dass allein durch die Gabe von Kochsalzlösung ein verzögertes Tumorwachstum im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe auftritt. Die mediane Überlebenszeit beträgt für die unbehandelte Gruppe 8,5 Tage und für die NaCl-Gruppe 18,5 Tage.

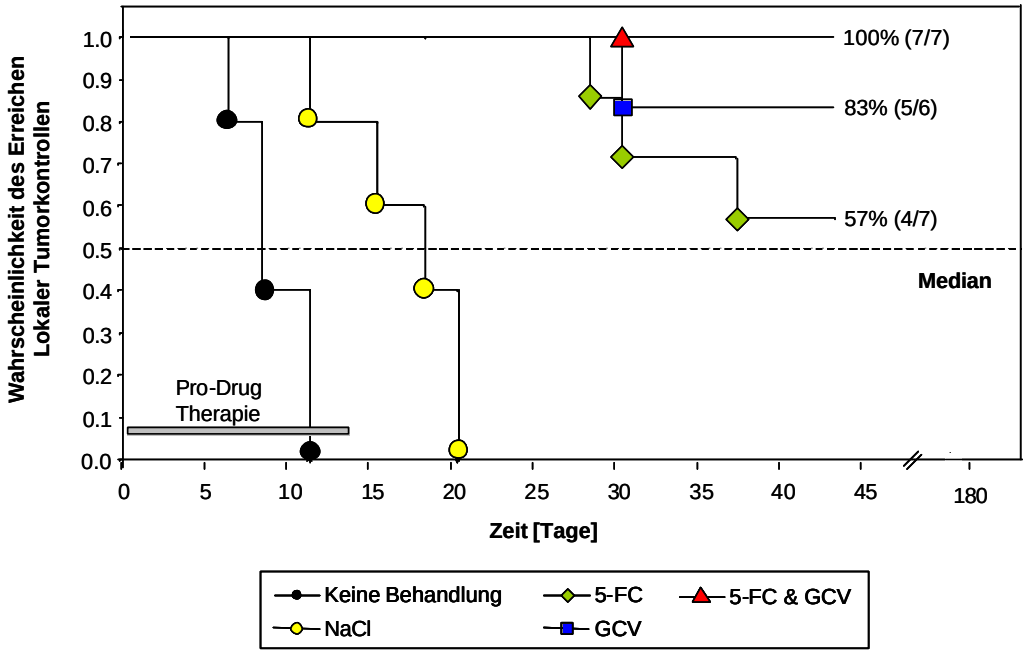


Abb. 3.7: Kumulative Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier von subkutanen AT-1/CDglyTK Tumoren. Endpunkt war das Überleben bei T_5.

Tabelle 3.3: Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit von 5-FC, GCV und 5-FC & GCV auf subkutane AT-1/CDglyTK Tumore

Behandlung	Anzahl der Tiere	Prozentsatz tumorfreier Tiere nach 180 Tagen Beobachtungszeit
Keine Behandlung	5	0% (0/5)
NaCl	5	0% (0/5)
5-FC	7	57% (4/7)
GCV	6	83% (5/6)
5-FC & GCV	7	100% (7/7)

Über einen Log-Rank Test (s. Kapitel 2.8.3) wurde eine biologische Signifikanz zwischen der unbehandelten Gruppe und der NaCl-Gruppe von p = 0,0084 und zwischen der NaCl-Gruppe und der 5-FC Gruppe von p = 0,0005 ermittelt.

Auffällig war, dass die Tiere aus den Gruppen mit Pro-Drug Gabe während der Behandlung unter starker Gewichtsabnahme litten (Abb. 3.8).

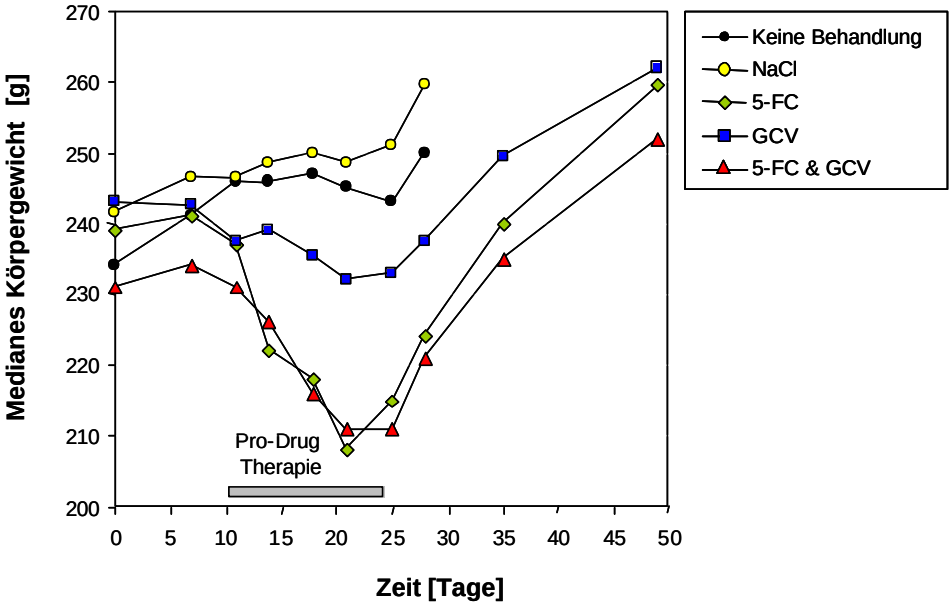


Abb. 3.8: Einfluss der Therapie auf das Körpergewicht der behandelten Ratten, die einen 100%-igen AT-1/CDglyTK Tumor trugen. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass 5-Fluorocytosin und die Kombination aus 5-FC & GCV zu starken Gewichtsverlusten bei den Ratten führten.

Die Gewichtsabnahme wird jedoch nicht durch die entstehenden toxischen Metabolite hervorgerufen, da auch bei der Behandlung von 100%-igen AT-1/GFP Tumoren eine Gewichtsabnahme zu beobachten war (Abb. 3.9). Daraus lässt sich schließen, dass die Gabe von 5-FC die starke Gewichtsabnahme verursacht.

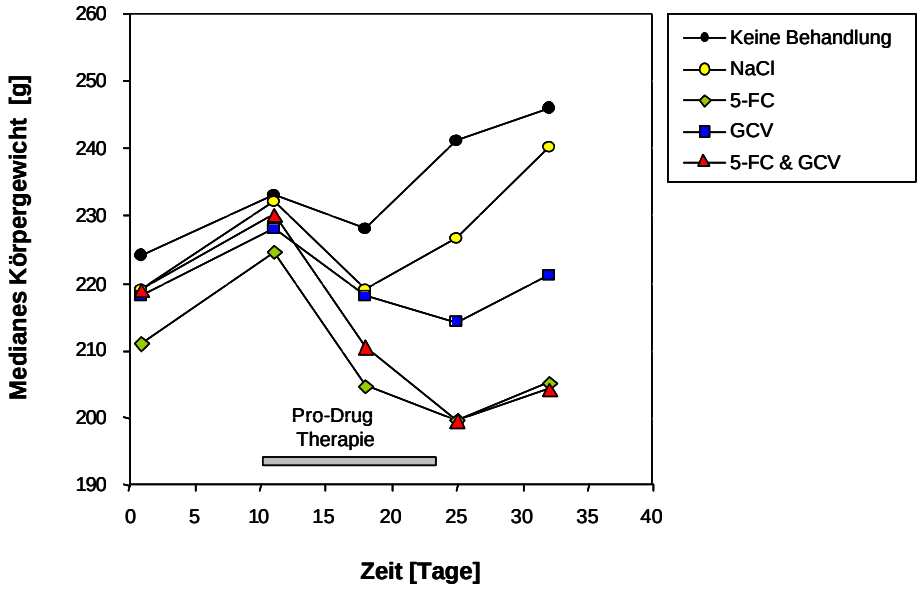


Abb. 3.9: Einfluss der Pro-Drug Therapie auf das Körpergewicht behandelter Ratten, die einen 100%-igen AT-1/GFP Tumor trugen. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass 5-Fluorocytosin und die Kombination von 5-FC & GCV zu starken Gewichtsverlusten bei den Ratten führten, dies aber nicht auf die entstehenden Drugs zurückzuführen ist, da diese in diesem Tumor nicht gebildet werden können.

Da es keine Daten über eventuelle Nebenwirkungen durch die Gaben von 5-FC als Suspension gibt, wurde bei allen Tieren eine Sektion durchgeführt, um eventuelle Spätfolgen auszuschließen. Zum einem wurde überprüft, ob sich Metastasen gebildet hatten, und zum anderen wurden Leber und Niere für eine histologische Untersuchung entnommen.

Das Sektionsergebnis zeigte, dass sich bei zwei Tieren in der Bauchhöhle ein weiterer Tumor gebildet hatte. Am histologischen „Schnitt“ der Leber und der Niere konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Herr Dr. Ammelung, Abteilung Experimentell Pathologie) (Abb. 3.10). Folglich hat die Gabe der Pro-Drugs und insbesondere die Gabe von 5-FC als Suspension keine morphologischen Veränderungen hervorgerufen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Doppelt-Suizidgentherapie effektiver ist als die jeweilige Mono-Therapie im AT-1 Prostata Tumormodell. Auch die Gabe einer 5-FC-Suspension zeigt keine makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen bei Copenhagen Ratten.

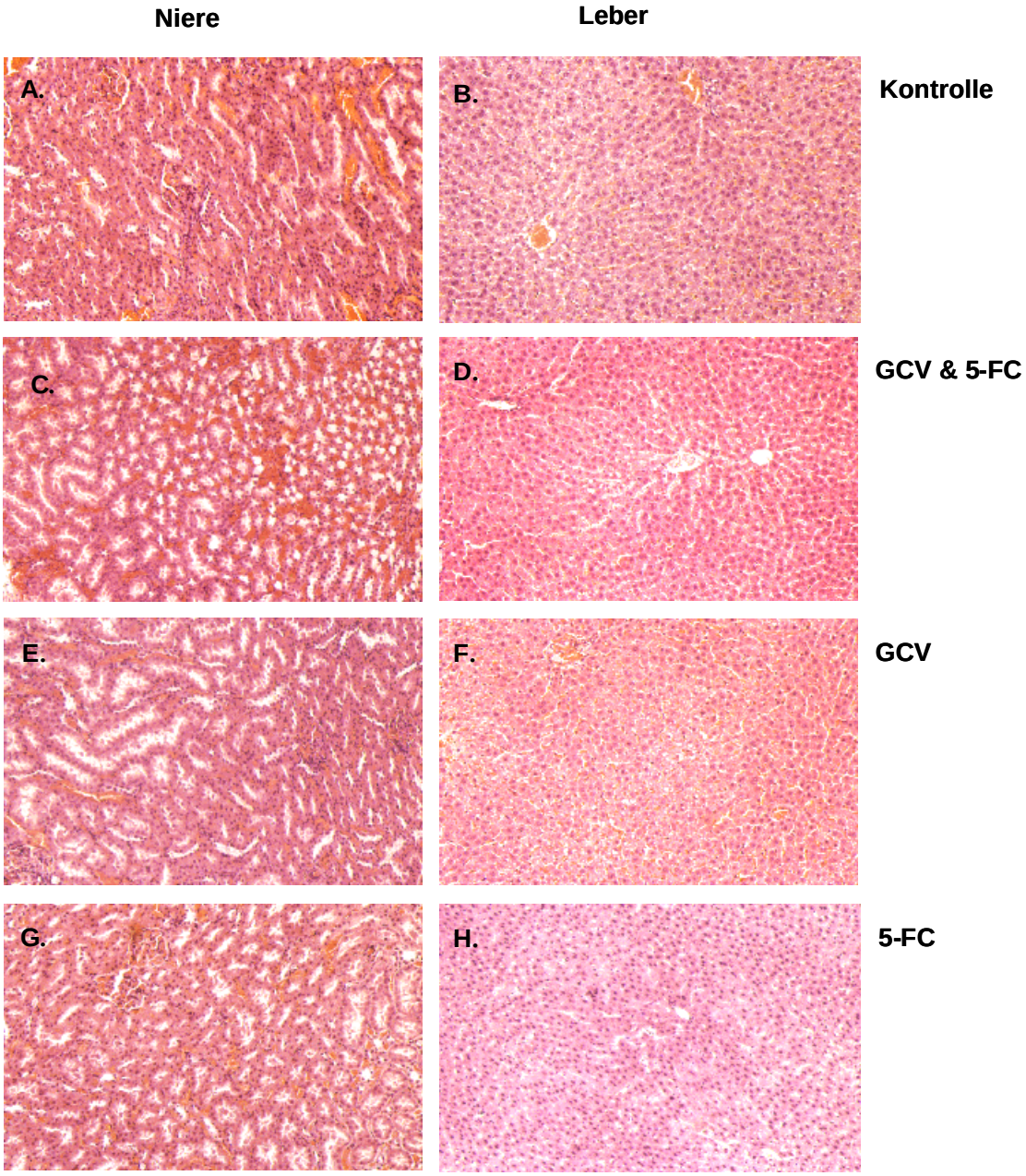


Abb. 3.10: HE-Färbungen von Niere und Leber im Paraffinschnitt. **(A.)** Niere und **(B.)** Leber einer Kontrollratte, die nicht an der Behandlung teilgenommen hat. **(C.)** Niere und **(D.)** Leber einer Ratte, die über 14 Tage einmal täglich 30 mg/kg Ganciclovir und 500 mg/kg 5-Fluorocytosin injiziert bekommen hat. **(E.)** Niere und **(F.)** Leber einer Ratte, die über einen Zeitraum von 14 Tagen 30 mg/kg Ganciclovir i.p. erhalten hat. **(G.)** Niere und **(H.)** Leber einer Ratte, die über einen Zeitraum von 14 Tagen 500 mg/kg 5-Fluorocytosin i.p. injiziert bekommen hat.

3.3 Lokaler-Bystander-Effekt *in vivo*

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob ein Bystander-Effekt von den AT-1/CDglyTK Zellen auf nicht suizidgen-tragende Zellen ausgeübt werden kann. Hierzu wurden zuerst die *in vivo* Eigenschaften und die Reaktion auf eine Pro-Drug Therapie der nicht suizidgen-tragenden AT-1/GFP Zelllinie untersucht. Es wurde eine morphologische Analyse durchgeführt, die dazu diente, die Anzahl $CDglyTK^+$ Zellen in einem Gemisch aus AT-1/GFP Zellen mit AT-1/CDglyTK Zellen zu bestimmen. Anschließend wurde eine Pro-Drug Therapie an gemischten Tumoren aus AT-1/GFP mit AT-1/CDglyTK Zellen durchgeführt.

3.3.1 *In vivo* Untersuchungen der AT-1/GFP Zelllinie

Zur Untersuchung des Bystander-Effektes innerhalb einer Zellmischpopulation sind analoge Verdopplungszeiten der beiden Zelllinien notwendig, um ein Überwuchern von einer Zelllinie zu vermeiden. Aufgrund der *in vitro* ermittelten Verdopplungszeiten (s. Kapitel 3.1.1) wurde die AT-1/GFP Zelllinie anstatt der Stammzelllinie AT-1 zur Untersuchung des Bystander-Effektes gewählt, da diese ähnliche Verdopplungszeiten *in vitro* wie die AT-1/CDglyTK Zelllinie aufweist.

Da aber jede Veränderung der AT-1 Stammzelllinie dazu führen kann, dass diese Zellen für die Tiere immunogen werden, wurden in einem Vorversuch $1*10^6$ AT-1/GFP Zellen auf den Oberschenkel von Copenhagen Ratten inokuliert. Die Zellen haben innerhalb von 11 Tagen einen Tumor mit einem Volumen von ca. 300 mm^3 gebildet. Es kam zur keiner spontanen Remission und die AT-1/GFP Tumore sind innerhalb von 25 Tagen auf ein Tumorvolumen von ca. 3000 mm^3 herangewachsen. Parallel hierzu wurden noch Wachstumskurven der drei verschiedenen Zelllinien aufgenommen (Abb. 3.11.), um sicherzustellen, dass die Wachstumsgeschwindigkeiten von AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK *in vivo* nicht voneinander abweichen.

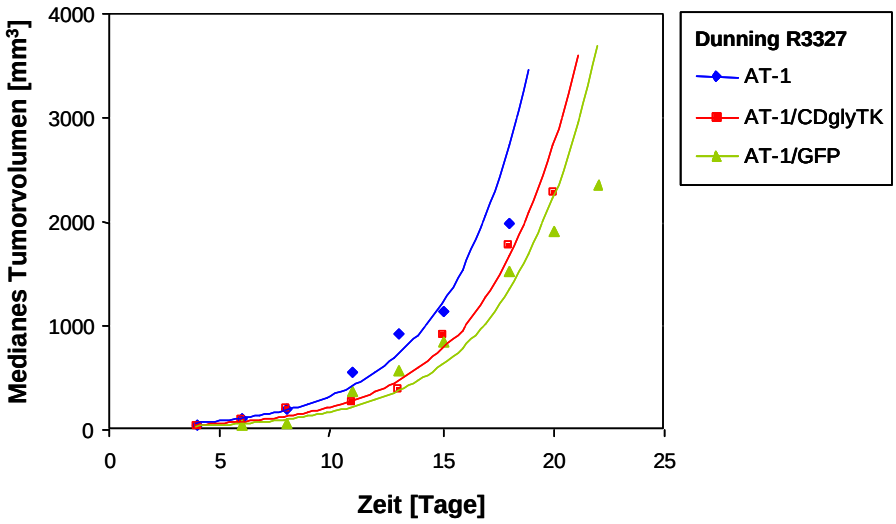


Abb. 3.11: Vergleich des Tumorwachstums von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Tumoren *in vivo*

Tabelle 3.4: Berechnung der Verdopplungszeit von AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Tumoren

Tumor	Anzahl der Tiere	Exponentielle Regression ($Y = a * e^{b*X}$)	Regressions-koeffizient (r^2)	Verdopplungszeit
AT-1	6	$Y = 50 * e^{0,2654 X}$	0,97	2,6 d *
AT-1/CDglyTK	5	$Y = 17 * e^{0,2527 X}$	0,97	2,7 d
AT-1/GFP	6	$Y = 29 * e^{0,2573 X}$	0,93	2,7 d

* Literatur: 2,5 d ? 0,1 d [Cooke et al., 1988]

Es konnte gezeigt werden, dass die AT-1/GFP Zellen wie AT-1 Zellen auf den Copenhagen Ratten wachsen, und dass es an der Injektionsstelle zu keiner inflammatorischen Immunreaktion kommt (keine Hautrötung). Auch die Tumorverdopplungszeit der AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Tumore ist mit 2,7 Tagen gleich (Tabelle 3.4). Man kann nun davon ausgehen, dass beim Mischen keine der beiden Zelllinien die andere überwachsen kann.

Das „green fluorescent protein (GFP)“ hat den Vorteil, dass es direkt nachweisbar ist. Bei den ersten Tumorpräparationen zeigte sich jedoch, dass keine Fluoreszenz im Kryoschnitt nachweisbar war. Um zu überprüfen, ob die Kryokonservierung einen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaft des Proteins hat, wurde ein *in vitro* Experiment durchgeführt. Hierzu wurden auf sterilen Deckgläsern AT-1/GFP Zellen kultiviert. Die bewachsenen Deckgläser wurden zum einen für 60 sek. in flüssigen Stickstoff und zum anderen für 60 sek. in –80°C kaltes Isopentan getaucht. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Probe. Um jegliche weitere chemische Reaktion mit eventuellen Eindeckmitteln zu verhindern, wurden die Präparate nur in 1x PBS eingedeckt und sofort mikroskopiert. Es stellte sich heraus, dass die AT-1/GFP Zellen ihre grüne Fluoreszenzeigenschaft aufgrund der Kälteeinwirkung verlieren und diese auch nicht wieder bei Erwärmen erlangen. Ob es sich hierbei um eine irreversible Denaturierung des GFPs handelt, wurde nicht geklärt.

Ein direkter Nachweis des GFPs in AT-1/GFP Tumoren aufgrund seiner Fluoreszenz ist somit nicht möglich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die AT-1/GFP Zelllinie *in vivo* stabil ist und die GFP-Expression nicht verliert, da GFP im nativen Quetschpräparat, im Paraffinschnitt, sowie durch den immunhistologischen Nachweis im Kryoschnitt (s. Kapitel 2.6.4) nachweisbar war (Abb. 3.12).

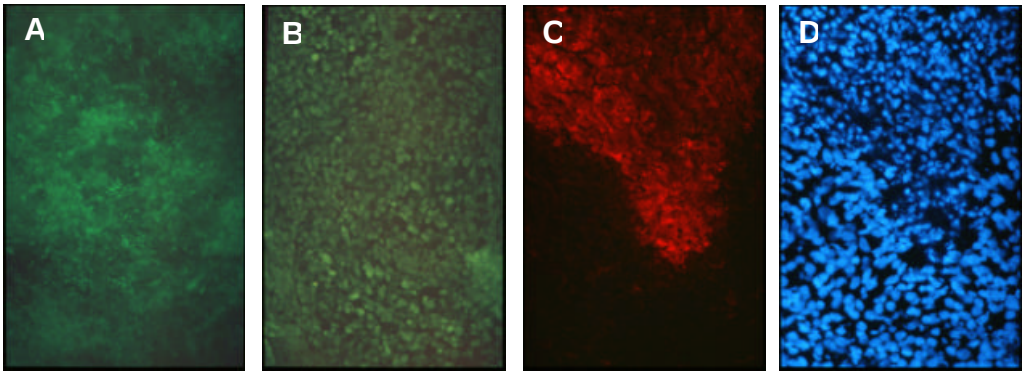


Abb. 3.12: Nachweis des „green fluorescent protein (GFP)“ im nativen Quetschpräparat **(A.)**, im Paraffinschnitt mit nativer GFP-Fluoreszenz **(B.)** und im Gefrierschnitt über einen immunhistologischen Nachweis mit einem GFP-Antikörper **(C.)** und die entsprechend DAPI-Gegenfärbung **(D.)**.

3.3.2 Einfluss der Pro-Drugs auf nicht suizidgen-tragende Zellen *in vivo*

Um den Bystander-Effekt in einem System zu testen, muss vorher ausgeschlossen werden, dass die nicht suizidgen-tragenden Zellen sensitiv auf die Pro-Drug Therapie reagieren. Hierzu wurden $1*10^6$ AT-1/GFP Zellen subkutan auf das Bein von Copenhagen Ratten injiziert. Bei Erreichen eines Tumorvolumens von 300 mm^3 wurden über einen Zeitraum von 14 Tage die Pro-Drugs appliziert. Folgende Gruppen-Einteilung wurde vorgenommen:

1. Keine Behandlung [n = 8]
   (Gruppe: keine Behandlung)
2. i.p. Injektion von 1mL physiol. Kochsalzlösung [n = 9]
   (Gruppe: NaCl)
3. i.p. Injektion von 500 mg/kg Körpergewicht
   5-Fluorocytosin [n = 8]
   (Gruppe: 5-FC)
4. i.p. Injektion von 30 mg/kg Körpergewicht Ganciclovir [n = 10]
   (Gruppe: GCV)
5. i.p. Injektion von 500 mg/kg 5-FC & 30 mg/kg Körpergewicht
   GCV [n = 7]
   (Gruppe: 5-FC & GCV).

Einmal wöchentlich wurden die Tiere gewogen und dreimal die Woche wurde das Tumorvolumen bestimmt. Als biologischer Endpunkt wurde das Erreichen von T_5 definiert.

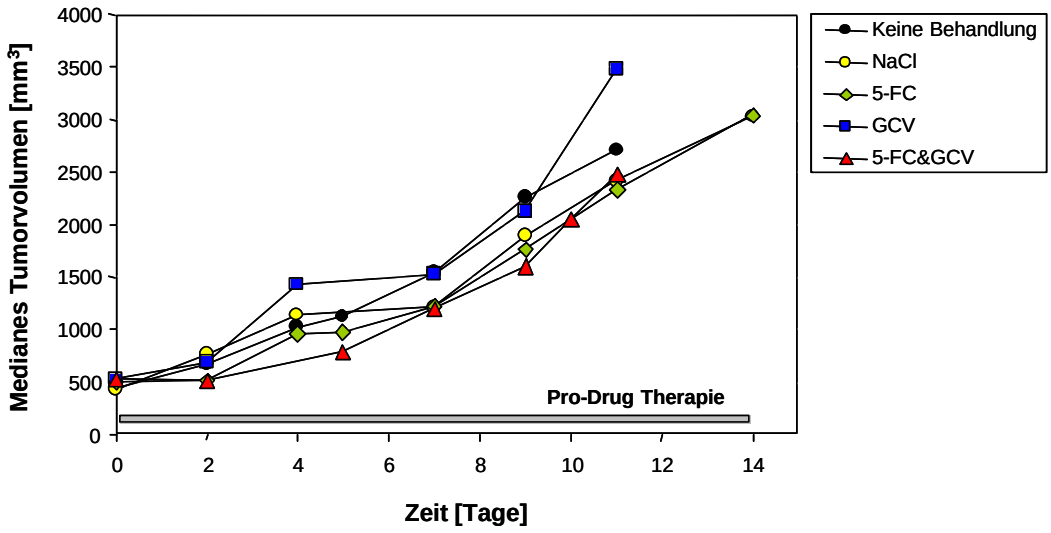


Abb. 3.13: Medianes Tumorvolumen von AT-1/GFP Tumoren während einer Pro-Drug Therapie.

Wie aus Abbildung 3.13 ersichtlich ist, kann kein Einfluss der Pro-Drugs auf das Wachstum der AT-1/GFP Tumore beobachtet werden. Die therapierten Gruppen zeigen das gleiche Tumorwachstum wie die unbehandelten Gruppen. Während der Behandlungsphase ist eine Gewichtsabnahme bei den Tieren zu beobachten. Da die meisten Tiere sofort nach Beendigung der 14-tägigen Therapie getötet wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sie wieder an Gewicht zugenommen hätten, wie in Kapitel 3.2. Bei keinem der Tiere konnte während der Sektion eine spontane Tumorbildung in der Bauchhöhle festgestellt werden.

Das mediane Überleben der AT-1/GFP tumortragenden Ratten bezogen auf den biologischen Endpunkt T_5 beträgt für die unbehandelte Kontrolle 10 Tage, für die NaCl- und 5-FC-Gruppe 12 Tage, für die GCV-Gruppe 11,5 Tage und für die Gruppe, die beide Pro-Drugs erhalten hat, 13 Tage (Tabelle 3.5 und Abb. 3.14).

Tabelle 3.5: Statistische Angaben des medianen Überlebens von 100%-igen AT-1/GFP tumortragenden Copenhagen Ratten

Gruppe	Maximum (100%)	Quartile Q_3 (75%)	Median Q_2 (50%)	Quartile Q_1 (25%)	Minimum (0%)	Range
Keine Behandlung n = 8	13	10	**10**	7,5	7	6
NaCl n = 9	17	14	**12**	10	6	11
5-FC n = 8	17	13	**12**	11	10	7
GCV n = 10	18	17	**11,5**	11	9	9
5-FC&GCV n = 7	16	14	**13**	10	9	7

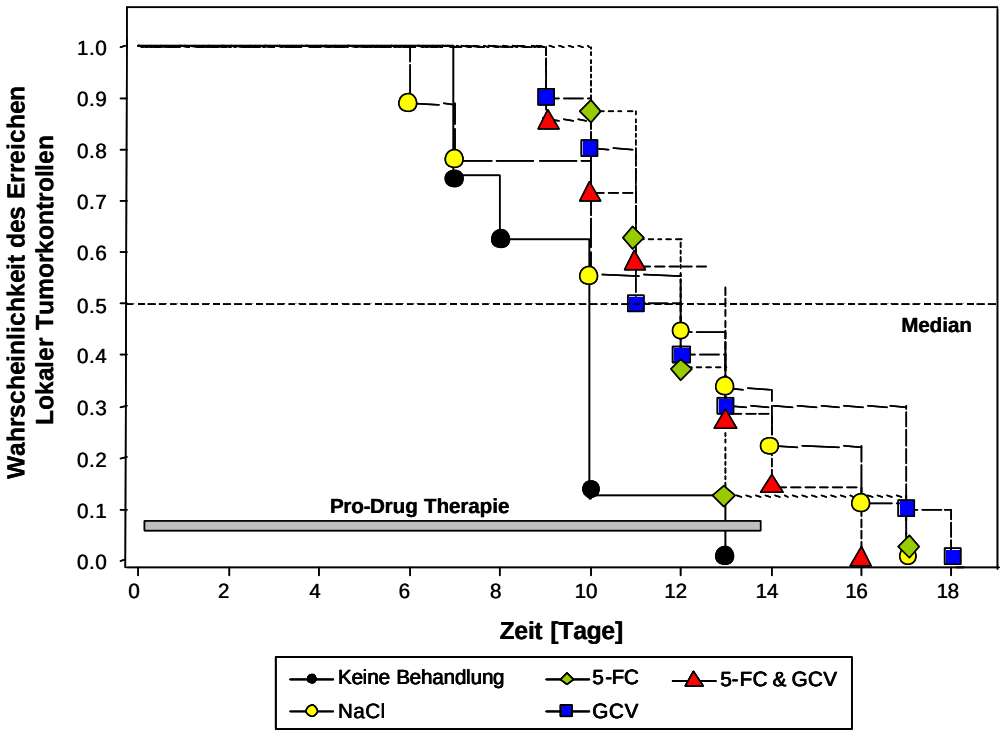


Abb. 3.14: Wahrscheinlichkeit des Erreichens lokaler Tumorkontrollen berechnet nach Kaplan-Meier für AT-1/GFP Tumore unter einer Pro-Drug Therapie. Endpunkt war das Erreichen von T_5.

3.3.3 Morphologische Untersuchungen zur Bestimmung des Verhältnisses AT-1/GFP zu AT-1/CDglyTK bei unterschiedlichen Zellmischungsverhältnissen *in vivo*

Für die Untersuchung des Lokalen-Bystander-Effektes muss das genaue Verhältnis von CDglyTK$^+$ Zellen zu den nicht suizidgen-tragenden GFP Zellen bekannt sein. Aus diesem Grund wurden bei je 5 männlichen Copenhagen Ratten 100% AT-1/GFP Zellen, 50% AT-1/GFP & 50% AT-1CDglyTK und 90% AT-1/GFP & 10% AT-1/CDglyTK inokuliert. Nach 10 Tagen war der Tumor auf ein Volumen von 300 bis 600 mm^3 herangewachsen. Daraufhin wurden die Tiere getötet, die Tumore entnommen und jeweils eine Hälfte kryokonserviert bzw. fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurde ein immunhistologischer Nachweis mittels eines anti-Cytosin Deaminase Antikörpers durchgeführt (s. Kapitel 2.6.2). Die Auswertung erfolgte an einem Morphometriegerät der Firma Leitz, bei dem jeder Schnitt in 5 x 5 gleich große Felder (=25) unterteilt und die CD-positiven Zellen markiert wurden. Über ein Computerprogramm wurde anschließend das Verhältnis CD-positiver Flächen zu CD-negativen Flächen ermittelt (Abb. 3.15).

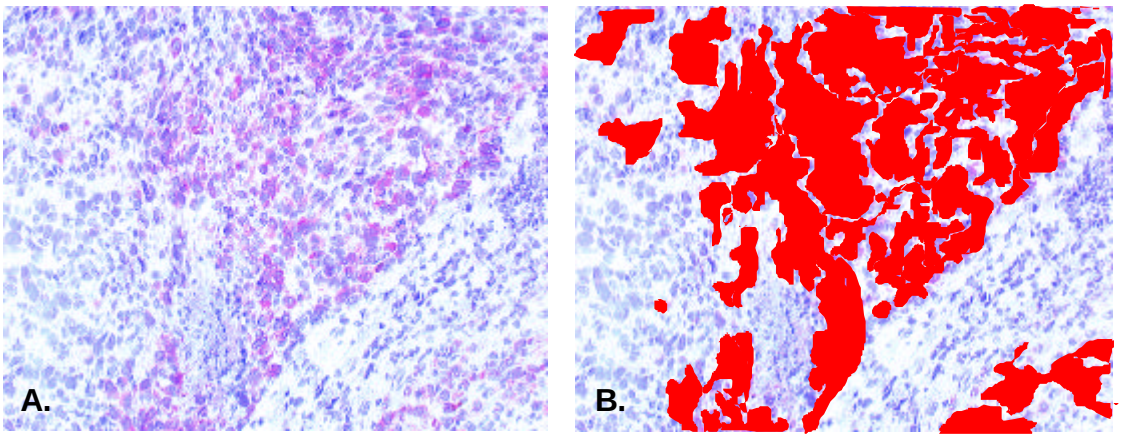


Abb. 3.15: Digitale Darstellung eines 50% AT-1/GFP & 50% AT-1/CDglyTK Tumors. **(A.)** Immunhistochemisch angefärbte CDglyTK$^+$ Zellen. **(B.)** Gleicher Ausschnitt nach manueller, interaktiver Markierung positiver Areale. Die hieraus resultierenden Areale wurden für die Berechnung herangezogen.

Für den Vergleich der Werte wurde eine Varianzanalyse nach Duncan durchgeführt. Die Messergebnisse von zwei Tieren mit einem Mischungsverhältnis 50/50 und von drei Tieren mit einem Mischungsverhältnis von 90/10 sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Statistische Daten der morphometrischen Bestimmung zur Anzahl AT-1/CDglyTK positiver Zellen

Gruppe	Tier	Anzahl Flächen	Durchschnitt	SD *	SEM **	Minimum	Maximum
50/50	6	20	29,3	21,2	4,74	1,48	90,9
50/50	7	25	24,9	13,3	2,65	3,93	56,8
			? **27,1**				
90/10	11	11	11,5	9,27	2,79	4,87	37,2
90/10	12	7	7,91	3,40	1,28	2,68	12,4
90/10	15	25	5,67	4,99	1,00	0,79	25,3
			? **8,36**				

* SD = Standardabweichung
** SEM = Standardfehler

Aus der Gruppe 50/50 wurde eine durchschnittliche Anzahl positiver Zellen von 27% ermittelt. Dass die Menge so gering war, lässt sich auf die Meßmethode zurückführen. Es war sehr schwierig, die große Anzahl einzelner positiver Zellen im Gewebeverband zu bestimmen, da diese sehr stark verteilt waren. Somit war die markierte Anzahl geringer, als man in Wirklichkeit gesehen hat. Einfacher war es, die Verteilung im 90/10 Tumor zu bestimmen. Hier gab es mehr positiv Areale als einzelne Zellen, die über den Tumor verteilt waren. Somit beträgt hier die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen 8,4% (Tabelle 3.6).

Für nachfolgende Misch-Versuche wurden 80% AT-1/GFP Zellen und 20% AT-1/CDglyTK Zellen eingesetzt, so dass bei einem Tumorvolumen von 300 mm^3 von einer Anzahl $CDglyTK^+$ Zellen zwischen 10 und 20% ausgegangen werden konnte.

3.3.4 Bystander-Effekt der AT-/CDglyTK Zellen auf AT-1/GFP Zellen *in vivo*

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die transduzierten AT-1/CDglyTK Zellen in der Lage sind, einen Bystander-Effekt auf ihre benachbarten, nicht suizidgen-tragenden Zellen auszuüben. Hierzu wurden 20% Pro-Drug sensitive Zellen (AT-1/CDglyTK) mit 80% Pro-Drug unempfindlichen Tumorzellen (AT-1/GFP) gemischt. Das Zellgemisch ($1*10^6$) wurde subkutan Copenhagen Ratten inokuliert und bei Erreichen eines Tumorvolumens von 300 mm^3 eine 14-tägige Pro-Drug Therapie verabreicht. Folgende Einteilung der Gruppen wurde vorgenommen:

1. Keine Behandlung [n = 9]
   (Gruppe: keine Behandlung)
2. i.p. Injektion von 1mL physiol. Kochsalzlösung [n = 8]
   (Gruppe: NaCl)
3. i.p. Injektion von 500 mg/kg Körpergewicht
   5-Fluorocytosin [n = 9]
   (Gruppe: 5-FC)
4. i.p. Injektion von 30 mg/kg Körpergewicht Ganciclovir [n = 10]
   (Gruppe: GCV)
5. i.p. Injektion von 500 mg/kg 5-FC & 30 mg/kg Körpergewicht
   GCV [n = 17]
   (Gruppe: 5-FC & GCV).

Einmal wöchentlich wurden die Tiere gewogen und dreimal die Woche wurde das Tumorvolumen bestimmt.

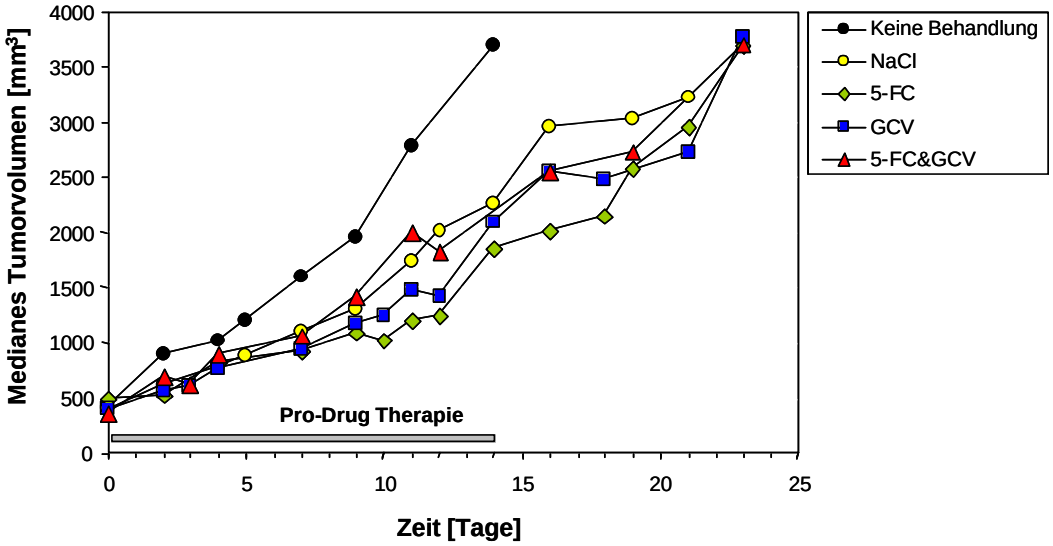


Abb. 3.16: Medianes Tumorvolumen von 80% AT-1/GFP mit 20% AT-1/CDglyTK Tumore unter einer Pro-Drug Behandlung.

Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe kam es lediglich zu einer Wachstumsverzögerung, nicht zu einer lokalen Kontrolle der Tumore (Abb. 3.16).

Tabelle 3.7: Statistische Angaben des medianen Überlebens von gemischten Tumoren, bestehend aus 80% AT-1/GFP und 20% AT-1/CDglyTK, unter einer Pro-Drug Therapie

Gruppe	Maximum (100%)	Quartile Q_3 (75%)	Median Q_2 (50%)	Quartile Q_1 (25%)	Minimum (0%)	Range
Keine Behandlung n = 9	13	12	**11**	10	4	9
NaCl n = 8	16	15	**13,5**	7	5	11
5-FC n = 9	21	16	**14**	14	12	9
GCV n = 10	19	16	**15**	12	8	11
5-FC&GCV n = 17	20	16	**13**	11	9	11

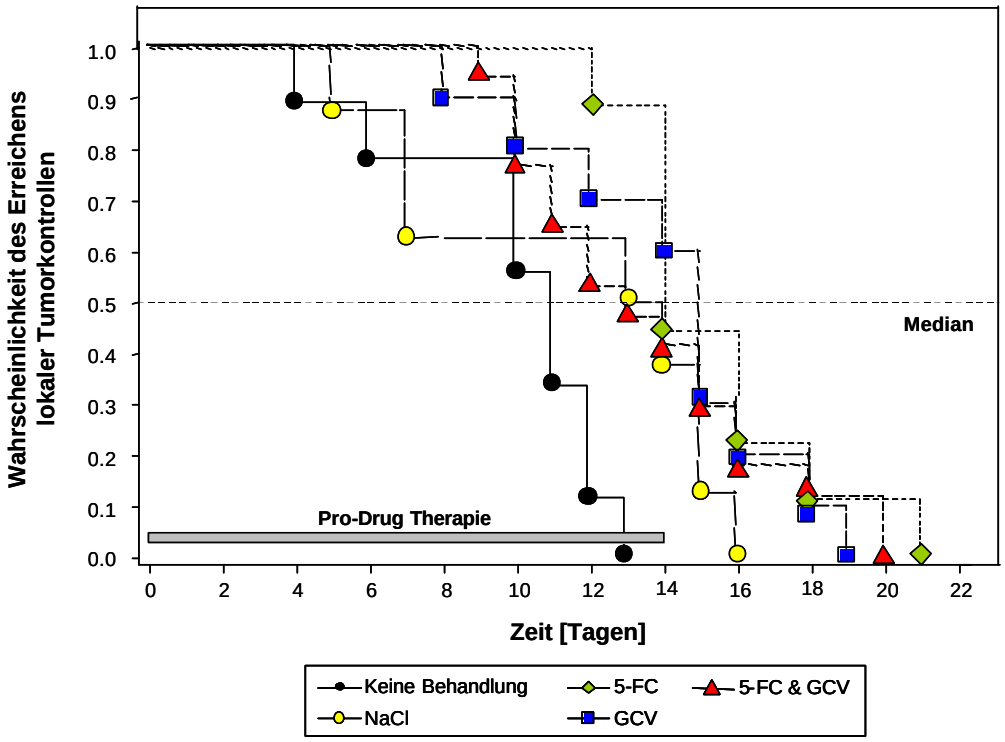


Abb. 3.17: Wahrscheinlichkeit des Erreichens lokaler Tumorkontrollen berechnet nach Kaplan-Meier für gemischte AT-1/GFP Tumoren mit AT-1/CDglyTK Zellen unter einer Pro-Drug Therapie. Endpunkt war das Erreichen von T_5.

Aus der Kaplan-Meier Darstellung (Abb. 3.17) ist zu ersehen, dass das mediane Überleben beim biologischen Endpunkt T_5 der unbehandelten Gruppe bei 11 Tagen, der NaCl-Gruppe bei 13,5 Tagen, der Kombinations-Gruppe bei 13 Tagen, der 5-FC-Gruppe bei 14 Tagen und der GCV-Gruppe bei 15 Tagen liegt (Tabelle 3.7).

Vergleicht man die medianen Überlebensraten aus den Kapiteln 3.2 und 3.3 (Tabelle 3.8), so zeigt sich, dass im AT-1 Prostata Tumormodell kein Bystander-Effekt von den AT-1/CDglyTK Zellen ausgeübt wird.

Tabelle 3.8: Vergleich des medianen Überlebens der Tiere bei unterschiedlichen, genmodifizierten AT-1 Tumoren.

	Medianes Überleben [Tagen]				
	Unbehandelte Kontrolle	**NaCl**	**5-FC**	**GCV**	**5-FC & GCV**
100% AT-1/CDglyTK	8,5	18,5	180 *	180 *	180 *
100% AT-1/GFP	10	12	12	11	13
80% AT-1/GFP 20% AT-1/CDglyTK	11	13	14	15	13

* Beobachtung abgebrochen; Tiere wurden getötet

3.4 Der Bystander-Effekt im Thymidinkinase / Ganciclovir System

Warum es zu keinem Bystander-Effekt *in vivo* kam, sollte nun in diesem und auch im darauffolgenden Kapitel untersucht werden. Zur Ausbildung eines Bystander-Effektes im TK/GCV-System sind funktionsfähige Gap-junctions notwendig. Ob der AT-1 Tumor und auch der modifizierte Tumor überhaupt Gap-junctions ausbilden, wurde als erstes analysiert. Daraufhin wurde *in vitro* untersucht, ob durch die Gabe von Apigenin die Gap-junction Bildung erhöht werden kann. Hierzu wurden AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen gemischt und der Bystander-Effekt und die Gap-junction Ausbildung analysiert.

3.4.1 Gap-junction Ausbildung in den verschiedenen AT-1 Tumoren

Ein Bystander-Effekt im TK/GCV-System kann nur dann auftreten, wenn funktionsfähige Gap-junctions im Tumorgewebe gebildet werden, da der Transport von phosphoryliertem GCV nur über die Gap-junctions erfolgen kann.

Aus unterschiedlichen unbehandelten Tumoren:

1. AT-1 aus transplantierten Fragmenten
2. AT-1 aus injizierten Zellen
3. AT-1/CDglyTK aus injizierten Zellen
4. AT-1/GFP aus injizierten Zellen
5. 80% AT-1/GFP & 20% AT-1/CDglyTK aus injizierten Zellen

und Organen:

6. Niere
7. Leber
8. Herz
9. Gehirn

wurden Proteinlysate zur Detektion der Connexin-Expression hergestellt.

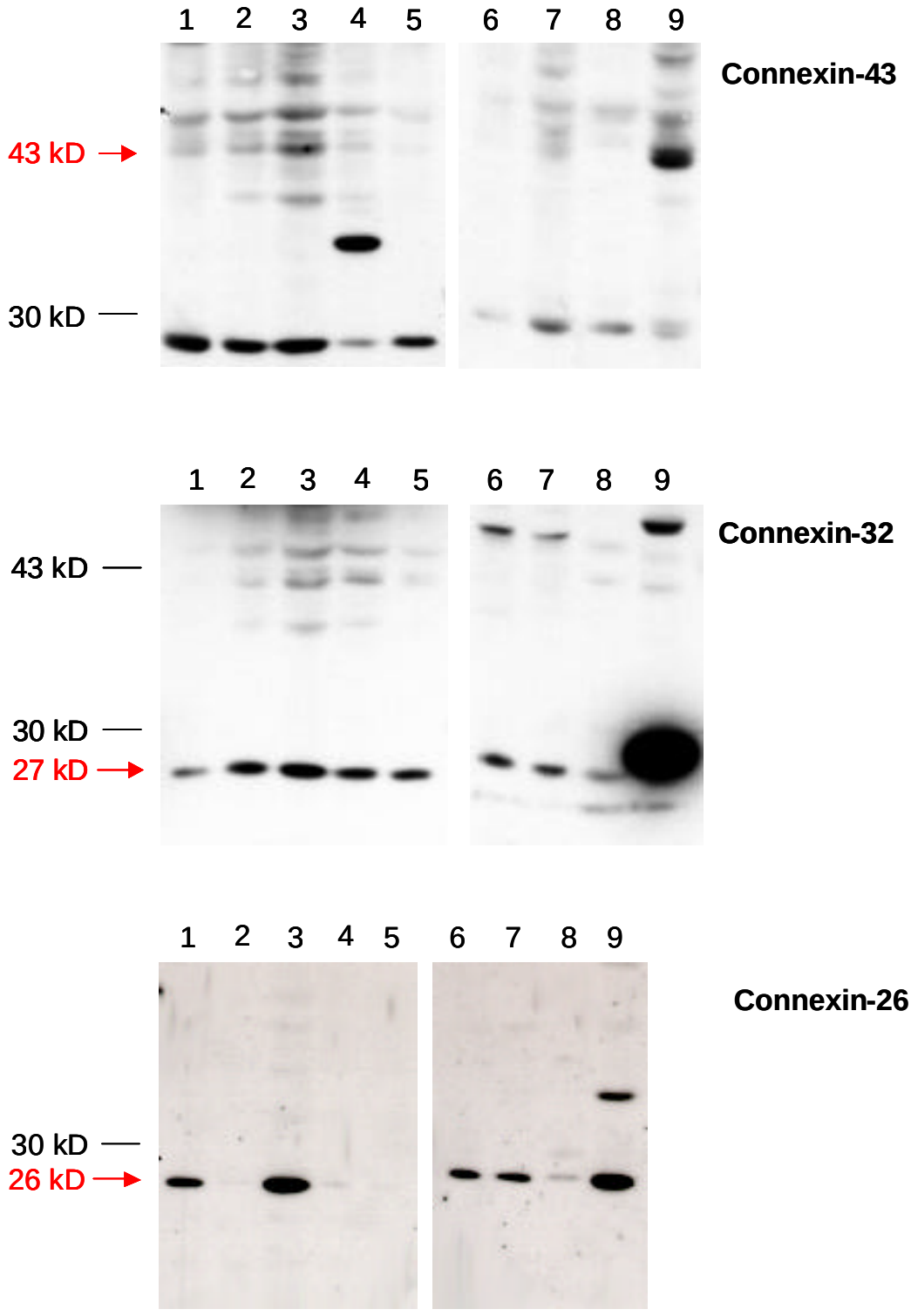


Abb. 3.18: Nachweis der Connexin-Expression in verschiedenen Tumoren und Organen im Western-Blot.

1. AT-1 aus transplantierten Fragmenten
2. AT-1 aus injizierten Zellen
3. AT-1/CDglyTK aus injizierten Zellen
4. AT-1/GFP aus injizierten Zellen
5. 80% AT-1/GFP & 20% AT-1/CDglyTK aus injizierten Zellen
6. Niere
7. Leber
8. Herz
9. Gehirn

Die Lysate wurden elektrophoretisch über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Antikörpern gegen Connexin-43, -32 und -26 nachgewiesen (s. Kapitel 2.5).

Aus Abbildung 3.18 ist ersichtlich, dass es zu unterschiedlich starken Expressionen von Connexin, sowohl in den Organen als auch in den untersuchten Tumoren, kommt. Am stärksten ist die Expression aller drei untersuchten Connexine im Gehirn (Bahn 9) und im AT-1/CDglyTK Tumor (Bahn 3). Connexin-32 ist in allen untersuchten Geweben nachzuweisen. Connexin-26 ist im AT-1/CDglyTK Tumor (Bahn 3) und im AT-1 Tumorfragment (Bahn 1) zu beobachten, aber nicht in AT-1 Tumoren, die durch Injektion von AT-1 Zellen (Bahn 2) entstanden sind.
Die fehlende Expression von Cx-43 und Cx-26 in den Tumorzellgemischen (Bahn 5) ist ein Hinweis, dass es nicht oder nur in geringem Maße zu einer Ausbildung von Gap-junctions in diesen Tumoren kommt und somit ein Transport von phosphoryliertem GCV erschwert ist.

3.4.2 Modulation des Bystander-Effektes mit Hilfe von Apigenin

Im folgenden wurde überprüft, ob im AT-1 Tumormodell eine Erhöhung des Bystander-Effektes mittels Apigenin erzielt werden kann. Hierzu wurden zur Bestimmung der geeigneten GCV Konzentration AT-1/GFP Zellen mit AT-1/CDglyTK Zellen im Verhältnis 0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 gemischt und untersucht, wie sich diese Zellpopulationen bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an GCV verhalten. Alle 24 h wurde das Zellüberleben mittels eines MTS-Tests bestimmt (s. Kapitel 2.3.2).

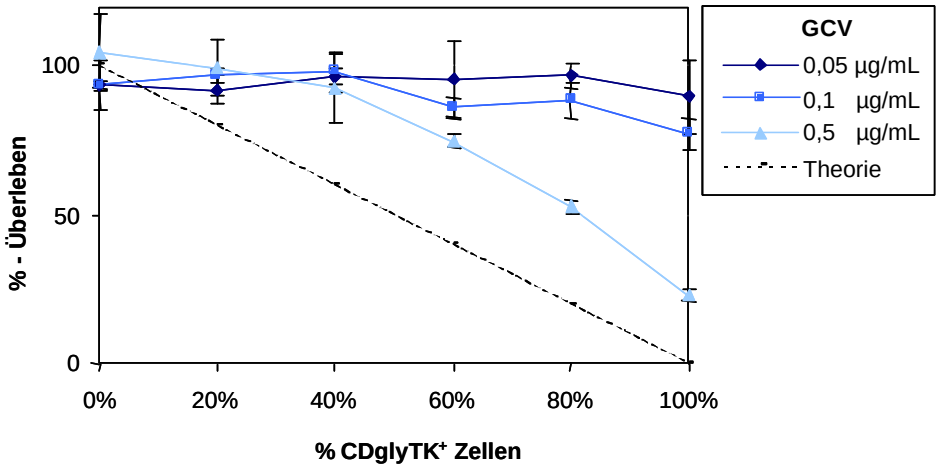


Abb. 3.19: Prozentuales Zellüberleben verschiedener Mischungsverhältnisse von AT-1/GFP Zellen mit AT-1/CDglyTK Zellen bei unterschiedlichen GCV Konzentrationen bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle. Das Zellüberleben wurde über einen MTS-Test bestimmt. Gezeigt sind die Werte nach einer Inkubationszeit von 144 h. Es wurden Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung der einzelnen Messungen ist eingezeichnet.

Abbildung 3.19 zeigt das prozentuale Zellüberleben verschiedener Mischungsverhältnisse von AT-1/CDglyTK Zellen mit AT-1/GFP Zellen bei unterschiedlichen GCV Konzentrationen bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle. Es ist zu beobachten, dass nur bei einer sehr hohen GCV-Konzentration (0,5 µg/mL) eine Abnahme des Zellüberlebens ab 40% CDglyTK$^+$ Zellen eintritt. Bei Einsatz von geringeren GCV Konzentrationen wie 0,1 µg/mL oder 0,05 µg/mL ist keine Beeinflussung des Zellüberlebens zu beobachten. Dies entspricht auch den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.2, die zeigten, dass erst bei einer Konzentration von 0,2 µg/mL eine Reduktion des Zellwachstums zu beobachten ist. Eine zu hohe GCV Gabe würde die Zellen zu schnell abtöten, und sie wären nicht mehr in der Lage, einen Bystander-Effekt auszuüben. Aus diesem Grund wurde die IC_{50} Konzentration für AT-1/CDglyTK Zellen (0,2 µg/mL) für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

Aus dem vorherigen Experiment ist deutlich zu sehen, dass AT-1/CDglyTK Zellen *in vitro* nicht in der Lage sind, einen Bystander-Effekt auf nicht suizidgen-tragende Zellen auszuüben, da das prozentuale Überleben der Zellen oberhalb der theoretischen Überlebenskurve liegt. Die theoretische Überlebenskurve ergibt sich aus den Mischungverhältnissen, so betrüge das theoretische

Überleben bei einem Mischungsanteil 80% CDglyTK$^+$ Zellen nur 20% unter Pro-Drug Gabe. Käme es zu einem Bystander-Effekt, so müsste das prozentuale Überleben unterhalb der theoretischen Überlebenskurve liegen.

Zur Überprüfung, ob die Gabe von Apigenin eine Erhöhung der Connexin-Proteine und damit eine Verbessung des Bystander-Effektes in AT-1 Zellen bewirken kann, wurden AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80) in 96-Napf Platten ausgesät. Folgende Ansätze wurden untersucht.

1. Kontrolle mit 0,01% DMSO für 144 h
2. Kontrolle mit 0,1% DMSO für 24 h
3. 2,5 µM Apigenin in DMSO (0,01 %) für 144 h
   GCV: 0,2 µg/mL
4. 25 µM Apigenin in DMSO (0,1%) für 24 h
   GCV: 0,2 µg/mL

Über einen Zeitraum von 168 h wurde alle 24 h das Zellüberleben mittels eines MTS-Assays (s. Kapitel 2.3.2) bestimmt. In Abbildung 3.20 ist das Zellüberleben nach 144 h in Bezug auf die mit DMSO behandelten Kontrollen dargestellt. Da Apigenin in DMSO nur löslich ist, mussten die entsprechenden Kontrollen mit der vergleichbaren DMSO Konzentration behandelt werden. Man konnte beobachten, dass mit Zunahme an suizidgen-tragenden Zellen (AT-1/CDglyTK) das Zellüberleben bei Inkubation mit GCV abnimmt, aber dass das prozentuale Zellüberleben durch die Inkubation mit Apigenin nicht beeinflusst wird. Auch hier liegen die Kurven über der des theoretischen Überlebens.

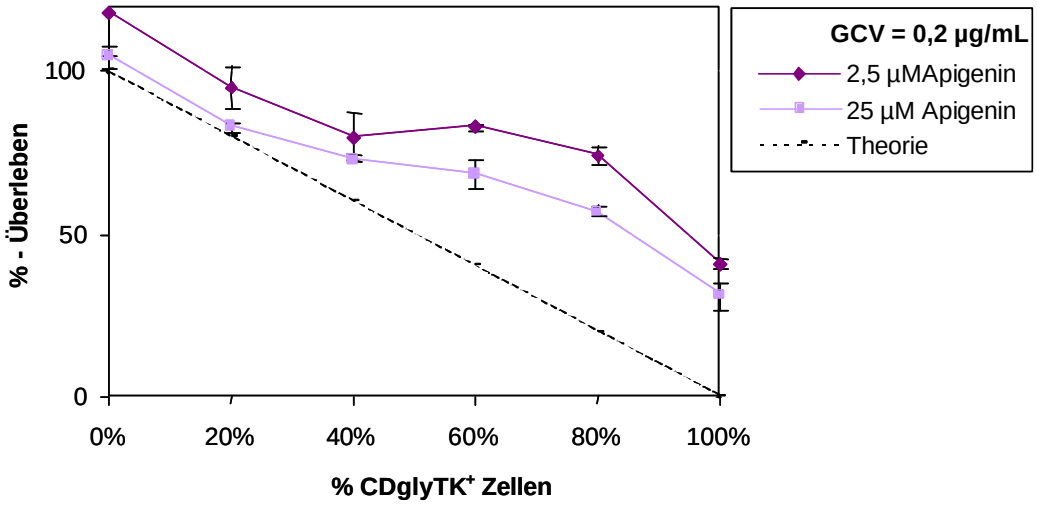


Abb. 3.20: Dargestellt ist das prozentuale Zellüberleben bei unterschiedlichen Apigenin-Konzentrationen in Bezug auf das Mischungsverhältnis von AT-1/CDglyTK mit AT-1/GFP Zellen. Das Zellüberleben wurde mit einem MTS-Test bestimmt. Die dargestellten Werte zeigen das Überleben der Zellen nach 144 h Inkubation. Es wurden Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung der einzelnen Messungen ist eingezeichnet.

3.4.3 Connexin Nachweis in Apigenin behandelten Zellen

Um zu klären, ob Apigenin die Connexin Expression in den AT-1 Zellen erhöhen kann, ohne das funktionsfähige Gap-junctions zum Transport gebildet werden, wurde ein Connexin-Nachweis durchgeführt.
$1{,}5*10^5$ AT-1, AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP wurden jeweils in eine 75 cm^2 Kulturflasche ausgesät und folgendermaßen behandelt:

1. keine Behandlung
2. für 24 h 25 µM Apigenin
3. 2,5 µM Apigenin während der ganzen Inkubation.

Nach Auftrennung, Transfer der Proteine und Inkubation mit den Antikörpern Connexin-43, -32 und –26 (s. Kapitel 2.8) konnten keine Banden für Cx-43, Cx-32 und Cx-26 bei allen drei untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Man kann also ausschließen, dass in AT-1 Zellen bei den untersuchten Apigenin Konzentrationen eine Induktion der Connexin Expression *in vitro* erreicht wird.

3.5 Der Bystander-Effekt im Cytosin Deaminase / 5-Fluorocytosin System

Da bei der Ausbildung des Bystander-Effektes im CD/5-FC System keine Gap-junctions benötigt werden, sondern das entstehende 5-Fluorouracil (5-FU) über die freie Diffusion in das umliegende Gewebe eindringen kann, wurde im folgenden untersucht, ob ein Bystander-Effekt *in vitro* nachzuweisen ist, und welche 5-FU Konzentration notwendig ist, um AT-1 Zellen zu töten (IC_{50}). Ferner sollten ^{19}F-NMR Studien klären, welche Mengen an 5-FU von den AT-1/CDglyTK Zellen metabolisiert werden können, und ob eine Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Aktivität vorliegt.
Im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation wurden von R.P. Mason an identischen AT-1 Tumoren in einem Pilotexperiment der intrazelluläre und extrazelluläre pH-Wert *in vivo* bestimmt, da dieser einen Einfluss auf die freie Diffusion des 5-FUs haben kann.

3.5.1 *In vitro* Bystander-Effekt

Das *in vitro* Bystander Experiment sollte klären, ob die Menge an abgegebenem 5-FU ausreicht, die benachbarten Zellen abzutöten. Hierzu wurden AT-1/GFP Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit AT-1/CDglyTK Zellen gemischt (100% AT-1/GFP - 80/20 - 60/40 - 40/60 - 20/80 - 100% AT-1/CDglyTK). Die Zellen wurden in 96-Napf Platten eingesät und nach 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-FC (0 - 5 - 10 - 50 µg/mL) inkubiert. Alle 24 h wurde das Zellüberleben mittels eines MTS-Tests (s. Kapitel 2.3.2) überprüft.

Aus Abbildung 3.21 ist ersichtlich, dass mit zunehmender Anzahl CDglyTK$^+$ Zellen das Überleben der Zellen bei einer 5-FC Konzentration von 50 µg/mL abnimmt. Die Überlebenskurven liegen oberhalb des theoretischen Überlebens und somit kann ein Bystander-Effekt ausgeschlossen werden. Dies bedeutet,

dass in diesem System kein Bystander-Effekt durch die freie Diffusion von 5-FU nachzuweisen ist.

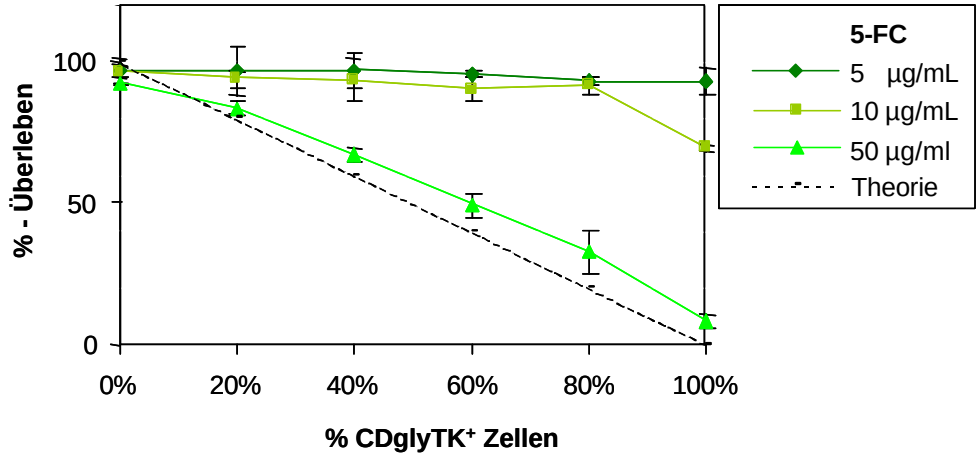


Abb. 3.21: Prozentuales Überleben bei unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Fluorocytosin bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von AT-1/GFP mit AT-1/CDglyTK Zellen. Das Zellüberleben wurde mit einem MTS-Test bestimmt. Die dargestellten Werte zeigen das Überleben der Zellen nach 144 h Inkubation. Es wurden Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung der einzelnen Messungen ist eingezeichnet.

3.5.2 Sensitivität der AT-1 Zellen auf 5-Fluorouracil

Um einen Bystander-Effekt erzielen zu können, muss eine ausreichende Menge an 5-Fluorouracil (5-FU) metabolisiert werden, mit dem die umgebenden Zellen zu versorgen sind. Welche 5-FU Menge notwendig ist, um AT-1 Zellen zu töten, sollte in diesem Experiment geklärt werden.

AT-1, AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen wurden in 96-Napf Platten mit einer Zelldichte von $1*10^3$ Zellen pro Napf ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-FU inkubiert (0 – 0,05 – 0,075 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 µg/mL). Alle 24 h wurde das Zellüberleben über einen MTS-Test bestimmt. In Abbildung 3.22 ist das prozentuale Zellüberleben aufgetragen, bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle in Abhängigkeit der 5-FU Konzentration.

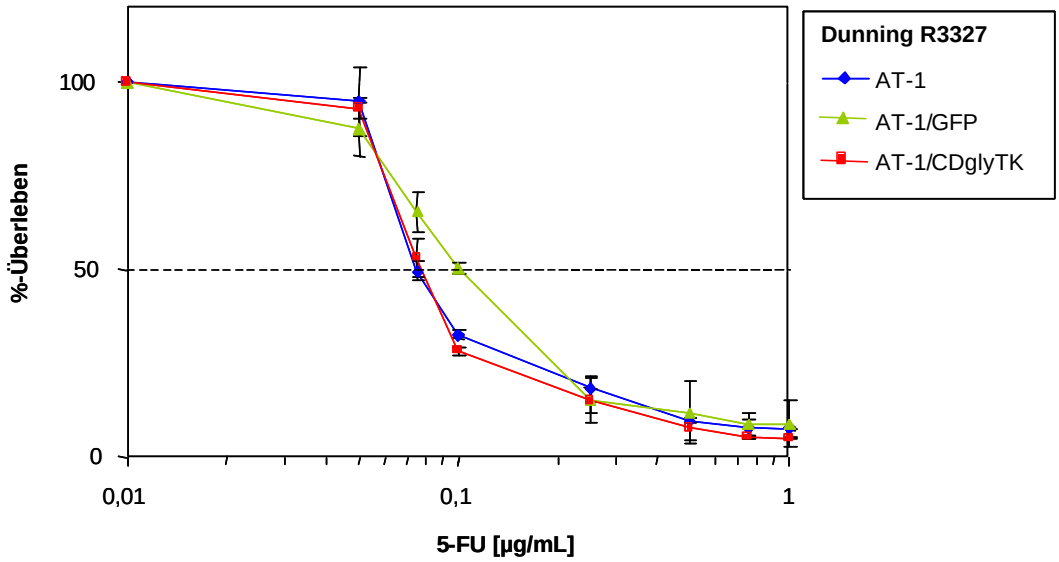


Abb. 3.21: Prozentuales Zellüberleben von AT-1, AT-1/GFP und AT-1/CDglyTK Zellen, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle in Abhängigkeit der 5-FU Konzentration. Das Zellüberleben wurde mit einem MTS-Test bestimmt. Die dargestellten Werte zeigen das Überleben der Zellen nach 144 h Inkubation. Es wurden Vierfach-Bestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung der einzelnen Messungen ist eingezeichnet.

Die IC_{50} Konzentration von 5-FU ist für AT-1 und AT-1/CDglyTK 0,6 µM (0,075 µg/mL) und für die AT-1/GFP Zellen 0,8 µM (0,1 mg/mL). Genauer gesagt, verändert sich die Empfindlichkeit der Zellen auf 5-FU durch Transfektion nicht. Das heißt weiterhin, dass die AT-1/CDglyTK Zellen ein Vielfaches an 5-FU metabolisieren müssen, um weitere Zellen in der Nachbarschaft zu töten. Tatsächlich wird eine noch viel höhere 5-FU Menge benötigt, da der Bystander-Effekt über die freie Diffusion läuft und damit ein Verdünnungseffekt hinzukommt.

Tabelle 3.9: Vergleich der IC_{50} von 5-Fluorouracil (externe Zugabe) mit 5-Fluorocytosin (intrinsische 5-FU Synthese bei AT-1/CDglyTK) in den verschiedenen AT-1 Zelllinien

	IC_{50}		
	AT-1	**AT-1/GFP**	**AT-1/CDglyTK**
5-Fluorouracil (5-FU)	0,6 µM	0,8 µM	0,6 µM
5-Fluorocytosin (5-FC)	400 µM	400 µM	77,5 µM

Welche Menge 5-FU von AT-1/CDglyTk Zellen gebildet werden kann, wurde im folgenden Experiment bestimmt.

3.5.3 Bestimmung der metabolisierten 5-Fluorouracil Menge in AT-1/CDglyTK Zellen mittels ^{19}F-NMR

Um herauszufinden, ob die Menge an metabolisiertem 5-FU von AT-1/CDglyTK Zellen aus 5-FC ausreicht, um einen Bystander-Effekt zu erzielen, wurden AT-1/CDglyTK Zellen folgendermaßen behandelt:

1. c (5-FC) = 100 µg/mL, Inkubationszeit: 4 h
2. c (5-FC) = 100 µg/mL, Inkubationszeit: 16 h
3. c (5-FC) = 50 µg/mL, Inkubationszeit: 4 h
4. c (5-FC) = 50 µg/mL, Inkubationszeit: 16 h.

Die Zellen wurden trypsiniert und in 20 mM Hepes/Ringer-Lösung (4°C) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 8 mm NMR-Röhrchen überführt, 4 h bei 11,7 Tesla und 4°C gemessen (s. Kapitel 2.7).

Aus Tabelle 3.10 ist ersichtlich, dass durch Vervierfachung der Inkubationszeit nur eine 1,5-fache Erhöhung der 5-FC Aufnahme erreicht wird. Dies bedeutet, dass der Aufnahmeprozess des 5-FC weniger als vier Stunden benötigt, um in einen Sättigungsbereich zu gelangen. Innerhalb der Zelle kommt es dann zur Umwandlung in 5-FU. Die Menge des gebildeten 5-FU scheint unabhängig von der intrazellulären 5-FC Konzentration zu sein (Probe 1. und 2.), da hier etwa gleiche 5-FU Mengen gebildet werden. Dem widerspricht die Messung der Probe 4, da hier eine höhere 5-FC Konzentration vorliegt, aber nur etwa halb soviel 5-FU im Vergleich zu den Messungen 1 und 2. Vergleicht man die 5-FU Werte untereinander, so lässt sich vermuten, dass die 5-FU Metabolisierung von der 5-FC Mediumkonzentration abhängig ist. Die Bildung der F-Nukleotide ist schon nach 4h Inkubation zu beobachten (Probe 1). Es kommt zu einer Anreicherung (ca. Verfünffachung) bei längerer Inkubationszeit der Zellen mit 5-FC bei den Proben 2 und 4.
Die Messung des Mediums ergab, dass eine längere Inkubationszeit (16h) benötigt wird, um überhaupt 5-FU im Medium zu detektieren. Die Menge des

diffundierten 5-FUs ist sehr gering im Vergleich zur intrazellulären Konzentration.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der Messergebnisse der ^{19}F-NMR Messung von AT-1/CDglyTK Zellen

		1.	2.	3.	4.
Allgemeine Angaben:					
5-FC Konzentration [µg/mL]		100	100	50	50
	[µM]	774	774	387	387
Inkubationszeit [h]		4	16	4	16
Zellzahl (10^6)		95	67	32	90
Messung Zellen *:					
5-FC	fmol / Zelle	0,265	0,451	0,223	0,317
	µM **	186	316	156	222
5-FU	fmol / Zelle	0,088	0,074	n.n	0,046
	µM *	61,6	51,8		32,2
F-Nukleotide	fmol / Zelle	0,042	0,234	n.n.	0,265
	µM *	29,4	164		186
Messung Medium:					
5-FU	µM	<1	7,8	<1	4,8

** intrazelluläre Konzentration ± 15%
* fmol/Zelle = 700 µM

Vergleicht man die intrazelluläre 5-FU Menge (ca. 55 µM) mit der IC_{50} von 5-FU (0,6 µM), so ist die Menge an 5-FU ausreichend, um einen Bystander-Effekt ausüben zu können. Die Menge des im Medium vorhandenen 5-FU müsste eigentlich ausreichen, um einen Bystander-Effekt zu erzielen, es konnte aber keiner detektiert werden (Kapitel 3.5.1).

3.5.4 ^{19}F-NMR Untersuchungen zum Abbauweg von 5-Fluorouracil

Das aus 5-FC gebildete 5-Fluorouracil (5-FU) wird hauptsächlich in der Leber durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) abgebaut (Abb. 3.23). DPD ist nicht ausschließlich in der Leber zu finden, es wird auch in anderen Geweben sowie in Tumoren exprimiert.

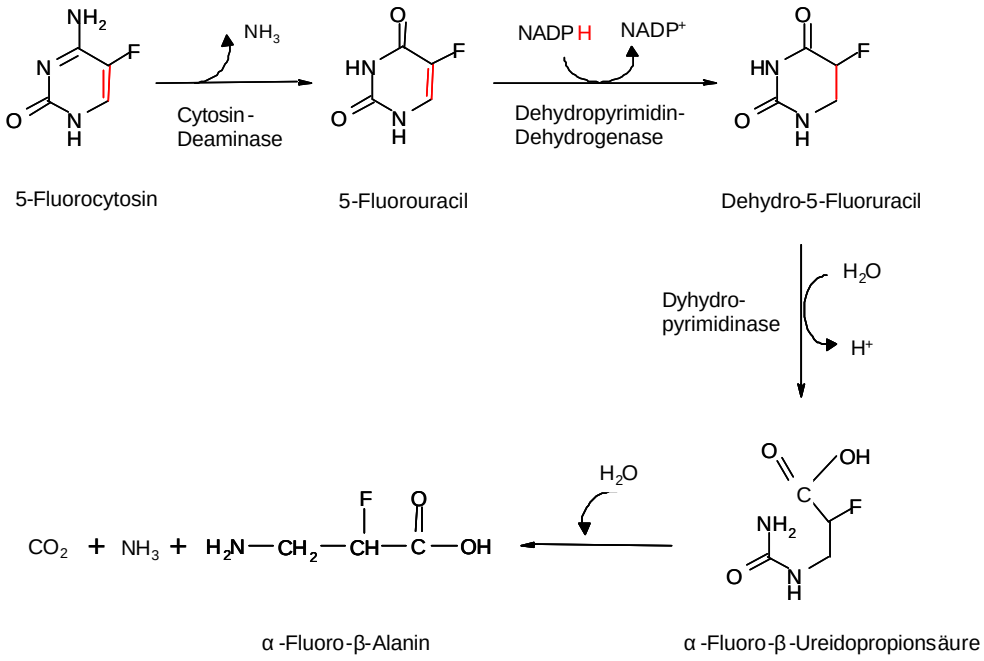


Abb. 3.23: Katabolismus von 5-Fluorouarcil mittels der Dehydropyrimidin-Dehydrogenase

Es war die Frage zu klären, ob der gewählte anaplastische AT-1 Tumor Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Aktivität besitzt, und das somit gebildete 5-FU über die DPD abgebaut wird und für einen Bystander-Effekt nicht mehr zur Verfügung steht.

AT-1/CDglyTk Zellen wurden für 17 h mit 100 µM 5-FC inkubiert. Die Zellen wurden dann trypsiniert und in 20 mM Hepes/Ringer-Lösung (4°C) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 8 mm NMR-Röhrchen überführt, 4 h bei 11,7 Tesla und 4°C gemessen (s. Kapitel 2.7).

Das durch die DPD-Umsetzung entstehende Dehydro-5-Fluorouracil (DHFU) konnte in den AT-1/CDglyTK Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Die detektierten F-Nukleotide zeigen weiterhin, dass die Umsetzung von 5-FC nicht katabolisch, sondern anabolisch abläuft (Tabelle 3.11). Fluoro-β-alanin (FBAL) kann nur *in vivo* nachgewiesen werden, da diese Umsetzung nur in der Leber stattfindet und über den Kreislauf in den Tumor gelangt. Da es sich hier um ein *in vitro* Experiment handelt, ist es nicht verwunderlich kein FBAL zu detektieren.

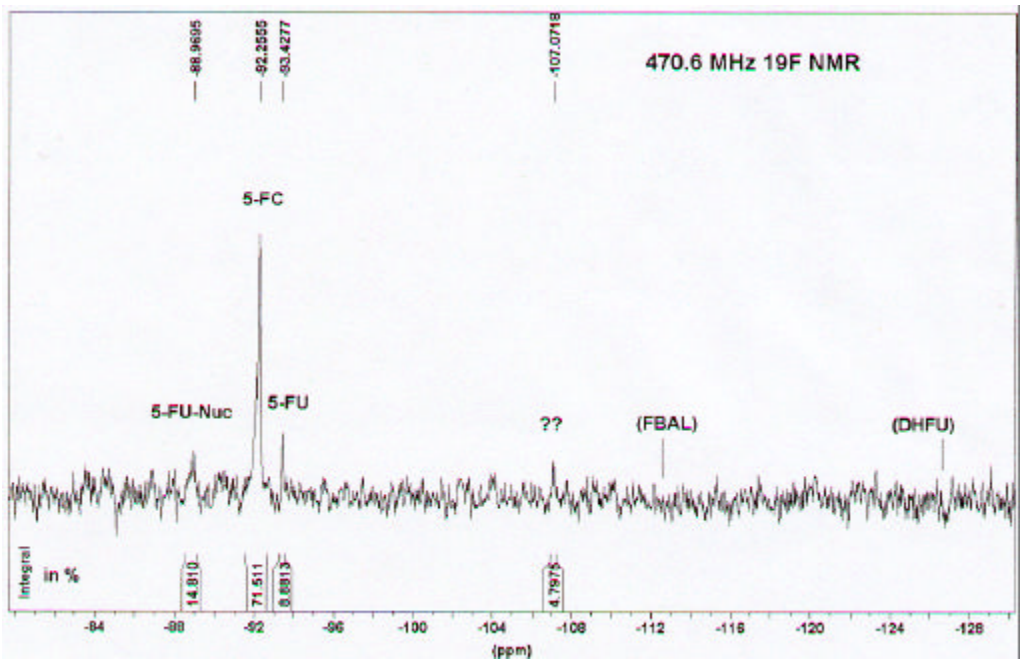


Abb. 3.24: ^{19}F-NMR Spektrum von AT-1/CDglyTK Zellen, die für 17h mit 5-FC (100 µg/mL) inkubiert wurden.

Tabelle 3.11: ^{19}F-NMR Parameter für 5-FC und dessen Metabolite bei 11,7 Tesla und 4°C

Metabolite	**Chemische Verschiebung *** ? **[ppm]**	**Konzentration [µM]**
5-Fluorocytosin (5-FC)	-92,3	471
F-Nukleotide	-88,7 bis -89,2	84
5-Fluorouracil (5-FU)	-93,4	55
Dehydro-5-fluorouracil (DHFU)	-126,3	< 5
Fluoro-ureidopropionsäure	-111,0	< 5
Fluoro-alanin (FBAL)	-112,8	< 5

* Relativ zu Trifluoracetat (5,23 mM) in 50mM Hepes

3.6 Distaler-Bystander-Effekt

Die Expression von fremden bakteriellen oder viralen Proteinen könnte zu einer Erhöhung der Immunantwort von normalen, schwach immunogenen Tumoren führen. Histologische Untersuchungen sollten zeigen, ob Makrophagen und/oder T-Zellen verstärkt in das Tumorgewebe einwandern. Im weiteren Versuchsablauf sollte überprüft werden, ob die Expression von fremden Proteinen eine Aktivierung des Immunsystems in den immunkompetenten Copenhagen Ratten mit sich führt. Hierfür wurde zum einem ein nicht suizidgen-tragender, räumlich entfernter Tumor (Modell einer Metastase) gleichzeitig mit einem CDglyTK$^+$ Tumor therapiert. Zweitens wurde nach erfolgreicher Behandlung von CDglyTK$^+$ Tumoren überprüft, ob ein immunologisches Gedächtnis gegen den AT-1 Tumor vorlag. Hierzu wurde 8 Wochen nach Einbringen und erfolgreicher Therapie des Tumors ein neuer Tumor injiziert und beobachtet, ob ein erneutes Tumorwachstum eintreten würde.

3.6.1 Histologische Untersuchungen

Von den kryokonservierten Tumoren (AT-1 und AT-1/CDglyTK) mit und ohne Gabe von Ganciclovir und 5-Fluorocytosin wurden 5 µm Schnitte zum Nachweis von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen angefertigt (Kapitel 2.6.2). Aus jeder Gruppe wurden jeweils 3 Tumore mit unterschiedlicher Größe untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Milz, als lymphatisches Organ, analysiert. In Tabelle 3.12 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung aufgelistet.
Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Einwanderung von Makrophagen in das Tumorgewebe kommt. Des weiteren konnten CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen im Tumor nachgewiesen werden. Eine Infiltration von NK-Zellen war nicht detektierbar.

Tabelle 3.12: Auflistung der immunhistologischen Ergebnisse zum Nachweis von Makrophagen, NK-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

Behandlung		**Makrophagen**		**NK-Zellen**		**$CD4^+$ T-Zellen**		**$CD8^+$ T-Zellen**	
		Positiv	**Negativ**	**Positiv**	**Negativ**	**Positiv**	**Negativ**	**Positiv**	**Negativ**
AT-1/CDglyTK									
o.B.	1	(+)			+		+	+	
	2	+			+		+	+	
	3	+			+	+			+
NaCl	1	(+)			+	(+)		(+)	
	2	+			+		+	+	
	3		+		+	+		+	
5-FC	1	++			+	+		+	
	2	+			+	+		+	
	3	+			+	+		+	
GCV	1	+			+	+		+	
AT-1									
Zellen	1	+			+	(+)		(+)	
	2		+		+		+	(+)	
	3		+		+		+	+	
Fragment	1	+			+	++		+	
	2	+			+	+		+	
Kontrolle									
Milz	1	+		+		+		+	
	2		+		+		+		+

(+) schwach positiv ++ stark positiv
\+ positiv +++ sehr stark positiv

Nicht veränderte AT-1 Tumore zeigten weniger eingewanderte Immunzellen als die genetisch veränderten AT-1 Tumore.

3.6.2 Modell zur Therapie einer gleichzeitig auftretenden Metastase

Ein zentrales Problem in der Krebstherapie ist die Bekämpfung von Metastasen. Ob eine Suizidgen-Therapie aufgrund ihrer immunaktivierenden Eigenschaften einen Beitrag zur Behandlung von Metastasen leisten kann, sollte im folgenden Experiment geklärt werden.

Hierzu wurden Copenhagen Ratten auf den rechten Oberschenkel ein suizidgen-tragender AT-1/CDglyTK Tumor („Primärtumor“) und auf den linken Oberschenkel ein AT-1 Stammzelllinien Tumor („Metastase“) injiziert. Bei Erreichen eines Tumorvolumens von ca. 300 mm^3, wurde mit einer Doppel-Medikamentengabe von 500 mg/kg 5-Fluorocytosin und 30 mg/kg Ganciclovir begonnen. Die Therapie sollte über einen Zeitraum von 14 Tagen erfolgen, musste aber bei den meisten Tieren (5 von 8) vorzeitig abgebrochen werden, da der AT-1 Tumor auf der linken Seite keine Wachstumsverzögerung aufzeigte, und somit zu groß wurde.

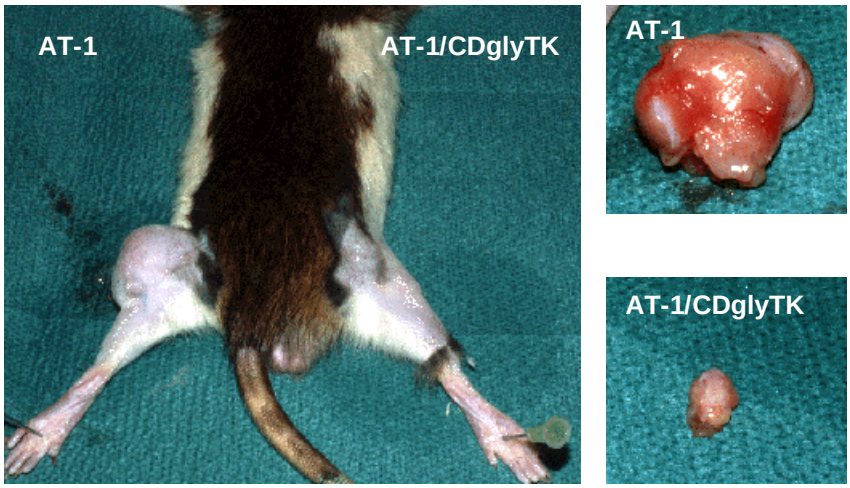


Abb. 3.25: Darstellung des Tumorwachstums von AT-1 (links) und AT-1/CDglyTK (rechts) Tumoren unter einer Pro-Drug Behandlung. Es ist deutlich zu sehen, dass der AT-1/CDglyTK Tumor auf die Therapie reagierte und sein Größe verringerte. Im Gegensatz dazu der AT-1 Tumor, der nicht auf die Therapie reagierte und auch nicht durch das Immunsystem am Wachstum gehindert wurde.

Die Abbildung 3.25 zeigt eine Ratte nach Abbruch der Therapie. Es ist deutlich zu sehen, dass es zu einem Tumorrückgang innerhalb von 10 Tagen bei den AT-1/CDglyTK Tumoren (rechtes Bein) kam. Im Gegensatz hierzu nahm der AT-1 Tumor während der Therapie an Größe zu.

Aus Abbildung 3.26 ist ersichtlich, dass keine Beeinflussung des AT-1 Tumorwachstums aufgrund einer immunologischen Reaktion zu beobachten war. Die Tumore zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die unbehandelte einseitige AT-1 Kontrollgruppe. Dies könnte bedeuten, dass bestehende Metastasen nicht durch die Aktivierung des Immunsystems in ihrem Wachstum gehemmt werden können.

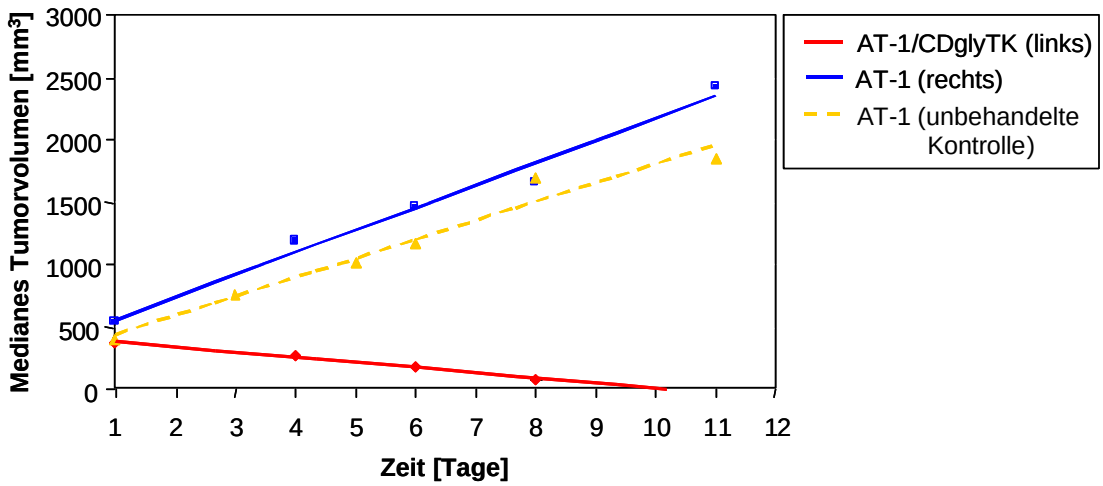


Abb. 3.26: Medianes Tumorwachstum bei einer Doppel-Suizidgen-Therapie von Ratten, die einen beidseitigen Tumor tragen. Auf der linken Seite ein AT-1/CDglyTK Tumor und auf der rechten Seite ein AT-1 Tumor. Als Kontrolle diente ein unbehandelter AT-1 Tumor. Anzahl der Tiere: Doppelseitig: 8 Ratten, Kontrolle: 6 Ratten.

3.6.3 Aktivierung eines immunologischen Gedächtnisses

Patienten, die erfolgreich therapiert wurden, bilden zu 40% innerhalb der folgenden 5 Jahre einen weiteren Tumor. Um eine Rezidivbildung zu unterdrücken, könnte das immunologische Gedächtnis eine wichtige Rolle spielen. Es wurde untersucht, ob die Co-Expression von bakteriellen und/oder viralen Proteinen innerhalb eines Tumors und die darauffolgende Heilung mittels einer Pro-Drug Therapie, ein immunologisches Gedächtnis gegen den nicht modifizierten Tumor bewirken kann.

Bei 15 Copenhagen Ratten wurde ein AT-1/CDglyTK Tumor appliziert und bei Erreichen eines Tumorvolumens von 300 mm^3 mit der Pro-Drug Therapie (500 mg/kg 5-Fluorocytosin und 30 mg/kg Ganciclovir) begonnen. Innerhalb von 14 Tagen nach Beginn der Therapie konnte bei keinem Tier mehr ein Tumor ertastet werden. Nach 8 Wochen, ausgehend vom Zeitpunkt der Tumorapplikation, wurden die Tiere in drei Gruppen aufgeteilt:

1. Gruppe: Injektion von $1*10^4$ AT-1 Zellen (5 Tiere)
2. Gruppe: Injektion von $1*10^5$ AT-1 Zellen (5 Tiere)
3. Gruppe: Injektion von $1*10^6$ AT-1 Zellen (5 Tiere)

Als Kontrolle dienten nicht behandelte, gesunde Copenhagen Ratten, bei denen ebenfalls AT-1 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurden:

4. Gruppe: Injektion von $1*10^4$ AT-1 Zellen (3 Tiere)
5. Gruppe: Injektion von $1*10^5$ AT-1 Zellen (3 Tiere)
6. Gruppe: Injektion von $1*10^6$ AT-1 Zellen (3 Tiere)

In der Kontrollgruppe (Gruppe 4 bis 6) konnten die ersten Tumore nach Injektion von $1*10^6$ AT-1 Zellen nach 6 Tagen, von $1*10^5$ Zellen nach 10 Tagen und von $1*10^4$ Zellen nach 28 Tagen ertastet werden (bezogen auf den Tag der Injektion) (Abb. 3.27).

Die Tiere, die zuvor einen austherapierten AT-1/CDglyTK Tumor besessen hatten (Gruppe 1 bis 3), zeigten lediglich in Gruppe 3 ($1*10^6$ Zellen) ein verzögertes Tumorwachstum. Es bildeten auch nur 3 Tiere von den behandelten 5 einen Tumor nach 9 Tagen; bezogen auf den Tag der zweiten Injektion. Die anderen beiden Gruppen zeigten keinen Tumor (Abb. 3.27).

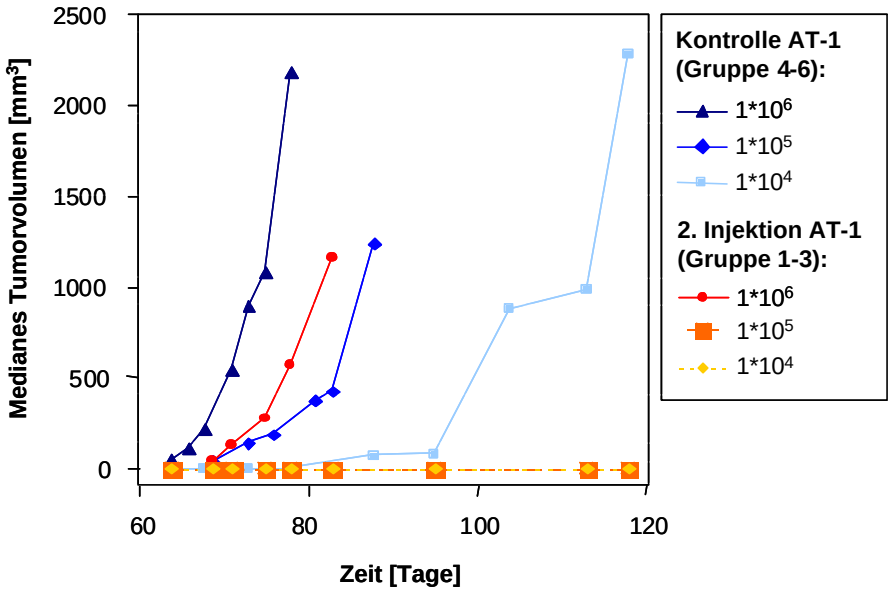


Abb. 3.27: Medianes Tumorwachstum nach Injektion unterschiedlicher Mengen von AT-1 Zellen auf unbehandelte Ratten und Ratten, die zuvor einen austherapierten AT-1/CDglyTK Tumor hatten.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass sich durch die Pro-Drug Behandlung von AT1/CDglyTK Tumoren ein immunologisches Gedächtnis gegen den Stammtumor AT-1 induzieren lässt.

4 Diskussion

Die Basis-Komponente eines Suizidgen / Pro-Drug Systems beinhaltet ein Gen, welches ein Enzym codiert, das viralen oder prokaryotischen Ursprungs ist. Dieses Gen ist geeignet, eine nicht toxische Substanz (Pro-Drug) in ein aktives Toxin umzuwandeln, welches den Zelltod herbeiführt. In Abwesenheit einer Pro-Drug sollte das Suizidgen / Enzym keine toxische Wirkung auf den normalen zellulären Metabolismus besitzen. Das Enzym sollte eine hohe Substrataffinität (kleiner K_M) und hohe katalytische Konstante aufweisen (k_{cat}), wodurch es zu einer schnellen Aktivierung der Pro-Drug kommt [Connors, 1995]. Weitere Voraussetzungen für ein ideales System sind:

keine zellulären homologen Gene,
die aktivierte Pro-Drug sollte eine lange Halbwertszeit besitzen und frei diffundierbar sein, um auch nicht modifizierte Zellen zu erreichen („Bystander-Effekt“) und
die verwendete Pro-Drug (Medikament) sollte in klinischer Anwendung sein, z.B. als antivirales oder antimikrobielles Medikament.

In der vorliegenden Arbeit wurden die biologischen Voraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung einer Suizidgen-Therapie am Dunning R3327 AT-1 Ratten-Prostatakarzinom untersucht. Als Suizidgene standen die Cytosin Deaminase aus *E.coli* und die *Herpes simplex Virus-I* Thymidinkinase zur Verfügung. Es erfolgten *in vivo*-Studien, die den Einsatz dieser Therapieform, sowohl bei 100% als auch bei 20% suizidgen-transduzierter Tumore, untersuchten. Des weiteren wurden Analysen durchgeführt, die die Bystander-Effekte dieser beiden Systeme *in vivo* und *in vitro* überprüften. Auch die Auswirkungen einer genetischen Veränderung der Stammzelllinie auf das Immunsystem, während und nach einer Pro-Drug Behandlung, waren Gegenstand dieser Arbeit.

Vergleich der AT-1 Zellen mit den transfizierten AT-1/CDglyTK und AT-1/GFP Zellen

Die Effizienz eines Toxingens ist abhängig vom Promotor und von der Integrationstelle im Genom. Bei den in der Literatur beschriebenen **Promotoren** gilt der CMV (Cytomegalie Virus) Promotor als der stärkste eukaryotische Promotor [Boshart et al., 1985]. Obwohl der verwendete LTR Promotor den „schwächeren“ Promotor in Vergleich zum CMV Promotor darstellt, ist er weniger anfällig in der Unterdrückung der Transkription der Toxingene [Olsen et al., 1992; Palmer et al., 1991; Scharfmann et al., 1991], was für eine langanhaltende Expression wichtig ist.

Die unterschiedliche Zytotoxizität des bifunktionalen Toxingens Cytosin Deaminase und Thymidinkinase auf AT-1 Zellen, unter der Kontrolle des LTR Promotors, wurde untersucht. Als Vergleich diente die Stammzelllinie AT-1 und die mit GFP transfizierten AT-1 Zellen, unter der Kontrolle des CMV Promotors. Über die Dauer der Arbeit zeigte sich, dass die AT-1/GFP Zellen, unter der Kontrolle des CMV Promotors, ihre Expression an GFP verringern. Im Vergleich zeigen die AT-1/CDglyTK Zellen, die unter dem LTR Promotor stehen, keine Abnahme (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Transfektion sich die **Verdopplungszeit** der transfizierten Zellen gegenüber der Stammzelllinie AT-1 nur geringfügig verändert. Warum die zelluläre **Lokalisation** des Fusionsproteins CDglyTK granulär ist und die des GFPs zytoplasmatisch, konnte nicht geklärt werden.

Zur Bestimmung der **Inhibitionskonzentration (IC_{50})** wurden die Zellen 24 h nach Aussaat für 4 Tage mit den entsprechenden Pro-Drugs inkubiert. Für das Thymidinkinase / Ganciclovir System in den AT-1/CDglyTK Zellen konnte eine IC_{50} für GCV von 1 µM ermittelt werden. Vergleicht man diesen IC_{50} Wert mit denen anderer *tk*-Zelllinien, wie dem 9L Gliosarkome der Ratte mit 0,25 µM

[Rogulski et al., 1997 a], dem murinen hepatozellulären Karzinom (HCC)-BNL mit nur 0,083 µM [Kuriyama et al., 1999] oder dem murinen Kolorectal Karzinom (WiDr) mit 3,4 µM [Trinh et al., 1995], so zeigt sich, dass die Sensitivität auf GCV vom Zelltyp abhängig ist.
Dies trifft auch auf das Cytosin Deaminase / 5-Fluorocytosin System zu. Die ermittelte IC_{50} von 5-FC in AT-1/CDglyTK Zellen liegt bei 77,5 µM, wohingegen die IC_{50} Konzentration für die HCC-BNL/CD Zellen bei 28,7 µM [Kuriyama et al., 1999] und für die WiDr/CD Zellen bei 27 µM [Trinh et al., 1995] liegt. Rogulski et al. [1997a] zeigte, dass das CDglyTK Fusionsprotein eine schwächere CD Aktivität besitzt, als das nicht fusionierte Einzelprotein. Die ermittelte IC_{50} Konzentration für 9L/CDglyTK Zellen ist die gleiche wie für die AT-1/CDglyTK Zellen. Warum die Aktivität der fusionierten Cytosin Deaminase im Vergleich zum nicht fusionierten CD-Einzelenzym abnimmt, ist nicht bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten transfizierten Zelllinien ihre fremden Proteine exprimieren. Des weiteren konnte bewiesen werden, dass die AT-1/CDglyTK Zellen im Vergleich zu nicht suizidgen-tragenden Zellen die entsprechenden Pro-Drugs in Drugs umwandeln, was durch die geringe IC_{50} dieser Zellen gezeigt wurde.

In vivo Suizidgen-Therapie

Die molekulare Chemotherapie wurde mit dem Ziel entwickelt, eine selektive Inaktivierung von Krebszellen mittels der Expression von Suizidgenen zu erreichen. Sie ist der konventionellen Chemotherapie ähnlich, da auch hier pharmakologische Substanzen eingesetzt werden [Gómez-Navarro et al., 1999]. Gewebe, Organe und auch Tumorzellen werden einer unschädlichen Pro-Drug Dosis ausgesetzt, wobei die genetisch veränderten Tumorzellen die Pro-Drug in eine zytotoxische Substanz umwandeln. Die Suizidgen-Therapie wurde schon an unterschiedlichen Tumoren, wie Melanomen, Gliomen,

Sarkomen, Leber-, Niere-, Kolon- und Lungenkarzinomen, sowie in syngenen Tiermodellen als auch an athymischen Nackt-Mäusen studiert.

Ezzeddine et al. [1991] zeigte im athymischen Nackt-Maus Modell anhand eines subkutanen Ratten Glioms, dass eine Tumorregression mit retroviralen HSV-*tk* transduzierten C6 Gliomazellen und anschließender GCV Gabe induziert werden kann. Die direkte Injektion von lebenden retroviralen Vektor-Produktionszellen (vector producer cells, VPC) in ein Ratten 9L Gliosarkom wurde als kontinuierliche *in situ* Methode von Culver et al. [1992] entwickelt. Die Behandlung eines intracerebralen Gliosarkoms mittels VPCs resultiert in einer kompletten makroskopischen und mikroskopischen Antwort, als auch dem Überleben der behandelten Tiere mit GCV [Ram et al., 1993; Culver et al., 1992].

Im syngenen, immunkompetenten AT-1 Prostata-Tumormodell konnten wir zeigen, dass mit *ex vivo* transduzierten AT-1/CDglyTK Tumoren bei 83% der Tiere (5 von 6 Tieren) eine lokale Tumorkontrolle bei einer **Ganciclovir Mono-Therapie** auftritt. Selbst nach 180 Tagen konnte keine Rezidivbildung bei den fünf Tieren festgestellt werden. Da die Therapie genau nach 14 Tagen beendet wurde, war es möglich, dass bei einem Tier noch kein vollständiger Tumorrückgang eingetreten war. Nach Beenden der Therapie begann dieser Tumor erneut zu wachsen. Hätten man die Therapie fortgesetzt, so wäre wahrscheinlich auch hier eine vollständige lokale Tumorkontrolle möglich gewesen.

Andere Arbeiten basieren auf der HSV-*tk* Tranduktion von Gehirntumoren durch adenovirale Vektoren. Chen et al. [1994] demonstrierte die effiziente Transduktion eines C6 Glioms *in vivo* mit adenoviralen Vektoren (ADV/RSV-*tk*). Athymische Nackt-Mäuse, die ADV/RSV-*tk* erhalten haben, zeigten einen Rückgang im Tumorvolumen und lebten zweimal länger als die entsprechenden Kontrolltiere. Obwohl die tumorale Antwort deutlich war, fehlt es den athymischen Nackt-Mäusen an einem intakten Immunsystem, das scheinbar

eine wichtige Rolle bei der Tumorantwort spielt. In einer anschließenden Studie wurde das ADV/RSV-*tk* – GCV System an einem intracerebralen 9L Gliosarkom in immunkompetenten Fischer Ratten analysiert [Shine und Wo, 1996]. Alle Kontrolltiere starben innerhalb von 22 Tagen. Im Vergleich dazu überlebten die mit ADV/RSV-*tk* und GCV behandelten Tiere zwischen 150 und 400 Tagen. Die Obduktion der Tiere ergab, dass keine Tumormasse mehr vorhanden war und dass keine toxischen Effekte von den adenoviralen Vektoren im Hirngewebe nachgewiesen werden konnten.

Die lokale Bildung von 5-FU *in vivo* als neue Strategie zur Antitumor-Therapie wurde zuerst von Nishijama et al. [1985] beschrieben, der Kapseln mit Cytosin Deaminase-Inhalt in ein Ratten-Gliom implantierte. Durch die Gabe von 5-FC demonstrierte er die lokale Generierung von 5-FU mit einer antitumoralen Aktivität. Eine ähnliche Strategie verfolgt die Expression des *cd*-Gens in verschiedenen Zelllinien, wie zum Beispiel bei Fibrosarkomen, Adenokarzinomen, Gliosarkomen und einem hepatozellulären Karzinom. Diese genetisch modifizierten Zellen zeigen eine selektive Sensitivität auf 5-FC im Vergleich zu den nicht modifizierten Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [Hirschowitz et al., 1995; Kuriyama et al., 1995; Huber et al., 1994, 1993; Mullen et al., 1994, 1992; Austin und Huber, 1992].

Eine *in vivo* **5-Fluorocytosin Mono-Therapie** im AT-1/CDglyTK Tumormodell, ruft bei 57% der Copenhagen Ratten (4 von 7 Tieren) eine lokale Tumorkontrolle hervor. Wie auch bei der GCV Mono-Therapie, zeigten alle Tumore einen Rrückgang. Da hier bei 43% der Tiere ein erneutes Wachstum nach Beenden der Therapie eingetreten ist, kann man daraus schließen, dass 14 Tage für eine 5-FC Therapie nicht ausreichen. Hätte man die Therapie fortgesetzt, so wäre vielleicht eine höhere Tumorkontrollrate möglich gewesen.

Bei gleichzeitiger Applikation der beiden Pro-Drugs GCV und 5-FC **(Kombinations-Therapie)**, zeigten alle behandelten Tieren mit einem AT-1/CDglyTK Tumor nach 11 Tagen eine vollständige Tumorkontrolle. Eine

Rezidivbildung konnte innerhalb der darauffolgenden 180 Tagen nicht beobachtet werden.
Rogulski [1997 b] dagegen, der ähnliche Experimente an subkutanen 9L/CDglyTK-Tumoren auf Nackt-Mäusen machte, erzielte keine Tumorkontrolle in der 5-FC Gruppe, ein rezidivfreies Überleben von 20% in der GCV und von 80% in der 5-FC & GCV Kombinationsgruppe. Je nach gewähltem Tumormodell zeigen die Mono-Therapien mit GCV und 5-FC entweder eine 100%ige Heilung aller Tiere [Bentires-Alj et al., 2000; Barba et al., 1994] oder lediglich einen eingeschränkten Tumorrückgang [Adachi et al., 2000; Eastham et al., 1996].

Verschiedene Studien sind zu dem Schluss gekommen, dass das CD/5-FC System in bestimmten Tumormodellen das effektivere ist [Hoganson et al, 1996; Culver et al., 1994; Oldfield, 1993]. Mullen [1999] zeigte in einer Vielzahl von Tumorzelllinien, dass bei der einen Zelllinie das CD/5-FC System und bei einer anderen Linie das TK/GCV System effektiver ist. Folgende Faktoren sprechen dafür, dass das CD/5-FC System das bessere ist. Die CD vermittelte Deaminierung von 5-FC erfordert keine zellulären Co-Faktoren oder Energiequellen und kann somit auch im extrazellulären Raum erfolgen. Zum Vergleich die TK-Reaktion, die intrazellulär stattfinden muss und einen Phosphat-Donor zur Aktivierung von GCV zu GCV-Monophosphat benötigt. Zusätzlich handelt es sich bei dem gebildeten 5-FU um ein ungeladenes Molekül, welches über Diffusion leicht in andere Zellen gelangen kann, wohingegen das phosphorylierte GCV ein geladenes Molekül ist und die benachbarten Zellen nur über Gap-junctions erreicht. Ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie ist aber die Wahl der Zelllinie und des Tumormodells, egal welches System eingesetzt wird.

Wir konnten im syngenen AT-1/CDglyTK *in vivo* Tumormodell zeigen, dass bei Vergleich der beiden Mono-Therapien, das TK/GCV System gegenüber dem CD/5-FC System das effektivere zu sein scheint. Eine 100%-ige Heilungsrate erzielten wir mit der Kombinations-Therapie bei den AT-1/CDglyTK Tumoren.

Nebenwirkungen

Da die Löslichkeit von 5-Fluorocytosin in Wasser sehr gering ist (1,5 g pro 100 mL) [Merck, 1997], wurde den Tieren eine Suspension aus 5-FC in 1 mL physiologischer Kochsalzlösung (500mg/kg) i.p. verabreicht. Der Einsatz eines größeren Injektionsvolumens, um das 5-FC vollständig zu lösen, war aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht erlaubt. Während der Therapie kam es zu starken Gewichtverlusten von ca. 13% binnen 14 Tagen innerhalb der 5-FC und der 5-FC & GCV Gruppen. Diese Gewichtsverluste sind nicht nur bei der Suizidgen-Therapie aufgetreten, sondern auch bei der Therapie von 100% AT-1/GFP Tumoren. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die entstehenden Metabolite für den Gewichtverlust verantwortlich sind, sondern die eingesetzten Pro-Drugs.

Diese Beobachtungen widersprechen denen von Huber et al. [1993], der anhand von 5-FC und 5-FU *in vivo*-Toxizitätsstudien an Nackt-Mäusen aufzeigte, dass die Tiere bei Gabe von 675 mg/kg über eine Zeitraum von 7 bis 25 Tagen keinen Gewichtverlust aufwiesen. Da es keine Studien über die Auswirkung der i.p. Gabe einer 5-FC Suspension gibt, aber eine Lebertoxizität von 5-FC bekannt ist [Vermes et al., 2000], wurden die Tiere nach Beendigung der Therapie seziert und Leber sowie Niere zur histologischen Begutachtung entnommen. Im PFA fixierten, HE-gefärbten Paraffinschnitt konnten keine mikroskopischen Veränderungen an Leber und Niere festgestellt werden. Die Gabe von Ganciclovir wurde als harmlos eingestuft, da nur ein geringer Gewichtsverlust zu beobachten war, die Tiere aber insgesamt eine gesunde Verfassung zeigten. Dies wird auch von anderen Gruppen bestätigt [Kawashita et al., 1999; Nishihara et al., 1997].

Distaler-Bystander-Effekt

Da das Wiederauftreten eines Tumors unter einer *in vivo* Suizidgen-Therapie nach Absetzen der Pro-Drugs bekannt ist, dies aber häufiger in Nackt-Mäusen festgestellt wurde als in immunkompetenten Mäusen [Ishii-Morita et al., 1997; Gagandeep et al., 1996], wurde überprüft, welche Rolle das Immunsystem bei dieser Therapierform spielt. Obwohl der Rückgang des Tumors während einer Suizidgen / Pro-Drug Therapie durch die lokale Generierung eines Toxins erfolgt, wäre es möglich, dass eine immunologische Reaktion mit diesem Prozess einhergeht.

Mullen et al. [1994] berichten, dass die Expression von CD in einem Kolon-Adenokarzinom-38 mit anschließender Behandlung von 5-FC die immunkompetenten Mäuse (C57BL/6) immunisiert. Nach 6 Wochen erfolgte die Injektion von nicht modifizierten 38-Zellen in die immunisierten Mäuse. Nur ca. 25% der vorbehandelten Tiere bildeten einen Tumor, wohingegen alle Tiere aus der nicht vorbehandelten Gruppe einen Tumor zeigten.
Ein Tumor von mehreren chemisch induzierten, multiplen Mamma-Tumoren auf einer weiblichen Sprague-Dawley Ratte wurde mit einer retroviralen Verpackungszelllinie M11 transduziert, die das *tk*-Gen enthält. Die anschließende Behandlung mit GCV zeigte, dass eine Tumorregression sowohl in dem *tk*-transduzierten Tumor als auch in den entfernter liegenden, nicht transduzierten Tumoren, stattfindet [Wei et al., 1998]. Dieses Phänomen wird als **Distaler-Bystander-Effekt** bezeichnet. Ähnliche Distale-Bystander-Antworten auf eine TK/GCV Behandlung konnten in immundefizienten Mausstämmen beobachtet werden, obwohl diese Stämme keine T- und B-Zellen, aber noch NK-Zellen besitzen [Budzynski und Radzikowski, 1994]. Dies lässt vermuten, dass der primäre Mediator beim Distalen-Bystander-Effekt die NK-Zellen sind. Andere Guppen berichten, dass kein Distaler-Bystander-Effekt bei gleichzeitiger Behandlung von suizidgen-tragenden Tumoren und normalen Tumoren zu beobachten ist.

Untersuchungen zum direkten Distalen-Bystander-Effekt im AT-1 Tumormodell zeigten, dass bei gleichzeitiger Behandlung eines AT-1/CDglyTK- und eines AT-1-Tumors mit der Kombinations-Therapie, eine lokale Tumorkontrolle bei dem AT-1/CDglyTK Tumor eintritt, aber der AT-1 Tumor keine Wachstums-verzögerung aufzeigt. Der Nachweis von NK-Zellen im histologischen Präparat fiel negativ aus, so dass dieses Ergebnis die vorherige Hypothese unterstützt, dass der direkte Distale-Bystander-Effekt von NK-Zellen vermittelt wird.

Analysen zum zeitverzögerten Distalen-Bystander-Effektes demonstrierten, dass ein immunologisches Gedächtnis über Makrophagen, $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen induziert werden kann. Austherapierte, tumorfreie Tiere zeigten bei erneuter Injektion unterschiedlicher Konzentration von der Stammzelllinie AT-1, eine geringere (60% der Tiere) und zeitverzögerte Angehrate bei $1*10^6$ Zellen und keine Tumorausbildung ab einer Zellkonzentration von $1*10^5$ Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die vorherige Vermutung, dass die Copenhagen Ratten in der Lage sind, ein immunologisches Gedächtnis gegen das nicht-modifizierte Ratten-Prostatakarzinom R3327 AT-1 zu bilden.

Es gibt Hinweise, dass in einigen Modellen von Mikrometastasen-Erkrankungen eine Progression der distalen Mikrometastasen eintritt, wenn gleichzeitig ein großer subkutaner Tumor behandelt wird. Diese Diskrepanz kann durch die Kinetik der T-Zell Immunantwort erklärt werden, da diese 7 bis 14 Tage für die vollständige Induktion benötigt. Zudem reagieren kleine Tumore sensibler auf eine immunologische Kontrolle als große etablierte Tumore [Mullen, 1999].

Histologische Untersuchungen von 5-FC behandelten Tumoren zeigen eine inflammatorische Infiltration hauptsächlich von $CD8^+$ T-Zellen und Makrophagen [Kuriyama et al., 1999; Consalvo et al., 1995]. Tiere, die die Fähigkeit zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses besitzen, zeigen weiterhin eine positive Reaktion auf $CD4^+$ Lymphozyten [Consalvo et al., 1995]. Die Behandlung von TK-exprimierenden Tumoren mit GCV bewirkt eine Erhöhung der Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC I) und des

costimulatorischen Oberflächenmoleküls B7, welches der Ligand für den CD28 Rezeptor auf T-Zellen ist [Ramesh et al., 1996 b]. Ebenfalls werden sowohl die interzellulären Adhäsionsmoleküle erhöht als auch eine tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten Antwort induziert [Ramesh et al., 1996 b].

Lokaler *in vivo* Bystander-Effekt

Bei den zuvor beschriebenen *in vivo* Suizidgen-Therapien handelt es sich um Idealsysteme, bei denen alle Tumorzellen Suizidgene enthalten. Zur Zeit ist es aber nicht möglich, mehr als 1 bis 10% des vorhandenen Tumorvolumens mit Suizidgenen zu transfizieren oder transduzieren, somit ist eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Suizidgen-Therapie das Vorhandensein des sogenannten **Lokalen-Bystander-Effektes**. Er bewirkt, dass genetisch modifizierte Zellen in Gegenwart von Pro-Drugs einen toxischen Effekt auf nicht suizidgen-tragende Zellen ausüben [Freeman et al., 1993]. Der Bystander-Effekt ist ein wichtiger Verstärkungsfaktor in vielen Suizidgen / Pro-Drug Systemen und kann zwischen den einzelnen Zelllinien und Systemen variieren. Er kann zum einen nicht vorhanden sein oder aber so stark sein, dass innerhalb des Tumors nur 1 bis 5% der Zellen Suizidgene enthalten müssen, um alle Zellen zu töten, und um eine vollständige Regression und Heilung der tumortragenden Tiere zu erzielen [Huber et al., 1993; Culver et al., 1992; Moolten und Wells, 1990]. Ein Bystander-Effekt kann zwischen unterschiedlichen Geweben, aber auch zwischen Zelllinien verschiedener Spezies induziert werden [Ishii-Morita et al., 1997]. Viele aktivierte Pro-Drugs, wie z.B. 5-FU, benutzen den Weg der freien Diffusion und benötigen keine speziellen Mechanismen, um die benachbarten Zellen zu erreichen [Huber et al., 1994; Mullen et al., 1992]. Anders das GCV-Triphosphat, ein Molekül mit hoher Ladungsdichte, welches zum Überqueren der Membran und zum Ausüben des Bystander-Effektes spezielle Kanäle (Gap-junctions) benötigt.

Um das vorhanden sein eines Lokalen-Bystander-Effekt zu überprüfen, wurden *ex vivo* die AT-1/CDglyTK Zellen mit nicht suizidgen-tragenden AT-1/GFP Zellen im Verhältnis 20:80 gemischt. Bei Erreichen des zu therapierenden Ausgangsvolumens (300 mm^3) liegen dann im Tumor ca. 10 bis 20% $CDglyTK^+$ Zellen vor. Diese Anzahl suizidgen-tragender Zellen müsste eigentlich ausreichen, um einen Lokalen-Bystander-Effekt zu induzieren, da die Zahl der $CDglyTK^+$ Zellen über der liegt, die zur Zeit mit den herkömmlichen Transfer-Methoden erreicht werden kann. Es zeigte sich aber, dass sowohl bei den beiden Mono-Therapien als auch bei der erfolgreichen Kombinationstherapie nur eine geringfügige Wachstumsverzögerung eintrat und keine lokale Tumorkontrolle erzielt wurde. Im immunhistologischen Schnitt der Tumore konnte man die Bildung von apoptotischen Vesikeln beobachten, sowie eine Infiltration von Makrophagen, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen.

Es gibt Hinweise, dass das Immunsystem auch eine wichtige Rolle beim Lokalen-Bystander-Effekt spielt [Gagandeep et al., 1996; Freeman et al., 1995]. Es kommt zur Erhöhung von Tumor Nekrose Faktor-α(TNF-α), Interleukin-1α (IL-1α), IL-6, Interferon-γ und Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) in TK^+ Zellen nach Gabe von GCV [Ramesh et al., 1996 a]. Auch die Phagozytose von apoptotischen Vesikeln der sterbenden TK^+ Zellen, welche GCV-Triphosphat enthalten, durch die wildtyp-Zellen, könnte ein weiterer Mechanismus des Lokalen-Bystander-Effektes sein [Freeman et al, 1993].

Rosolen et al. [1998] haben bei Untersuchungen am Medulloblastom ebenfalls keinen Bystander-Effekt detektieren können. Die virale Infektion dieser Zellen mit dem *tk*-Gen hat *in vitro* als auch *in vivo* bei Mischungsversuchen gezeigt, dass nur ein geringer Bystander-Effekt nachweisbar war. Untersuchungen zur Ausbildung von Gap-junctions haben Aufschluss darüber gegeben, dass der schlechte Bystander-Effekt durch die geringe Expression des Connexin-43 Proteins zu erklären ist [Rosolen et al., 1998; Vrionis et al., 1997]. Aus diesem

Grunde wurde im AT-1 Modell die Expression der Connexine-43, -32 und -26 untersucht.

Resistenzfaktoren im Tkymidinkinase / Ganciclovir System

Die Analyse der Connexin Proteine (Cx) im AT-1 (Fragment und Zelle), AT-1/GFP, AT-1/CDglyTK und dem gemischten Tumor haben gezeigt, dass das Connexin-32 in allen Tumoren zu finden war und das Connexin-43 verstärkt im AT-1/CDglyTK und in geringerer Menge auch im AT-1 (Fragment und Zellen) zu detektieren war. Connexin-26 war lediglich im AT-1/CDglyTK und im AT-1 (Fragment) Tumor nachzuweisen. Die gemischten Tumore zeigten nur eine Cx-32 Expression, aber keine Cx-43 und Cx-26 Expression. Da die gemischten Tumore eher weniger Connexin Proteine exprimierten als die nicht-gemischten Tumore, können keine oder nur sehr wenige Gap-junctions gebildet werden. Dies erklärt, warum kein Bystander-Effekt im TK/GCV System in unserem Tumormodell möglich war.

Gap-junctions sind Cluster von interzellulären Kanälen, die durch die Verbindung des transmembranen Proteins Connexin zwischen angrenzenden Zellen gebildet werden. Sie erlauben den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen, wie dem phosphorylierten GCV (550 Da), zwischen benachbarten Zellen ohne die Involvierung des extrazellulären Raumes [Simon und Goodenough, 1998]. Die meisten normalen Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes besitzen funktionsfähige Gap-junctions, wohingegen Krebszellen anscheinend eher nicht-funktionsfähige homologe und heterologe Gap-junctions bilden [Trosko and Ruch, 1999; Trosko et al.,1990].

Tumorzelllinien, die keine Gap-junction Kommunikation und auch keine Connexin-Expression zeigen, wie z.B. das Ratten Phäochromozytom PC12 Klon J und das Maus Neuroblastom N2A, sind nicht fähig, im TK/GCV System einen Bystander-Effekt auszubilden. Transfiziert man diese Zellen mit

Connexin-37 und/oder Connexin-43, so kann die zelluläre Kommunikation wiederhergestellt werden [Vrionis et al., 1997]. Spezifische Connexine werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, und ein einziger Zelltyp exprimiert verschiedene Connexine [Bennett et al., 1991]. Es gibt Anhaltspunkte für eine selektive Affinität bei der Connexin-Paarung. Zum Beispiel kann Connexin-40 nur mit Connexin-37 interagieren, und mit keinem anderen Connexin-Molekül, um einen funktionsfähigen Kanal auszubilden [White et al., 1995; Tomasetto et al., 1993]. Die selektive Paarung zwischen Zellen mit verschiedenen Connexin-Phänotypen kann teilweise die beobachteten Unterschiede in der Sensitivität von verschiedenen Tumorzelllinien auf den Lokalen-Bystander-Effekt erklären [Veenstra, 1996; Veenstra et al., 1995]. Zudem kommt noch eine Selektivität der zu transportierenden Substanzen für gewisse Gap-junctions, bestehend aus bestimmten Connexinen, hinzu. Besonders Connexin-45 und -37 weisen eine schlechtere Permeabilität für Anionen als für Kationen auf, wohingegen Connexin-43 gleichermaßen permeabel für Ionen ist, unabhängig von der Ladung [Veenstra 1996; Moreno et al., 1995 a; Moreno et al., 1995 b].

Untersuchungen zur **Modulation der Gap-junction Ausbildung** durch das Flavinoid Apigenin, ergaben, dass keine Erhöhung des Bystander-Effektes *in vitro* eintritt. Zudem konnte auch keine Connexin Expression im Western-Blot nachgewiesen werden. Da es sich bei der AT-1 Zelllinie um eine schnell proliferierende Zelle handelt, mit kurzen Verdopplungszeiten, könnte dies eine Möglichkeit sein, warum es unter Zellkulturbedingungen nicht zur Ausbildung und zur Induktion von Gap-junctions kam.

Andere Studien demonstrieren, dass die interzelluläre Gap-junction Kommunikation durch endogene und exogene Substanzen moduliert werden kann. Als Inhibitoren des Bystander-Effektes sind der cAMP-Aktivator Forskolin und der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil bekannt [Samejima and Meruelo, 1995; Marini et al., 1996]. Eine Erhöhung der interzellulären Kommunikation konnte mit Lovastatin, ein HMG-CoA Reduktase Inhibitor [Ruch et al. 1993], und mit Apigenin, einem Flavinoid, *in vitro* gezeigt werden [Chaumontet et al,

1994]. Der Mechanismus, der die Erhöhung der Gap-junction Kommunikation bewirkt, ist noch nicht bekannt.

Therapiert man Tumore aus Maus Kolonkarzinom (MCA 38) Zellen mit *tk*-haltigen MCA 38 Zellen im Verhältnis 90:10 mit GCV, so kann durch die Gabe von Apigenin (1x für 2 Tage) oder Lovastatin (2x für 1 Tag) das tumorfreie Überleben der Mäuse von ca. 30% (GCV alleine) auf ca. 70% (GCV + Lovastain) und sogar auf ca. 90% (GCV + Apigenin) gesteigert werden [Touraine et al., 1998].

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine genetische Veränderung einer Zelllinie auch eine Veränderung der Gap-junction Ausbildung mit sich bringt. Eine Modulation der Gap-junctions könnte den Lokalen-Bystander-Effekt von TK^+ Zellen in Gegenwart von GCV erhöhen, dies muss aber noch *in vivo* bewiesen werden.

Resistenzfaktoren im Cytosin Deaminase/ 5-Flourocytosin System

Die **Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD)** katalysiert den Katabolismus von Pyrimidinen wie Thymidin und Uracil, aber auch von 5-Fluoropyrimidin und 5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU, synthetisiert von Heidelberger 1957, ist eine der meist verwendeten Chemotherapeutika zur Behandlung von Brust-, Kopf-, Hals- und Kolorectal-Tumoren. 5-FU wird entweder durch eine Bolus i.v. Injektion oder durch eine kontinuierliche i.v. Infusion verabreicht. Der Katabolismus von 5-FU ist ein wichtiger Faktor bei dieser Therapieform, weil 60 bis 90% über die Leber, durch die DPD, abgebaut werden [Heggie et al., 1987]. DPD kommt aber nicht nur in der Leber vor, sondern wird auch in anderen Geweben sowie in einigen Tumoren (z.B. CAL51, Brust-Tumor; CAL 33, Kopf-Hals-Tumor) exprimiert [Fischel et al., 1995; Beck et al., 1994]. Obwohl die 5-FU-Resistenz multifaktoriell ist, konnte beobachtet werden, dass die DPD Aktivität in Tumorzellen mit der 5-FU Sensitivität korreliert [Milano und Etienne, 1994].

Daraus folgt, dass bei einer geringen DPD Aktivität eine größere 5-FU Effizienz vorliegt. Die Verwendung von DPD Inhibitoren, wie z.B. 3-Cyano-2,6-dihydropyridin (CNDP), 5-Benzyloxybenzyluracil und 5-Ethynyluracil (776C85) [Baccanari et al., 1993], könnten den therapeutischen Index von 5-FU verbessern, woraufhin auch geringere Dosen eingesetzt werden könnten [Iyer und Ratain, 1998]. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der 5-FU Effizienz bietet der Einsatz des Suizidgens Cytosin Deaminase, welches lokal das Antimykotikum 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil umwandelt. Da aber auch einige Tumore fähig sind, DPD zu exprimieren, sollte vor einer Suizidgen-Therapie mit CD ausgeschlossen werden, dass der gewünschte Tumor eine DPD Aktivität besitzt.

In dieser Arbeit wurde erstmals an Hand von ^{19}F-NMR Messungen gezeigt, dass in den AT-1/CDglyTK Tumorzellen kein 5-FU Katabolismus vorliegt. Es konnte kein Dehydro-5-fluorouracil als katabolisches Stoffwechselprodukt der DPD nachgewiesen werden. Eine biologische DPD Aktivität ist somit für AT-1 Tumorzellen nicht nachweisbar.

Über die ^{19}F-NMR *in vitro* Messung konnte weiterhin belegt werden, dass eine ausreichende Menge an 5-Fluorouracil von den AT-1/CDglyTK Zellen metabolisiert wird. Allerdings ist die intrazelluläre 5-FU Konzentration fast zehnmal höher als die im Medium zu detektierende 5-FU Menge. Die extrazelluläre 5-FU Menge müsste ausreichend sein (IC_{50} (5-FU) = 0,6 µM), um einen Bystander-Effekt hervorzurufen. Dies konnte aber weder *in vitro* noch in *vivo* beobachtet werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Aufnahme des 5-FUs nicht nur über die freie Diffusion abläuft, sondern dass auch noch andere Faktoren die Aufnahme beeinflussen.

Es gibt Anhaltspunkte, dass der aktive Transport von 5-FU in Ehrlich-Zellen von der intrazellulären ATP-Konzentration abhängig ist [Yamamoto und Kawasaki, 1981]. Wohlhueter et al. [1980] zeigte weiterhin, dass der Transport von 5-Fluorouracil in Novikoff Ratten-Hepatomazellen durch Uracil inhibiert werden

kann. Dies deutet darauf hin, dass die 5-FU Aufnahme nicht nur durch die freie Diffusion, sondern auch durch einen Uracil Transporter erfolgen kann.

Ein weiterer Resistenzfaktor könnte der **Tumor pH-Wert** sein. Warburgs Arbeit [1930] zeigte, dass eine Vielzahl von Tumoren Glukose bevorzugt in Milchsäure umsetzen (aerobe Glykolyse), und zwar unabhängig von der Sauerstoffversorgung. Man würde erwarten, dass der intrazelluläre pH-Wert der Tumorzellen auf Grund der Glykolyse im sauren Bereich liegt. Dem ist aber nicht so. Die gebildeten Lactat-Ionen und Protonen werden zusammen über den Monocarboxylat-Carrier in das Interstitium des Tumors transportiert [Halestrap und Denton, 1974]. Dies hat zur Folge, dass der extrazelluläre pH_e im Tumor kleiner ist als der intrazelluläre pH_i ($pH_e < pH_i$) im Gegensatz zum Normalgewebe ($pH_e > pH_i$). Es wird angenommen, dass die interstitielle Flüssigkeit nicht schnell genug über das Blut exportiert werden kann und es dadurch zu Übersäuerung im Tumorgewebe kommt. Die niedrige H^+-Clearance könnte mit der schlechten Vaskularisierung des Tumors, dem verminderten Lymphdrainage System und dem erhöhten interstitiellen Druck in Zusammenhang stehen [Stubss et al., 2000].

Eine kleine pH-Differenz über die Zellmembran hat eine hohe Auswirkung auf die Fähigkeit des Transports von Molekülen, da die An- oder Abwesenheit der Ladung die Lipophilie der Substanz beeinflusst [Gerweck, 1998]. Für schwache Säuren oder Basen ist die Ausprägung der Ionisierung abhängig vom pH-Milieu. Ross [1961] berechnete, dass bei einer pH-Differenz von einer Einheit eine 8-fach höhere Konzentration einer Substanz mit einem pK_a von 8 im Tumor erreicht werden kann als im Normalgwebe. Weiterhin führt die Reduktion des Tumor pH-Wertes zu einer Verstärkung dieses Effektes [Wike-Hooley et al., 1984]. Ross berichtet nicht, ob die Anreicherung im Tumor im Interstitium oder intrazellulär erfolgte.
Die Ionisation einer Substanz bewirkt meist eine Abnahme der Lipid-Löslichkeit und damit auch eine Verringerung der Fähigkeit zur Diffusion. Ist der pH-Wert relativ basisch, so erhöht sich die Ionisierung einer schwachen Säure, was dazu

führt, dass die Membranpermeabilität abnimmt und die Substanz in der Zelle gefangen ist („Trapping“) [Gerweck, 1998]. Dies führt zur einer deutlichen Differenz bei der intra-/ extrazellulären Aufnahme von Medikamenten zwischen Tumor- und Normalgeweben für Medikamente mit einem entsprechenden pK_a. Nicht nur schwache Säuren können leicht in den Tumor gelangen, auch schwache Basen mit einem bestimmten pK_a-Wert können vom Tumorgewebe verstärkt aufgenommen werden, wie z.B. Radioprotektoren im Normalgewebe [Gerweck und Seetharaman, 1996].

In Kooperation mit der Gruppe von R. Mason, University of Texas, USA, wurde der intrazelluläre und extrazelluläre pH-Wert von AT-1 Tumoren *in vivo* bestimmt. Hierzu wurden zwei Copenhagen Ratten, die einen transplantierten AT-1 Tumor aus einem Tumorfragment besaßen, 6-Fluoropyrodoxal (6-FPOL) injiziert. Durch die selektive intra- und extrazelluläre Anreicherung des 6-FBOL konnte durch eine F-NMR Messung ein intrazellulärer pH_i-Wert von 7,4 und ein extarzellulärer pH_e-Wert von 6,97 bestimmt werden. Daraus ergibt sich ein pH-Gradient ($pH = pH_e - pH_i$) von $\Delta pH = -0,43$.
Welche Auswirkungen dieser pH-Gradient auf das in die Zelle eintretende 5-Fluorocytosin und das gebildete 5-Fluorouracil im AT-1 Tumormodell hat, ist zur Zeit nicht bekannt. Es gibt kontroverse Diskussion, ob das gebildete 5-FU nun die Zelle verlässt oder in der Zelle verbleibt.

Klinische Studien

Mehr als 200 klinische Gentherapie-Studien wurden bisher genehmigt, davon ungefähr 50% zur Behandlung von Krebserkrankungen [Roth und Christiano, 1997]. Die Suizidgen-Therapie ist aufgrund verschiedener Vorteile stark bei den Krebsstudien vertreten. Zum einen wirken Suizidgene und die entsprechenden Drugs toxisch auf chemoresistente Tumore. Zum anderen ist eine kurze Genexpression zur Behandlung der Tumore ausreichend, und drittens bewirkt

der Bystander-Effekt, dass nur eine kleine Fraktion des Tumors (> 10%) die Suizidgene enthalten muss.

Die erste klinische Studie wurde 1991 an einem Ovarialkarzinom mit der HSV-TK erprobt [Freeman et al., 1992]. Das Patientenkollektiv für die klinische Studie der Phase I bestand aus Patienten mit einer Stadium III Erkrankung, die bereits eine Platin- und Taxol-Therapie erhalten hatten. Die HSV-*tk* modifizierte, allogene Ovarial-Tumorzelllinie (PA-1) wurde Patienten intraperitoneal infundiert, die ein Rezidiv gebildet hatten. In der dosisabhängigen Phase I-Studie wurden den Patienten bis zu $1*10^{10}$ PA-1/*tk* Zellen i.p. verabreicht und diese anschließend mit GCV behandelt. Die Behandlung zeigte minimale bis moderate Toxizitäten, wie z.B. Fieber und abdominale Schmerzen. Von den 18 behandelten Patienten zeigten vier einen Rückgang des Tumormarkers CA125 und des Tumors. Das durchschnittliche Überleben dieser Patienten war vergleichbar mit anderen Therapien für diese Patientengruppe. Darauffolgende Studien zur gentherapeutischen Behandlung des Ovarialkarzinoms benutzten andere Gentransfer-Systeme, wie z.B. HSV-*tk* Produktionszellen oder adenovirale Vektoren [Freeman et al., 1999].

Die Behandlung von Gehirntumoren mittels einer Suizidgen-Therapie hat den Vorteil, dass meist nur eine zu behandelnde Tumormasse vorhanden ist. Aufgrund der Lokalisation dieser Tumore ist eine Operation oder Strahlenbehandlung schwierig. In der folgenden Studie wurden Zellen in das Tumorbett injiziert, die HSV-*tk* enthaltende retrovirale Partikel generieren. Da retrovirale Vektoren sehr effizient teilungsaktive Zellen transduzieren, sind die Tumorzellen des Gehirns sehr empfänglich für eine Transduktion. Während der Studie sind Nebenwirkungen / Toxizitäten aufgetreten, die durch das Einbringen von fremden Zellen in ein vitales Organ erklärt werden. Eine antitumorale Antwort hat sich bei einigen Patienten angedeutet, wohingegen ein Patient eine komplette Remission für ein Jahr zeigte [Oldfield, 1993]. Daraufhin wurde diese Studie zu einer Phase III-Studie erweitert .

Die einzige derzeit laufende Phase I-Studie unter Verwendung des Cytosin Deaminase Gens wird von R. Crystal am Rockefeller University Hospital, New York, betreut [Crystal et al., 1997]. In deser Studie werden Adenoviren zum Transport des *cd*-Gens benutzt, um Lebermetastasen des Kolonkarzinoms zu transduzieren. Die Adenoviren werden an Tag eins und sieben direkt in den Tumor injiziert. Ein zweiter, nicht behandelter Tumor dient als Kontrolle. Von Tag 2 bis Tag 15 erhält der Patient 5-FC. Dieses wird dann zu 5-FU umgesetzt, welches das am häufigsten eingesetzte Chemotherapeutikum zur Behandlung von Kolonkarzinomen ist. Unabhängig von dieser Studie werden den Patienten die behandelten Tumore als auch die Kontrolltumore mittels Laparotomie entfernt. Die entfernten Tumore werden auf ihre Genaufnahme als auch auf ihre Genexpression hin untersucht. Patienten, die nicht operiert wurden, werden auf die klinische Wirksamkeit dieser Methode studiert. Das Ziel dieser Phase I-Studie ist erstens die Bestimmung der Toxizität bei direkter Injektion des $AD_{cv}CD.10$ Vektors in eine Lebermetastase in Kombination mit der oralen Gabe von 5-FC. Zweitens soll der *in vivo*-Transfer von therapeutischen Genen in solide Tumore mit replikationsdefizienten Adenoviren demonstriert werden. Weiterhin soll gezeigt werden, dass die *cd*-Adenovirus / 5-FC Therapie zu einer Tumorveränderung führt.

Obwohl in den letzten Jahren sehr ermutigende Resultate publiziert wurden, steht die Suizidgen-Therapie noch an ihren Anfängen. Klinische Studien, die das HSV-*tk* Suizidgen-System verwenden, konnten zeigen, dass bei dieser Form der Therapie nur sehr geringe Nebenwirkungen auftreten. Weitere Studien werden zeigen, dass eine Verbesserung der gewebsspezifischen Expression der Suizidgene möglich ist und dass die Erhöhung der Immunantwort beim Bystander-Effekt das Potential dieser neuen Technologie weiter steigern wird.

Man sollte aber davon ausgehen, dass diese Methode nicht pauschal auf jede Krebsart anzuwenden ist, da gewisse Voraussetzungen, wie z.B. eine ausreichende Anzahl von Gap-junctions, vorhanden sein muss. Dies bedeutet,

dass jeder Tumor auf seine gentherapeutische Tauglichkeit überprüft werden muss.

Erwartungen / Zukunft

Es ist schwer eine Voraussage zu treffen, welches Ausmaß die Suizidgen-Therapie im Bereich der Krebsbehandlung einnehmen wird. Die ersten klinischen Studien im Bereich einer Suizidgen-Therapie haben sowohl die Vorteile wie auch die limitierenden Faktoren dieser Therapieform zur Krebsbehandlung aufgezeigt. Die Möglichkeiten, die diese Therapieform in sich birgt, sind sehr groß, aber der limitierende Faktor ist zur Zeit der sichere Transfer der Suizidgene.

Der Tod eines Gentherapie-Patienten im Dezember 1999 an der Universität Pennsylvania, vermittelt durch eine starke Immunreaktion auf den verwendeten adenoviralen Vektor, zeigte, dass die Entwicklung für den Transfer von genetischem Material noch nicht am Ende ist. Die Sicherheit, die Selektivität und die Effizienz der zur Zeit verwendeten Vektoren ist noch nicht ausreichend, um eine Gentherapie am Patienten in der Routine durchzuführen.

Auf dem jetzigen Stand der Forschung sind die beschriebenen Gentransfersysteme je nach gewünschter Anwendung unterschiedlich gut geeignet. Sinnvoll ist es, die natürlichen Limitierungen und Vorteile eines Vektors genau zu bestimmen. So wird man zur Therapie von Leberkarzinomen am besten adenovirale Vektoren wählen, da diese einen hohen Lebertrophismus besitzen, auch wenn zur Zeit die Langzeitexpression nach adenoviralem Gentransfer noch nicht gegeben ist. Gleichermaßen könnten Herpesvektoren wegen ihres Neurotrophismus für neuronale Erkrankungen bevorzugt eingesetzt werden, auch wenn ihre Toxizität zur Zeit noch ein Problem darstellt [Brand und Strauss, 1998]. Die enormen molekularen

Möglichkeiten zum Design künstlicher Vektoren erlauben die Prognose, dass sich die Gentherapie diesem Anspruch stellen kann.

Die optimalen genetischen Ziele der meisten malignen Erkrankungen sind zur Zeit noch nicht bekannt. Im Moment liegt der Fokus bei der Krebs-Gentherapie in der Induktion einer Antitumor-Immunität, der Blockierung von Onkogenen, der Erhöhung der Expression von wildtyp-Tumor-Suppressorgenen und der Induktion der Sensitivität auf exogen verabreichte Medikamente. Des weiteren ist die individuelle, Patienten-spezifische-Zielgenbestimmung, basierend auf der molekulargenetischen Charakterisierung der genetischen Mutation, Voraussetzung für einen erfolgreichen gentherapeutischen Ansatz.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung, der Wirksamkeit sowie mit der Charakterisierung eines Lokalen- und Distalen-Bystander-Effektes bei einer Suizid-Gentherapie in einem syngenen Tumormodell.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei einem Prostatakarzinom der Ratte (Dunning R3327 AT-1), welches zuvor *ex vivo* mit einem Fusionsgen aus Cytosin Deaminase und Tymidinkinase (AT-1/CDglyTK) transfiziert worden war, durch eine Kombinationstherapie mit den Pro-Drugs Ganciclovir (GCV) und 5-Fluorocytosin (5-FC) eine komplette Remissionen der Tumore und ein Langzeitüberleben der Tiere erzielt werden konnte. Dagegen ergaben sich bei Applikation nur einer Pro-Drug lediglich lokale Tumorkontrollraten von 83% (GCV) und 57% (5-FC). Noch geringere therapeutische Effekte unter einer Kombinationstherapie mit GCV und 5-FC wurden beobachtet, wenn in Anlehnung an die klinische Situation der Anteil suizidgen-tragender Zellen in den Tumoren auf < 20% abgesenkt wurde.
Molekularbiologische Analysen dieser Mischtumore (< 20% CDglyTK$^+$) deuteten auf eine Verminderung der membranständigen Kommunikationsproteine Connexin-26, -32 und -43 hin, welche für den interzellulären Transport der phosphorylierter GCV-Metabolite über die Gap-junctions erforderlich sind.
Pharmakodynamische Untersuchungen mittels ^{19}F-NMR belegten eine effiziente Metabolisierung von 5-FC zu 5-Fluorouracil (5-FU) mit dem anschließenden Einbau der F-Nukleotide in die DNA. Hinweise auf eine Katabolisierung von 5-FU durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) wurden in Dunning AT-1/CDglyTK Zellen nicht gefunden. Berechnungen ergaben, dass sowohl die erzeugten intrazellulären 5-FU Konzentrationen (55 µM) als auch die ins Medium abgegebene Menge an 5-FU (~ 4,8 - 7,8 µM) ausreichend sind, um eine zytotoxische Wirkung auf benachbarte Zellen ausüben zu können. Für 5-FU wird daher angenommen, dass andere Resistenzmechanismen für den *in vitro* als auch *in vivo* beobachteten geringen „Lokalen-Bystander-Effekt" vorliegen.

Der über das Immunsystem vermittelte „Distale-Bystander-Effekt“ zeigte, dass es nicht zur Bildung von NK-Zellen kommt und somit ein gleichzeitig induzierter nicht suizidgen-tragender Tumor keine Wachstumsverzögerung aufzeigte, wohingegen der suizidgen-tragende Tumor auf der gegenüberliegenden Seite unter Pro-Drug Therapie eine lokale Tumorkontrolle aufwies. Bei Induktion eines immunologischen Gedächtnisses über Makrophagen, $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen während einer Suizidgen-Therapie, kommt es nur bedingt und zeitverzögert zu einer Ausbildung eines erneuten nicht suizidgen-tragenden Tumors bei späterer Injektion von $1*10^6$ AT-1 Zellen. Bei weiterer Verringerung der Zellkonzentrationen ($1*10^5$ und $1*10^4$) bildeten sich auf zuvor austherapierten Copenhagen Ratten keine Tumore mehr im Vergleich zu unbehandelten Ratten.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Suizidgen-Therapie ein erfolgversprechender Ansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen ist. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die individuellen Tumore hinsichtlich ihrer gentherapeutischen Tauglichkeit, unter besonderer Berücksichtigung des Lokalen- und Distalen-Bystander-Effektes, zu testen sind.

6 Literatur

1. **Adachi Y., Tamiya T., Ichikawa T., Terada K., Ono Y., Matsumoto K., Furuta T., Hamada H. and Ohmoto T.** (2000): Experimental gene therapy for brain tumours using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Human Gene Ther. 11: 77-89*
2. **Andersen L., Kilstrup M. and Neuhard J.** (1989): Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in Escherichia coli K12. Involvement of the glnLG and purR genes in the regulation of codA expression. *Arch. Microbiol. 152: 115-118*
3. **Austin E.A. and Huber B.E.** (1992): A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing and expression of Escherichia coli cytosine deaminase. *Mol. Pharmacol. 43: 380-387*
4. **Baccanari D.P., Davis T.D., Knick V.C. and Spector T.** (1993): 5-Ethynyluracil (776C85): A potent modulator of the pharmacokinetics and antitumor efficacy of 5-fluorouracil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11064-11068*
5. **Barba D., Hardin J., Sadelain M. and Gage F.H.** (1994): Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4348-4352*
6. **Beck A., Etienne M.C., Chéradame S., Fischel J.L., Formento P., Renée N. and Milano G.** (1994): A role for dydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur. J. Cancer 30A: 1517-1522*
7. **Bennett M.V.L., Barrio L.C., Bargiollo T.A., Spray D.C., Hertsberg E. and Sáez J.C.** (1991): Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron 6: 305-320*
8. **Bentires-Alj M., Hellin A.-C., Lechanteur C., Princen F., Lopez M., Fillet G., Gielen J., Mervielle M.-P. and Bours V.** (2000): Cytosine Deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther. 7: 20-26*
9. **Biron K.K., Stanat S.C., Sorrell J.B., Fyfe J.A., Keller P.M., Lambe C.U. and Nelson D.J.** (1985): Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 2473-2477*
10. **Blaese R.M., Culver K.W. and Anderson W.F.** (1990): The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gen Ther 1: 331-362*

11. **Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B. and Schaffner W.** (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalievirus. *Cell 41: 521-530*
12. **Bradford M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem 72: 248-254*
13. **Brand K. und Strauss M**. (1998): Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. In: Tumorerkrankungen – Handbuch der molekularen Medizin. Ganten D. und Ruckpaul K. (eds.) *Springer Verlag: 110-141*
14. **Budzynski W. and Radzikowski C.** (1994): Cytotoxic cells in immundefficient athymic mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol. 16: 319-346*
15. **Calabresi P. and Chabner B.A.** (1995): Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman & Gilmans´s The Pharmacological Basis of therapeutics. J.G Hardman, L.E. Limbirrd, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman eds., *McGraw-Hill pp. 1225-1287*
16. **Chaumontet C., Bex V., Gaillard-Sanchez I., Seillan-Heberden C., Suschetet M. and Martel P.** (1994): Apigenin and tangeretin enhance gap-junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis 15: 2325-2330*
17. **Chen S.H., Shine H.D., Goodman J.C., Grossman R.G. and Woo S.L.C.** (1994): Gene therapy for brain tumors: Regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2577-2581*
18. **Chomczynski P.** (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques 15: 532-535*
19. **Compton S.J. and Jones C.G**. (1985); Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem 151: 369-374*
20. **Connors T.** (1995): The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther. 2: 702-709*
21. **Consalvo M., Mullen C.A., Modesti A., Musiani P., Allione A., Cavallo F., Giovarelli M. and Forni G.** (1995): 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J. Immunol. 154: 5302-5312*
22. **Cooke D.B., Quarmby V.E., Petrsz P., Mickey D.D., Der C.J., Isaacs J.T. and French F.S.** (1988): Expression of ras Proto-Oncogenes in the Dunning R3327 Rat Prostatic Adenocarcinoma System. *The Prostate 13: 273-287*

23. **Crystal R.G., Hirschowitz E. and Lieberan M** (1997): Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to mestatic colon carcinoma of the liver in association with oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Hum. Gene. Ther. 8: 985-1001*
24. **Culver K.W., Ra. Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E.H. and Blaese R.M.** (1992): In vivo gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science 256: 1550-1552*
25. **Culver K.W., van Gilder J., Link C.J., Carlstrom T., Buroker T., Yuh W., Koch K., Schabold K., Doornbas S., Wetjen B. and Blaese R.M.** (1994): Gene therapy for treatment of malignant tumors with in vivo tumor transduction with herpes simplex thymidine kinase / ganciclovir system. *Hum. Gene Ther. 5: 343-379*
26. **Danielsen S., Kistrup M., Barilla K., Jochimsen B. and Neuhard J.** (1992). Characterization of the Escherichia coli codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol. Micobiol. 6, 1335-1344.*
27. **De Blas A.L. and Cherwinski H.M.** (1983): Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem 133: 214-219*
28. **De Vita V.T., Hellamnn S. and Rosenberg S.A.** (1995): Biologic therapy of cancer, 2nd edition. *J.B. Lippincott*
29. **Dunning W.F.** (1963): Prostatic cancer in the Rat. *Monographs Natl. Cancer inst. 12: 351-369*
30. **Durrant I.** (1990): Light-based detection of biomolecules. *Nature 346: 297-298*
31. **Eastham J.A., Chen S.-H., Sehgal I., Yang G., Timme T.L., Hall S.J., Woo S.L.C. and Thompson T.C.** (1996): Prostate cancer gene therapy: Herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Human Gene Ther. 7: 515-523*
32. **Eckert W.A. und Kartenbeck J**. (1997): Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: *Springer Verlag Berlin Heidelberg*
33. **Elion G.B.** (1980): The chemotherapeutic exploitation of virus-specified enzymes. *Adv. Enzyme Regul. 18: 53-66*
34. **Elion G.B.** (1983): The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob Chemother. 12: 9-17*
35. **Ezzeddine Z.D., Martuza R.L., Platika D., Short M.P., Malick A., Choi B. and Breakefield X.O.** (1991): Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol. 3: 608-614*
36. **Faulds D. and Heel R.C.** (1990): Ganciclovir. *Drugs 39: 597-638*

37. **Fischel J.L., Etienne M.C., Spector T., Formento P., Renée N. and Milano G.** (1995): Dihydropyrimidine Dehydrogenase: A tumoral target for fluorouracil modulation. *Clinical Cancer Res. 1: 991-996*

38. **Freeman S.M., Abboud C.N., Whartenby K.A., Packman C.H., Koeplin D.S., Moolten F.L. and Abraham G.N.** (1993): The "bystander effect": Tumor regression when fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res. 53: 5274-5283*

39. **Freeman S.M., Mc Cune C., Angel C., Abraham G.N. and Abboud C.N.** (1992): Treatment of ovarian cancer using HSV-Tk gene modified vaccine-regulatory issues. *Hum Gene Ther. 3: 342-349*

40. **Freeman S.M., Ramesh R., Munshi A., Whartenby K.A., Freeman J.L. and Marrogi A.J.** (1999): In situ use of suicide genes for cancer therapy. In: Gene therapy for Cancer. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds., *Academic Press, pp. 155-176*

41. **Freeman S.M., Ramesh R., Shastri M., Munshi A., Jensen A.K. and Marrogi A.J.** (1995): The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Lett. 92: 167-174*

42. **Fujiwara T., Grimm E.A., Mukhopadhyay T., Zhang W.W., Owen-Schaub L.B. and Roth J.A.** (1994): Induction of chemosensitivity in human lung cancer cell in vivo by adenovirus-mediated transfer of wild type p53 gene. *Cancer Res. 54: 2287-2291*

43. **Gagandeep S., Brew R., Green B., Christmas S.E., Klatzmann D., Poston G.J. and Kinsella A.R.** (1996): Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther. 3: 83-88*

44. **Gambir S.S., Barrio J.R., Herschman H.R. and Phelps M.E.** (1999): Assays for non-invasive imaging of reporter gene expression. *Nuclear Medicine & Biology 26: 481-490*

45. **Gerweck L.E.** (1998): Tumour pH: implications for treatment and novel drug design. *Semin. Radiat. Oncol. 8: 176-182*

46. **Gerweck L.E. and Seetharaman K.** (1996): Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res. 56: 1194-1198*

47. **Gòmez-Navarro J., Curiel D.T. and Douglas J.T.** (1999): Gene therapy for Cancer. *Eurp. J. of Cancer 35: 867-885*

48. **Griffths J.R.** (1991): Are cancer cells acidic? *Br. J. Cancer 64: 425-42*

49. **Grignet-Debrus C. and Calberg-Bacq C.M.** (1997): Potential of Varicella zoster virus thimidine kinase as a suicide gene in breast cancer cells. *Gene Ther. 4: 560-569*

50. **Haack K., Moebius U., Knebel-Doeberitz M.V., Herfarth Ch., Schackert H.K. and Gebert J.F.** (1997): Detection of cytosine

deaminase in genetically modified tumor cells by specific antibodies. *Hum. Gene Ther. 8: 1395-1401*

51. **Halestrup A.P. and Denton R.M.** (1974): Specific inhibition of pyruvate transport in the rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem J. 138: 313-316*
52. **Hamzeh F.M. and Lietman P.S.** (1991): Intranuclear accumulation of subgenomic non-infectious human cytomegalovirus DNA in infected cells in the presence of ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1818-1823*
53. **Hanahan D. and Weinberg R.A.** (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell 100: 57-70*
54. **Haynes P., Lambert T.R. and Mitchell I.D.** (1996): Comparative in-vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and xanthine analogue, caffeine, in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res. 369: 65-74*
55. **Heggie G.D., Sommadossi J.P., Cross D.S., Huster W.F. and Diasio R.B.** (1987): Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma and urine. *Cancer Res. 47: 2203-2206*
56. **Heidelberger C., Chaudhuri N.K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer R.J., Pleven E. and Schreiner J.** (1957): Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature 179: 663-666*
57. **Hellman S. and Vokes E.E.** (1996): Advancing current treatments for cancer. *Sci. Am. 275 (3): 118-123*
58. **Hirschowitz B.E., Austin E.A, Richards C.A., Davis S.T. and Good S.S.** (1995): In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Ther. 6: 1055-1063*
59. **Hoganson D.K., Batra R.K., Olsen J.C. and Boucher R.C.** (1996): Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res. 56: 1315-1323*
60. **Huang H.J., Yee J.K., Shew J.Y., Chen P.L., Boostein R., Friedman T., Lee E.Y. and Lee W.H.** (1988): Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science 242: 1563-1566*
61. **Huber B.E.** (1998): Introduction: gene therapy approaches to cancer. In: Gene Therapy in the treatment of Cancer. B.E. Huber and I. Magrath, eds., *Cambridge Univeristy Press, pp. 1-8*
62. **Huber B.E., Austin E.A., Richards C.A., Davis S.T. and Goods S.S.** (1994): Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal

tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8302-8306*

63. **Huber B.E., Austin E.A:, Good S.S., Knick V.C., Tibbels S. and Richards C.A.** (1993): In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Research 53: 4619-1626*

64. **Huber B.E., Richards C.A. and Krenitsky T.A. (**1991): Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8039-8043*

65. **Hughes B.W., Wells A.H., Bebok Z., Gadi V.K., Garver R.I. and Parker W.B.** (1995): Bystander killing of melanoma cells using the human tyrosinase promotor to express the Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene. *Cancer Res. 55: 3339-3345*

66. **Hwu P., Yanelli J., Kriegler M., Anderson W.F., Perez C., Chiang Y., Schwarz S., Cowherd R., Delgado C., Mule J. and Rosenbergerg S.A.** (1993): Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-? cDNA for gene therapy of cancer in humans. *J. Immunol. 150: 4104-4111*

67. **Ilsley D.D., Lee S.K., Miller W.H. and Kuchta R.D.** (1995): Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerase ?, ? and ? with different potencies and have unique mechanism of action. *Biochemistry 34: 2504-2510*

68. **Isaacs J.T and Coffey D.S.** (1983): Model Systems for the study of Prostatic Cancer. *Clinics in Oncolgy 2: 479-498*

69. **Isaacs J.T., Heston W.D.W., Weissman R.M. und Coffey D.S.** (1978); Animal models of the hormone-sensitive and -insensitive Prostatic Adenocarcinomas, Dunning R-3327-H, R-3327-HI, amd R3327-AT. *Cancer Research 38: 4353-4359*

70. **Isaacs J.T., Isaacs W.B., Feitz W.F.J. and Scheres J.** (1986); Establishment and Characterization of Seven Dunning Rat Prostatic Cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of Prostatic Cancers. *The Prostate 9: 261-281*

71. **Ishii-Morita H., Agbaria R., Mullen C.A., Hirano H., Koeplin D.A., Ram Z., Oldfield E.H., Johns D.G. and Blaese R.M.** (1997): Mechanism of "bystander effect" killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther. 4: 244-251*

72. **Iyer L. and Ratain M.J.** (1998): Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur. J. of Cancer 34: 1493-1499*

73. **Kawashita Y., Ohtsuru A., Kaneda Y., Nagayama Y., Kawazoe Y., Eguchi S., Kuroda H., Fujioka H., Ito M., Kanematsu T. and Yamashita S.** (1999): Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Human Gene Ther. 10: 1509-1519*

74. **Kilstrup M., Meng L.M., Neuhard J. and Nygaard P.** (1989): Genetic evidence for a repressor of synthesis of cytosine deaminase and purine biosynthesis enzymes in Escherichia coli. *J. Bacteriol. 171: 2124-2127*

75. **Krauss J.C., Shu S. and Chang A.E.** (1998): Genetically modified tumor cells as tumor vaccines. In: Gene Therapy in the treatment of Cancer. B.E. Huber and I. Magrath, eds., *Cambridge Univeristy Press, pp. 1-8*

76. **Kumar N.M. and Gilula N.B.** (1996): The gap junction communication channel. *Cell 84: 381-388*

77. **Kuriyama S., Kikukawa M., Masui K., Okuda H., Nakatani T., Sakamoto T., Yoshiji H., Fukui H., Ikeneka K., Mullen C.A. and Tsujii T.** (1999): Cytosine deaminase / 5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int. J. Cancer 81: 592-597*

78. **Kuriyama S., Masui K., Sakamoto T., Nakatani T., Tominaga K., Fukui H., Ikenaka K., Mullen C.A. and Tsujii T.** (1995): Bacterial cytosine deaminase suicide gene transduction renders hepatocellular carcinoma sensitive to the prodrug 5-fluorocytosine. *Int. Hepatol. Comm. 4: 72-79*

79. **Laemmli U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227: 680-685*

80. **Li G. and Herlyn M.** (2000): Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today 6: 163-169*

81. **Licht., Aksentijevich I., Gottesman M.M. and Pastan I.** (1995): Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoetic stem cells. *Blood 86: 111-121*

82. **Marini III F.C., Pan B.F., Nelson J.A, and Lapeyre J.N.** (1996): The drug verapamil inhibits bystander killing but not cell suicide in thymidine kinase-ganciclovir prodrug-activitated gene therapy: *Cancer Gene Ther. 3: 405-412*

83. **Merck & Co., Inc.** (1997): The Merck Index, Version 12.2. Published on *CD-ROM by Chapman & Hall EPD*

84. **Milano G. and Etienne M.-C.** (1994): Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). *Anticancer Res. 14: 2295-2298*

85. **Miller W.H. and Miller R.L**. (1980): Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem. 255: 7204-7207*

86. **Miller W.H. and Miller R.L**. (1982): Phosphorylation of acyclovir diphosphate by cellular enzymes. *Biochem. Pharmacol. 31: 3879-3884*

87. **Montelaro R.C.** (1987): Protein antigen purification by preparative protein blotting. *Electrophoresis 8: 432-438*

88. **Moolten F.L.** (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes; paradigm for prospective cancer control strategy. *Cancer Res. 46: 5276-5281*

89. **Moolten F.L. and Wells J.M.** (1990): Curability of tumor bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J. Natl. Cancer Inst. 82: 297-300*

90. **Moreno A., Fishman G ., Beyer E. and Spray D.** (1995 b): Voltage dependent gating and single channel analysis of heterotypic gap junction channels formed of Cx45 and Cx43. *Prog. Cell Res. 4: 405-408*

91. **Moreno A., Laing J., Beyer E. and Spray D.** (1995 a): Properties of gap junction channels formed by connexin45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am. J. Physiol. 268: C356-C365*

92. **Mullen C.A.** (1999): Cytosine Deaminase as a suicide gene in cancer gene therapy. In. Gene Therapy of cancer. Lattime E.C. and Gerson S.L., eds., *Academic press, pp 201-208*

93. **Mullen C.A., Kilstrup M. and Blaese R.M.** (1992): Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: A negative selection system. *Proc. Natl Acad. Sci. 89: 33-37*

94. **Mullen C.A, Coale M.M., Lowe R. and Blaese R.M**. (1994): Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res. 54: 1503-1506*

95. **Nielsen P.E.** (1999): Peptide nucleic acids as therapeutic agents. *Current Opinion in Structural Biology 9: 353-357*

96. **Nishihara E., Nagayama Y., Mawatari F., Tanaka K., Namba H., Niwa M. and Yamashita S.** (1997): Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo. *Endocrinology 138: 4577-4583*

97. **Nishiyama T., Kawamura Y., Kawamoto K., Matsumura H., Yamamoto N., Ito T., Ohyama A., Katsuragi T. and Sakai T**. (1985): Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res. 45: 1753-1761*

98. **Oldfield E.H.** (1993): Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther. 4: 39-69*

99. **Olsen J.C., Johnson L.G., Stutts M.J., Sarkadi B., Swanstrom R. and Boucher R.C.** (1992): Correction of the apical membrane chloride permeability defect in polarized cystic fibrosis airway epithelia following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther. 3: 253-266*

100. **Ono Y., Ikeda K., Wei M.X., Harsh IV G.R., Tamiya T. and Chiocca E.A.** (1997): Regression of experimental brain tumors with 6-thioxanthine and Escherichia coli gpt gene therapy. *Hum. Gene Ther. 8: 2043-2055*

101. **Palmer T.D., Rosman G.J., Osborne W.R.A. and Miller A.D.** (1991): Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactive introduced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1330-1334*

102. **Polak A. and Scholer H.J.** (1975): Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanism of resistence. *Chemotherapy 21: 113-130*

103. **Ram Z., Culver K.W., Walbridge S., Blaese R.M. and Oldfield E.H.** (1993): In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res. 53: 83-88*

104. **Ramesh R., Marrogi A.J., Munshi A., Abboud C.N. and Freeman S.M.** (1996 a): In vivo analysis of the bystander effect: a cytokine cascade. *Exp. Hematol. 24: 829-838*

105. **Ramesh R., Munshi A., Abboud C.N., Marrogi A.J. and Freeman S.M.** (1996 b): Expression of costimulatory molecules: B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. *Cancer Gene Ther. 3: 373-384*

106. **Reardon J.E. and Spector T.** (1989): Herpes simplex virus type I DNA polymerase: Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J. Biol. Chem. 264: 7405-7411*

107. **Rogulski, K.R.; Kim, J.H.; Sang, H.K.; and Freytag, S.O.** (1997 a). Glioma cells transduced with an *Escherichia coli* CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum. Gene Ther. 8; 73-85.*

108. **Rogulski K.R, Zhang K., Kolozsvary A., Kim J.H. and Freytag S. O.** (1997 b): Pronounced antitumor effects and tumor radiosensitization of double suicide gene therapy. *Clinical Cancer Res. 3: 2081-2088*

109. **Rosolen A., Frascella E., di Francesco C., Todesco A., Petrone M., Mehtali M., Zacchello F., Zanesco L. and Scarpa M.** (1998): In vitro and in vivo antitumor effects of retrovirus mediated herpes simplex thymidine kinase gene transfer in human medulloblastoma. *Gene Therapy 5: 113-120*

110. **Ross W.J.C.** (1961): Increased sensitivity of Walker tumours towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pre-treatment. *Biochem. Pharmacol. 8: 235-240*

111. **Roth J.H. and Christiano R.J.** (1997): Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst. 89: 21-29*

112. **Ruch R.J., Madhukar B.V., Trosko J.E. and Klauning J.E.** (1993): Reversal of ras-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication, transformation and tumorgenesis by lovastatin. *Mol. Carcinog. 7: 50-59*

113. **Salinowich O. and Montelaro R.** (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-PAGE, *Anal. Biochem. 156, 341-347*

114. **Samejima Y. and Meruelo D.** (1995): "Bystander killing" induces apoptosis and is inhibited by forskolin. *Gene Ther. 2: 50-58*

115. **Scanlon K.J., Ohata Y., Ishida H., Kijima H., Ohkawa T., Kaminski A., Tsai J., Horng G. and Kashani-Sabet M.** (1995): Oligonucleotide mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB J. 9: 1288-1291*

116. **Scharfman R., Azelrod J.H. and Verma I.M.** (1991): Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4626-4630*

117. **Seligman A.M., Karnovsky M.J., Wasserkrug H.L., Hanker J.S.** (1968): Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with polymerizing osmiophilic reagent diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol. 38:1-14*

118. **Shine H.D. and Woo S.L.C.** (1996): Adenovirus-mediated gene therapy of tumours in the central nervous system. *Academic Press, London*

119. **Simon A.M. and Goodenough D.A.** (1998): Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trend in Cell Biol. 8: 477-483*

120. **Sorcher E.J., Peng S., Bebok Z., Allan P.W., Bennet L.L.J. and Parker W.B.** (1994): Tumor cell killing in colonic carcinoma utilizing the E. coli DeoD gene to generate toxic purines. *Gene Ther. 1: 233-238*

121. **Stubbs M.** (1998): Tumour pH. In: Blood perfusion and microenvironment of human tumors – Implication for clinical radiooncology. M. Molls and P. Vaupel (eds.) *Springer Verlag: 113-120*

122. **Stubbs M., McSheey P.M.J., Griffiths J.R. and Bashford C.L.** (2000): Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Medicine Today 6: 15-19*

123. **Tamiya T., Ono Y., Wei M.X., Mroz P.J., Moolten F.L. and Chiocca E.A.** (1996): Escherichia coli gpt gene sensitizes rat glioma cells to killing by 6-thioxanthine or 6-thioguanine. *Cancer Gene Ther. 3: 155-162*

124. **Tannock I.F**. (1998): Conventional cancer therapy: promise broken or promise delayed? *Lancet 351 (Suppl. 2): SII9-SII16*

125. **Thurst R., Schacke M. and Wutzler P.** (1996): Cytogenetic genotoxicity of the antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues. *Antivi. Res. 31: 105-113*

126. **Tomasetto C., Neveu M.J., Daley J., Horan P.K. and Sager R.** (1993): Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol. 122: 157-167*

127. **Touraine R.L., Vahanian N., Ramsey W.J. and Blaese R.M. (1998):** Enhancement of the herpes simplex virus thymidine kinase / Ganciclovir bystander effect and its antitumor efficacy in vivo by pharmacologic manipulation of gap junctions. *Hum. Gene Ther. 9: 2385-2391*

128. **Touraine R.L.; Ishii-Morita H.; Ramsey W.J. and Blaese, R.M.** (1998): The bystander effect in the HSVtk/ganciclovir system and its relationship to gap junctional communication. *Gene Ther. 5; 1705-1711.*

129. **Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354*

130. **Trinh Q.T., Austin E.A., Murray D.M., Knick V.C. and Huber B.E.** (1995): Enzyme / prodrug gene therapy: Comparison of cytosine deaminase / 5-fluorocytosine versus thymidine kinase / ganciclovir enzyme / prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res. 55: 4808-4812*

131. **Trosko J.E. and Ruch R.J**. (1999): Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci. 3; 208-236*

132. **Trosko J.E., Chang C.C., Madhukar B.V. and Klaunig** (1990): Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology 58: 265-278*

133. **Varmus H. und Weinberg R.A.** (1994): Gene und Krebs - Biologische Wurzeln der Tumorentstehung. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidleberg*

134. **Veenstra R.D.** (1996): Size and selectivity of gap junctional channels formed from different connexins. *J. of Bioenergetics and Biomembranes 28: 327-337*

135. **Veenstra R.D., Wang H.Z., Beblo D.A., Chilton M.G., Harris A.L., Beyer E.C. and Brink P.R.** (1995): Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circul. Res. 77: 1156-1165*

136. **Vermes A., van der Sijs H. and Guchelaar H.-J.** (2000): Flucytosine: Correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy 46: 86-94*

137. **Vrionis F.D., Wu J.K., Waltzman M., Cherington V. and Spray D.C.** (1997): The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via

gap junctions. *Gene Therapy 4: 577-585*

138. **Warburg O.** (1930): The metabolism of tumours. *Arnold Constable, London*

139. **Wei M.X., Bougnoux P., Sacré-Salem B., Peyrat M.B., Lhuillery C., Salzmann J.-L. and Klatzman D.** (1998): Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. *Cancer Res. 58: 3529-3532*

140. **Weinberg R.A.** (1989): Oncogenes, anti-oncogens and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res. 49: 3713-3721*

141. **White T., Paul D., Goodenough D. and Bruzzone R.** (1995): Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell 6:0459-470*

142. **Wike Hooley J.L., Haveman J. and Reinhold H.S.** (1984): The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiotherapy and Oncocogy 2: 343-366*

143. **Wohlhueter R.M., Mc Ivor R.S. and Plagemann P.G.W.** (1980): Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J. Cellular Physiol. 104: 309-319*

144. **Yamamoto S. and Kawasaki T.** (1981): Active transport of 5-fluorouracil and its energy coupling in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biochem. 90: 635-642*

7 Konferenzbeiträge

7.1 Vorträge

Oktober 2000
International Symposium on Molecular Radiology, Marburg

Thema: „The Bystander Effect of a Suicide Gene Therapy in the Dunning Rat Prostate Tumour Model R3327 AT-1 in vivo"

Oktober 2000
Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO)

Thema: „Einfluss des Bystander-Effektes bei einer *in vivo* Suizidgen-Therapie im Dunning R3327 AT-1 Tumormodel"

Strahlentherapie und Onkolgie 2000; 176: 45

7.2 Poster

Januar 2001
Graduiertenforum DKFZ 2001

Thema: „ Distaler-Bystander-Effekt bei einer in vivo Suizidgen-Therapie"

8 Danksagung

Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens
(Jean Baptiste Massieu)

Herrn **PD Dr. Dr. Jürgen Debus** danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung eines Laborplatzes und sämtlicher kostspieliger Arbeitsmaterialien. Besonders möchte ich mich für die ständige und konstruktive Diskussionsbereitschaft, trotz der vielen Termine, bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Jürgen Markl** danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie und für seine nützlichen Ratschläge.

Herrn **Dr. Peter Peschke** danke ich für die engagierte Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn **Dr. Dr. Ivan Zuna** möchte ich mich ganz herzlich für die statistische Auswertung der Tierexperimente bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an **Gabriele Becker** und **Dietmar Greulich**, ohne deren Hilfe die Tierexperimente nicht durchführbar gewesen wären.

Herrn **Dr. William Hull** danke ich vielmals für die ^{19}F-NMR Messungen und die hilfreichen Diskussionen über das Sorgenkind 5-FU.

Frau **Ulrike Bauder-Wüst** möchte ich für die Einarbeitung und Hilfe bei den MTS-Analysen danken.

Prof. Dr. J.H. Kim und **Dr. Svend Freytag** danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe am Henry Ford Hospital in Detroit und für die Bereitstellung der AT-1/CDglyTK Zelllinie.

Boehringer Ingelheim möchte ich für das Stipendium danken, wodurch mein zweimonatiger Forschungsaufenthalt in Detroit, USA, ermöglicht wurde.

Ralph P. Mason danke ich für die intratumoralen pH-Messungen.

Bei Frau **Angelika Höss** möchte ich mich für die Durchsicht des „-tose/-tase“ Manuskriptes bedanken.

Den Physikern **Dr. Jürgen Jenne**, **Dr. Ioannis Simiantonakis** und **Dr. Ralf Rastert** möchte ich vielmals danken für ihre ständige Bereitschaft alle meine Computerprobleme (und der gab es viele) zu lösen.

Meiner **Arbeitsgruppe** und der **Abteilung E500** möchte ich für die freundliche Aufnahme, die vielen netten „Schwätzchen“ und für das Interesse an meiner Arbeit danken.

Wenn auch am Ende, aber doch an erster Stelle, möchte ich meinem Mann **Jörg** danken, der mich in den vielen Momenten, in denen mal wieder etwas schief ging, aufgebaut und immer an mich geglaubt hat.

9 Lebenslauf

Heike Corban-Wilhelm

Adresse:

	Deutschland
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Geburtsdatum:	23.09.1969
Geburtsort:	Trier
Familienstand:	verheiratet

Ausbildung

05/1989	**Allgemeine Hochschulreife** am Treviris-Gymnasium in Trier
10/1989 – 02/1993	Studium zum **Diplom-Chemieingenieur** an der Fachhochschule Fresenius in Wiesbaden Thema der Diplomarbeit: „Radiochemische Methoden zur Bestimmung des Abrasionsverhaltens von Zahnpflegemitteln“
04/1993 – 04/1998	Studium der **Biologie** an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz mit **Diplomabschluss** Thema der Diplomarbeit: „Regulation und Mechanismen der Morphogenese des Hepatitis B-Virus“
06/1998 – 02/2001	**Dissertation** am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg Thema der Dissertation: “Untersuchungen zur Charakterisierung der Bystander-Effekte bei einer *in vivo* Therapie mit Suizidgenen“

Praktika

06/1989 – 08/1989 Praktikum im Labor der Weinkellerei Augustus in Trier

08/1990 – 09/1990 Praktika in den Labors von Gabelmann & Lerch Analytik
07/1991 – 08/1991 in Mainz

08/1995 – 12/1995 Praktikum am Institut für Immunologie in Mainz

Anstellung

08/1991 – 08/1992 Beschäftigung während der Semesterferien bei Gabelmann & Lerch Analytik in Mainz

02/1993 – 11/1996 Dauerarbeitsverhältnis als Diplom-Ingenieur bei Gabelmann & Lerch Analytik in Mainz

seit 06/1998 Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Zusatzqualifikationen

seit 07/1992 Fachkunde im Strahlenschutz
seit 10/1997 Ausbildung zur Beauftragten für die biologische Sicherheit gentechnischer Anlagen
seit 09/1998 Weiterbildung in Versuchstierkunde

Auslandsaufenthalte

09/1999 – 11/1999 Forschungsaufenthalt am Henry Ford Hospital, Detroit, USA
Abteilung: “Radiation Oncology and Molecular Biology”

Stipendien

Boehringer Ingelheim Fonds

Heidelberg, Februar 2001

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Heidelberg, im Februar 2001 _____

(Heike Corban-Wilhelm)