Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurochirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Christian Strauss)

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Die optische Darstellung der Gentherapie mit der Herpes-simplex-Virus-Typ 1 – Thymidinkinase bei malignen Hirntumoren

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

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

von Christian Theiß
geboren am 21.08.1976 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. W. Burkert, Emeritus
Gutachter: Prof. Dr. med. habil. S. Zierz
Prof. Dr. med. habil. S. Hauptmann
PD Dr. med. habil. M. Krasnianski

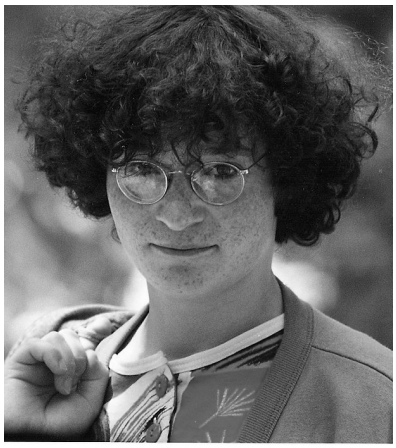
Eröffnung des Promotionsverfahrens: 21.09.2006
Tag der Verteidigung: 19.04.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011815
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011815]

gewidmet

meiner lieben Schwester

Petra Mayer



Kurzreferat

Die Prognose des Glioblastoma multiforme (GBM) hat sich in den letzten 25 Jahren trotz einer sich ständig verbesserten Diagnostik und Therapie kaum verbessert [11,23]. Die Suizidgentherapie mit dem HSV-Thymidinkinase/Ganciclovir-System konnte in Tierversuchen eine deutliche Größenreduktion bzw. vollständige Zerstörung maligner Gliome erreichen [91,107,148], jedoch ohne vergleichbaren Erfolg in klinischen Studien bei Gliompatienten [55,104,108,119]. Ein wichtiges methodisches Problem scheint hierbei die geringe Transduktion der Tumorzellen zu sein [55], so dass die Entwicklung effizienterer Vektorsysteme zur Verbesserung der Transduktion und Genexpression in vivo im Vordergrund steht [74]. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer nichtinvasiven und quantitativen Darstellung von Lokalisation, Stärke und zeitlichem Verlauf der Genexpression mittels Biolumineszenz. Hierzu wird eine Genfusion der cDNAs von HSV-Tk und Luc unter der Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors eingesetzt, wodurch die HSV-Tk Aktivität indirekt durch die biolumineszente Lichtemissionen der Luciferase dargestellt werden kann. Zur Beurteilung der korrelierten Koexpression der Fusions-Partner innerhalb der HSV-Tk-Luc-Fusion, werden die für HSV-Tk, Luc und HSV-Tk-Luc kodierende cDNAs in vitro äquimolar in unterschiedlichen Mengen transient und stabil in humane U87MG-Zellen transfiziert und die entsprechenden Enzymaktivitäten durch MTT-Zytotoxizitätstests und Luciferase-Assays (Fa. Promega) bestimmt. Die enge Korrelation der Enzymaktivitäten von r^2=0,98 ($p<0,001$) bei transienter Transfektion und von r^2=0,99 ($p<0,001$) bei stabiler Transfektion stellt dabei die Grundvoraussetzung für die Verwendung der Luciferase als Reporter für den zytotoxischen Effekt des HSV-Tk/GCV-Systems [40] dar.

Festgestellt wurde ein Funktionsverlust der HSV-Tk-Luc Fusion von 16-40% bei der HSV-Tk Aktivität und von 55-86% bei der Luciferaseaktivität im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen festgestellt, der wahrscheinlich auf sterischen Behinderungen innerhalb des Fusionsproteins beruht. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass mit der bestehende Aktivität des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins die biolumineszente Darstellung der Gentherapie in vitro und in vivo möglich ist. Mit einem stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden Zellklon wurden Xenograftexperimente an Nacktmäusen (n=10) durchgeführt. Pro Maus wurden im Bereich des Rückens 4 Tumore aus $2x10^6$ U87MG-HSV-Tk-Luc Zellen gesetzt. Ab einem Tumorvolumen von ca. 125 mm^3 wurde eine 14-täge GCV-Therapie (i.p.) durchgeführt (n=7). Nicht behandelte Tiere (n=3) erhielten NaCl 0,9 % (i.p.). Die Korrelation zwischen der seriellen simultanen Detektion der biolumineszenten Signale (CCD-Kamera) und der Tumorgröße (Schiebelehre) betrug bei den behandelten Tieren (n=7) r^2=0,93 (p=0,008) und bei den Kontrolltieren (n=3) r^2=0,98 (p=0,010), wobei eine vollständige Regression aller behandelten subkutanen Tumore erreicht wurde.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass durch den Einsatz eines HSV-Tk-Luc Fusionsproteins eine erfolgreiche Gentherapie maligner Gliome möglich ist und das die Effektivität dieses Therapieverfahrens durch die biolumineszente Bildgebung seriell, nichtinvasiv und quantitativ sowohl in vitro als auch in vivo dargestellt werden kann.

Theiß, Christian : Die optische Darstellung der Gentherapie mit der Herpes-simplex-Virus-Typ 1 – Thymidinkinase bei malignen Hirntumoren. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2006

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	**Einleitung und Zielstellung**	**1**
1.1	Die Suizidgentherapie mit dem HSV-Thymidinkinase/Ganciclovir-System	1
1.2	Der Bystander-Effekt	3
1.3	Optimierung der HSV-Tk / GCV-Suizidgentherapie in vivo	4
1.4	Nichtinvasive Techniken der molekularen Bildgebung	5
1.4.1	Positronen-Emissions-Tomografie (PET) / (SPECT)	5
1.4.2	Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT)	6
1.4.3	Fluoreszenz-Bildgebung	7
1.4.4	Biolumineszenz	8
1.4.5	Biolumineszenz zur nichtinvasiven bildlichen Darstellung molekularer Prozesse	10
1.5.	Zielstellung der Arbeit	11
2	**Material und Methoden**	**12**
2.1	Chemikalien	12
2.2.	Vektoren und Plasmide	12
2.3	Zellkultur-Materialien	13
2.3.1	Verwendete Zelllinien	13
2.3.2	Plastikmaterialien für die Zellkultur und andere Verbrauchsmaterialien	13
2.3.3	Geräte	13
2.3.4	Zellkulturmedien, Antibiotika und Gebrauchslösungen	14
2.4	Routinemethoden der Zellkultur	15
2.4.1	Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen	15
2.4.2	Kultivieren der Zellen	15
2.4.3	Zellzahlbestimmung	15
2.4.4	Lichtmikroskopische Dokumentation	15
2.4.5	Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen	16
2.4.6	Mycoplasmen-Testung	16
2.4.7	Herstellung von Zell-Lysaten	17
2.5	Gentechnische Methoden in der Zellkultur	17
2.5.1	Transiente Transfektion	18
2.5.2	Stabile Transfektion	18
	Bestimmung der Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum G418	19

2.6.	Zellkultur-Assays	19
2.6.1	MTT – Zytotoxizitätsassay	19
2.6.2	Bradford-Protein Assay	20
2.6.3	Bestimmung der Luciferase-Aktivität	21
	Puffer und Lösungen	21
	Durchführung des Luciferase-Assays	21
2.7	Biolumineszenz-Bildgebung intakter Zellen	22
2.7.1	Sensitivität	22
2.7.2	Optische Darstellung der HSV-Tk Aktivität in intakten Zellen	22
2.8	Tierexperimentelle Methoden	22
2.8.1	Geräte und Materialien	22
2.8.2	Versuchstiere	23
2.8.3	Vorbereitung der Zellen für die Injektion (s.c.) in Nacktmäusen	23
2.8.4	Narkose	23
2.8.5	Zellinjektionen	23
2.8.6	Biolumineszenz-Bildgebung in vivo	24
2.8.7	Bestimmung des Tumorvolumens	24
2.8.8	GCV-Therapie	24
2.8.9	Tötung und Tumorexplantation	25
2.9	Histologische Untersuchungen	25
2.9.1	Geräte und Materialien	25
2.9.2	Chemikalien, Gebrauchslösungen und Antikörper	25
2.9.3	Herstellung von Tumorgewebeschnitten	26
2.9.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	26
2.9.5	Immunhistochemie	26
2.10	Verwendete Computer-Software	27
2.11	Statistik	28
3	**Ergebnisse**	**29**
3.1	MTT-Zytotoxizitätstest	29
3.2	Transiente Expression von Luc, HSV-Tk und der Fusion zwischen HSV-Tk und Luc	30
3.2.1	Transiente Expression der HSV-Tk	30
3.2.2	Transiente Expression der P. pyralis Luc	30
3.2.3	Transiente Expression des Fusionskonstrukts HSV-Tk-Luc	31
3.2.4	Transiente Kotransfektion der HSV-Tk und Luc auf verschiedenen Vektoren	32

3.3	Stabile Transfektion der Luc, HSV-Tk und der Fusion zwischen HSV-Tk und Luc	34
	Resistenzbestimmung gegenüber dem Selektionsantibiotikum G418	34
3.4	HSV-Tk in Fusion mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen	36
3.5	Biolumineszenz-Bildgebung in intakten Zellen	39
3.5.1	Sensitivität	39
3.5.2	Biolumineszenz-Signalstärke: D-Luciferin versus Aminoluciferin	39
3.5.3	Biolumineszente Quantifizierung der HSV-Tk Aktivität in intakten Zellen	41
3.6	Biolumineszenz-Bildgebung in vivo	42
3.6.1	Zeitverlauf und Sensitivität des Biolumineszenz-Signals	42
3.6.2	Biolumineszenz-Darstellung der Gentherapie mit HSV-Tk-Luc im Maus-modell	43
	Versuchsreihe in vivo (10 Versuchstiere)	43
	Maus 11	46
3.7	Histologische Ergebnisse – Maus 11	48
4	**Diskussion**	**49**
4.1	Darstellung der HSV-Tk – Aktivität mittels eines biolumineszenten Reportergens	49
4.2	Charakterisierung der HSV-Tk-Luc Fusion	50
4.2.1	Korrelation der Enzymaktivitäten	50
4.2.2	Mögliche Limitationen für den Einsatz der HSV-Tk-Luc Fusion	50
4.3	Sensitivität der biolumineszenten Bildgebung	52
4.4	Quantifizierung der biolumineszenten Bildgebung	53
4.5	Darstellung der Gentherapie mit der HSV-Tk-Luc Fusion im Maus-modell	54
5	**Schlußfolgerung und Ausblick**	**55**
6	**Zusammenfassung**	**56**
7	**Literaturverzeichnis**	**58**
8	**Thesen**	**73**

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
BLI	Biolumineszenz-Bildgebung
CCD-Kamera	“charged coppled device” - Kamera
CMV	Cytomegalie-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F-Luc	P. pyralis-Luciferase
GBM	Glioblastoma multiforme
GCV	Ganciclovir
HSV-Tk	Herpes simplex virus typ 1 – Thymidinkinase
i.p.	intraperitoneal
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle (“internal ribosomal entry site“)
i.v.	intravenös
Luc	Luciferase
R-Luc	Renilla-Luciferae
RNA	Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie
MW	Molekulargewicht
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
s.c.	subkutan
SPECT	Single-Photonenemissions-Computer-Tomografie
T87MG	humane Glioblastom-Zellen
U87MG	humane Glioblastom-Zellen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (“World Health Organization”)

1 Einleitung und Zielstellung

Die häufigsten primär malignen Hirntumore nehmen ihren Ursprung vom astrozytären Bindegewebe des Gehirns und werden als Gliome bezeichnet. Entsprechend dem Malignitätsgrad erfolgt eine Einteilung dieser Tumore gemäß der WHO in 4 Klassen, wobei die Gliome mit dem höchsten Malignitätsgrad (IV) als Glioblastoma multiforme (GBM) bezeichnet werden. Das Glioblastoma multiforme (GBM) tritt mit einer Inzidenz von 3-4 / 100.000 Einwohner pro Jahr auf [11].

Trotz einer ständigen Verbesserung der Diagnostik, der mikroinvasiven neurochirurgischen Therapie sowie der Radio- und Chemotherapie hat sich die Prognose des GBM bei einer medianen Überlebenszeit von weniger als 12 Monaten in den letzten 25 Jahren kaum verbessert [11,23]. Die Resistenz des GBM gegenüber einer multimodalen Therapie ist auf das ausgeprägt invasive und infiltrative Tumorwachstum dieser Tumore zurückzuführen. Des Weiteren wurden eine Reihe genetischer Veränderungen entdeckt, die bei der Gliom-entstehung eine Rolle spielen. So wurde zum Beispiel eine vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren in Gliomen festgestellt, was zu einer gesteigerten Angiogenese und damit besseren Blutversorgung der Tumorzellen führt [99].

Angesichts der schlechten Prognose ist die Entwicklung neuer Strategien/Therapien zur Bekämpfung maligner Hirntumoren zu einem bedeutenden Ziel für die medizinische Forschung geworden.

Ein vielversprechender Ansatzpunkt der Therapie des GBM ist die Gentherapie. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene gentherapeutische Strategien zur Behandlung maligner Hirntumoren entwickelt [157]. Besonderes Interesse liegt dabei in der Sensibilisierung des Tumors gegenüber Chemotherapeutika, Erhöhung der Immunogenität oder Veränderung der Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, um die Steuerung von Zellzyklus, Apoptose, Signaltransduktion oder Angiogenese innerhalb des Tumorgewebes zu verändern.

1.1 Die Suizidgentherapie mit dem HSV-Thymidinkinase / Ganciclovir-System

Ein für unterschiedliche Tumoren verfolgtes gentherapeutisches Prinzip ist die Suizidgen-therapie. Sie beruht auf der Expression direkt oder indirekt toxisch wirkender Genprodukte in der Tumorzelle. Direkt toxische Genprodukte sind beispielsweise bakterielle Toxine, wie das Diphterietoxin aus dem Corynebacterium diphteriae. Indirekt toxische Genprodukte sind so genannte „Prodrug“-aktivierende Enzyme, die eine zunächst ungiftige oder nur gering toxische Substanz (Prodrug) in für die Zelle toxische Produkte umsetzen. Das am besten untersuchte und bereits in klinischen Studien eingesetzte Suizidgen / Prodrug-System ist das Thymidinkinase (HSV-Tk) / Ganciclovir (GCV) - System. Hierbei wird das Thymidinkinase-

Gen des Herpes simplex Virus Typ 1 mit Hilfe viraler- bzw. nichtviraler Vektoren in die Tumorzellen geschleust. Intrazellulär wird das durch dieses Gen kodierte Enzym (HSV-Tk) exprimiert. Dieses metabolisiert das entsprechende, systemisch verabreichte Enzymsubstrat bzw. Prodrug (GCV). Die HSV-Thymidinkinase katalysiert die Monophosphorylierung des Nucleosidanalogons Ganciclovir (GCV) mit einer 1000-fach höheren Effizienz als die zellulären Thymidinkinasen, so daß GCV für nicht infizierte Zellen so gut wie nicht toxisch ist [37]. Nach weiteren Phosphorylierungen durch vorhandene, zelluläre Enzyme entsteht GCV-Triphosphat, ein toxisches Molekül, das zur Zerstörung der Tumorzellen führt [19]. Durch Hemmung der DNA-Polymerase und Einbau des phosphorylierten GCV in die wachsende DNA-Kette resultiert bei der Replikation ein DNA-Kettenabbruch und die Apoptose der Zellen [1] (**Abb. 1**). Da die RNA- und Proteinsynthese unbeeinflusst bleibt, beschränkt sich die Wirkung auf proliferierende Zellen und bietet so eine gewisse Tumorspezifität.

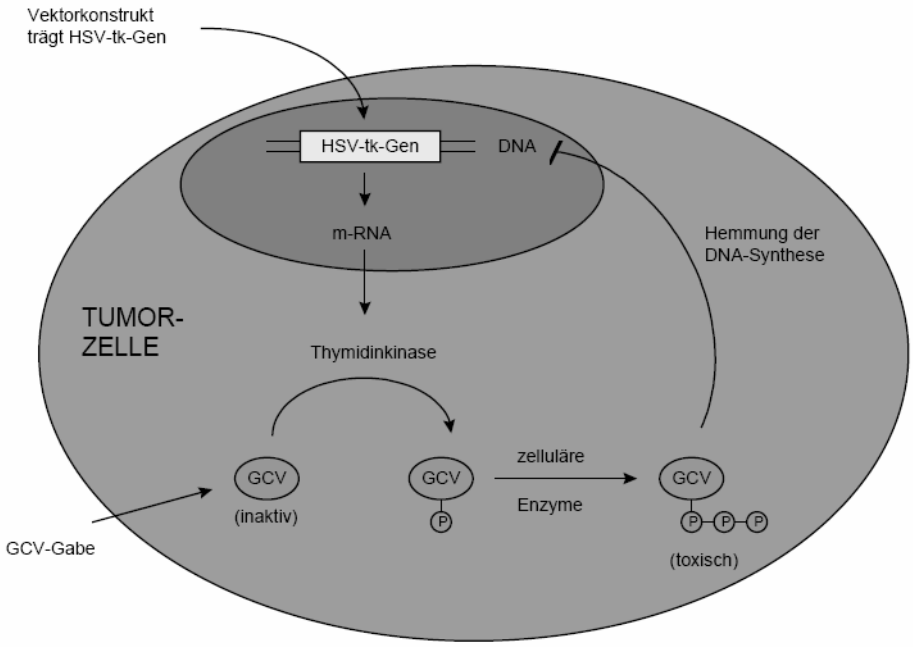


Abb. 1 [47]
Nach Einschleusung des HSV-Tk-Gens in die Tumorzelle wird die virale Thymidinkinase synthetisiert und systemisch verabreichtes GCV wird in toxisches GCV-Triphosphat umgesetzt. Die Hemmung der DNA-Synthese und der Einbau des Nukleosidanalogons GCV-Triphosphat in die DNA führen zum DNA-Kettenabbruch und zur Apoptose der Tumorzelle.

Vorteile dieses Therapieansatzes sind: 1) die Zytotoxizität ist unabhängig vom genetischen Profil der Tumorzellen, 2) schnell proliferierende GBM-Zellen gelten als ideale Zellpopulation, umgeben von nicht proliferierenden Nervenzellen, 3) es besteht nur eine relativ geringe systemische Toxizität, 4) die Zytotoxizität erstreckt sich auch auf nicht transduzierte Nachbarzellen, die über „Gap junctions“ mit Transgen-modifizierten Zellen kommunizieren (Bystander-Effekt, s.u.). Zusätzlich werden eine hämorrhagische Tumornekrose infolge der

direkt toxischen Wirkung auf Endothelzellen und eine unspezifische Immunreaktion vermutet [95].

1.2 Der Bystander-Effekt

Obwohl mit dem HSV-Thymidinkinase / Ganciclovir-System nur proliferierende Zellen abgetötet werden, besteht ein großer Vorteil dieses Systems im so genannten „Bystander Effekt“ [18,36]. Dieser definiert einen zusätzlichen Therapieeffekt, bei dem neben den HSV-Tk exprimierenden Zellen auch benachbarte, nicht transduzierte Zellen (Bystander-Zellen) durch GCV abgetötet werden können. Der Mechanismus des Bystander-Effekts wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Der Transfer apoptotischer Vesikel [36,93], eine lokale oder systemische Immunantwort [37] oder aber eine sehr hohe Aktivität der viralen Thymidinkinase in den transduzierten Zellen [12] werden mit dem Bystander Effekt in Zusammenhang gebracht. Eine zentrale Bedeutung wird jedoch der Übertragung von GCV-Triphosphat durch so genannte „Gap Junctions“ in benachbarte Zellen zugeschrieben [137]. „Gap Junctions“ sind aus Konnexinen aufgebaute Membrankanäle mit einem Durchmesser von ca. 2 nm, die dem Informationsaustausch benachbarter Zellen dienen und Molekülen (< 1 kDa MW) den Übertritt in die Nachbarzelle erlauben [120]. Beim Verlassen der Zelle in Richtung des interstitiellen Raums wird GCV-Triphosphat dagegen von körpereigenen Phosphatasen in GCV zurückgeführt und damit deaktiviert. Damit ermöglicht der Bystander Effekt eine Tumorregression, auch wenn weniger als 10% der Tumorzellen die HSV-Tk exprimieren [36] (**Abb. 2**).

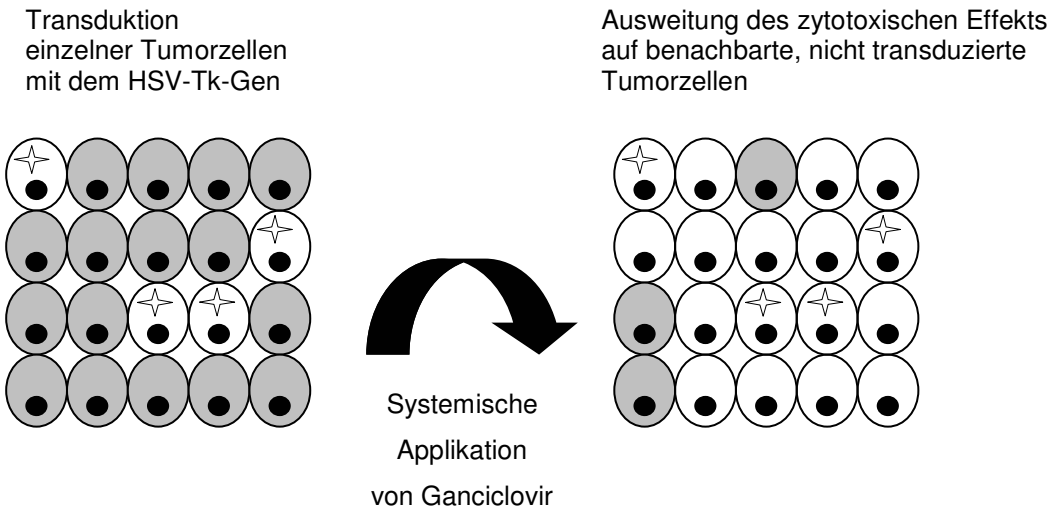


Abb. 2
Nach Transduktion einzelner Tumorzellen mit dem HSV-Tk Gen, werden im Rahmen des Bystander Effektes auch benachbarte, nicht HSV-Tk exprimierende Zellen (Bystander-Zellen) durch die Übertragung von toxischen GCV-Triphosphat-Molekülen via „Gap Junctions“, abgetötet.

1.3 Optimierung der HSV-Tk / GCV-Suizidgentherapie in vivo

Nachdem die HSV-Tk / GCV-Suizidgentherapie in Tierversuchen eine deutliche Größenreduktion bzw. vollständige Zerstörung maligner Gliome erreichen konnte [91,107,148], folgten zahlreiche klinischen Studien, was schließlich in einer Phase III Studie bei Gliompatienten kulminierte [55,104,108,119]. In dieser Studie erfolgte nach Tumorresektion und Bestrahlung die adjuvante HSV-Tk / GCV-Suizidgentherapie durch intra- und peritumoral applizierte Vektor produzierende Zellen und nachfolgender systemischer GCV-Gabe. Ein therapeutischer Effekt in Form einer signifikant verlängerten Überlebenszeit konnte nicht nachgewiesen werden. Ein wichtiges methodisches Problem scheint hierbei die sehr geringe Transduktionseffizienz zu sein [55]. Obwohl aufgrund des sog. Bystander-Effekts für eine erfolgreiche Therapie mit dem HSV-Tk / GCV-System im Tiermodell die Transduktion von etwa 50 Prozent der Tumorzellen ausreicht [18,36,84,107,117], scheint selbst diese niedrige Schwelle in klinischen Studien nicht erreicht worden zu sein. In den wenigen bisher ex vivo untersuchten Tumoren wurde eine Transduktionseffizienz von 0.002% bis 4% bei retroviralen Vektoren und von 0.01% bis 11% bei adenoviralen Vektoren festgestellt [55,82,127, zur Übersicht 106]. Des Weiteren konnte aufgrund einer begrenzten in vivo Lebensdauer transduzierter Zellen nur eine temporäre Expression der HSV-Tk erreicht werden.

Für die Optimierung der Gentherapie steht deshalb die Entwicklung effizienterer Vektorsysteme zur Verbesserung der Transduktion und Genexpression in vivo im Vordergrund [74]. Um dies zu erreichen, ist neben der Beurteilung von Lokalisation und Stärke der Genexpression vor allem der zeitliche Verlauf dieses Prozesses von Bedeutung. Limitierend war bisher, daß die dafür notwendigen histopathologischen, zytologischen und molekularbiologischen Untersuchungen ex vivo erfolgten [55,100]. Um beispielsweise den zeitlichen Verlauf der Genexpression im Tiermodell ex vivo zu untersuchen, müssen sehr viele Versuchstiere eingesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden. Dies ist neben tierschutzrechtlichen und ethischen Bedenken mit einem nicht unerheblichen finanziellen Aufwand verbunden. Des Weiteren wird die Reproduzierbarkeit und damit die statistische Signifikanz der gewonnenen Ergebnisse durch interindividuelle Schwankungen beeinträchtigt. Die Beurteilung der Genexpression im Rahmen einer Gentherapie am Menschen kann bisher nur über die Analyse der Überlebenszeiten der Patienten bzw. ex vivo durch histologische Untersuchungen des Tumors erfolgen. Dadurch ist eine Optimierung der Therapie angesichts der sehr kurzen Überlebenszeit von Gliompatienten unmöglich.
Hier könnte eine Technologie zur nichtinvasiven quantitativen und bildlichen Darstellung der Genexpression durch serielle Untersuchungen des gleichen Versuchstieres Abhilfe schaffen.

1.4 Nichtinvasive Techniken der molekularen Bildgebung

Die molekulare Bildgebung hat ihre Wurzeln in der Nuklearmedizin, wo schon früh radioaktiv markierte Moleküle (sog. Reportermoleküle) zur Darstellung zellulärer bzw. subzellulärer Prozesse eingesetzt wurden. Durch die zunehmenden Kenntnisse in den verschiedenen Fachgebieten, wie z.B. der Molekularbiologie, Biotechnologie oder funktionellen Genetik, wurden in den vergangenen 10 Jahren immer neue molekulare Markierungsmöglichkeiten mit entsprechenden Detektionstechnologien entwickelt, die sich hauptsächlich in fünf Eigenschaften unterscheiden [85]: 1) räumliche und zeitliche Auflösung, 2) mögliche Eindringtiefe der Darstellung, 3) notwendiger Aufwand (bezogen auf Apparatur, Arbeitsaufwand, finanzielle Kosten), 4) Verfügbarkeit und Applikationsform biokompatibler Reportermoleküle und 5) Sensitivität.

Für die Bildgebung verwendete Reportergene kodieren für ein Enzym (Reporterenzym) oder einen zellulären Rezeptor. Nach der Applikation des entsprechenden Substrats erfolgt eine durch das Reporterenzym katalysierte Reaktion. Abhängig von der Art des Reportergens können dabei unterschiedliche Substrate eingesetzt werden. Radioaktiv markierte oder paramagnetische Substrate lassen, z.B. durch das Ausmaß ihrer intrazellulären Akkumulation, Rückschlüsse auf die Aktivität des Reporterenzyms zu, wohingegen bei optischen Darstellungsverfahren die Quantität einer photochemischen Reaktion zwischen Reporterenzym und Substrat genutzt wird.

Bisher kommen Verfahren zum Einsatz wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Single-Photonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT). Einige neuere, nichtinvasive Darstellungsverfahren beruhen auf der Transduktion von Reportergenen, die zu einer enzymatisch katalysierten Lichtreaktion (Biolumineszenz) [4,15,16,85] oder zu einer nach externer Lichtanregung auftretenden Fluoreszenz [155] führen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Verfahren ist die Möglichkeit, durch die Verwendung von Molekülen unterschiedlicher spektraler Eigenschaften, verschiedene molekulare Prozesse darstellen zu können [141].

1.4.1 Positronen-Emissions-Tomografie (PET) / (SPECT)

Zur PET verwendet man Reportersubstrate bzw. Liganden die durch radioaktive Isotope mit kurzer Halbwertszeit, wie z.B. ^{15}O, ^{13}N, ^{11}C oder ^{18}F, markiert wurden. Diese radioaktiven Isotope emittieren aus ihrem Atomkern ein Positron, welches mit einem Elektron kollidiert. Die Registrierung der hierbei entstehenden, hochenergetischen Gammastrahlung ist mit einer Sensitivität von ca. 10^{-11}-10^{-12} mol/l Isotop und einer räumlichen Auflösung von ca. 8 mm^3 möglich [42,85]. Auch die Verwendung von Isotopen welche niedrigenergetische Gamma-Strahlen emittieren, z.B. ^{99m}Tc, im Rahmen der SPECT ist möglich. Allerdings sind hier bei

geringerer Sensitivität (10^{-10}-10^{-11} mol/l Isotop) spezielle um das Objekt rotierende „Gamma-Kameras“ notwendig [114]. Da alle zur PET eingesetzten Isotope, im Unterschied zur SPECT, Gamma-Strahlung des gleichen Energiegehalts emittieren, ist eine simultane Detektion unterschiedlich markierter Substrate mittels PET nicht möglich [85].

Der Einsatz der PET zur nichtinvasiven bildlichen Darstellung der Genexpression des Reportergens HSV-Tk wurde bereits in mehreren Studien untersucht [38,39,65,131-133], erfordert allerdings teure Spezialgeräte und aufgrund des raschen Isotopenzerfalls ein Zyklotron vor Ort [68]. Zum Einsatz kommt hierbei eine genetisch veränderte HSV-Tk (HSV-sr39tk), die speziell für die PET optimiert wurde. Das markierte Substrat der HSV-Tk, wie z.B. das Thymidin-Analogon FIAU (2´-Fluor-2´-desoxy-1-ß-D-ara-binofuranosyl-5-Jod-Uracil) oder ^{18}F-Ganciclovir bzw. ^{18}F-Pencyclovir [40], wird durch die HSV-Tk phosphoryliert und kann so die Zelle nicht mehr verlassen [42]. Die Aktivität der HSV-Tk wird somit nicht über deren zytotoxische Wirkung beurteilt, sondern über die intrazelluläre Akkumulationsrate des phosphorylierten Reportersubstrats [38,42,52,115,132], was die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Genexpression einschränkt. In der Arbeit von Ray et al. [110] exprimierten subkutan in Mäuse implantierte N2 Neuroblastom Zellen stabil ein Fusionsprotein bestehend aus HSV-Tk und Renilla-Luciferase (R-Luc). Die bildliche Darstellung mittels Biolumineszenz (BLI) und PET ergab eine Korrelation der Enzymaktivitäten von r^2=0,89, wobei sehr kleine nicht palpable Tumoren durch die PET nicht erkannt werden konnten. Im Gegensatz zur BLI sind für die Darstellung der Genexpression in vivo mittels PET mehrere hundert Millionen Zellen notwendig, um eine zuverlässige Tumor-Detektion zu erreichen [22].

1.4.2 Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT)

In der MRT nutzt man die Eigenschaft von Wasserstoff-Atomen, sich als magnetische Dipole innerhalb eines Magnetfeldes auszurichten. Nach Aktivierung durch Impuls-Radiofrequenzen wird der Rückgang der Dipole in ihre Ausgangsposition (Relaxation) gemessen und in das MR-Signal übersetzt, wobei durch Zugabe eines Kontrastmittels (z.B. Gadolinium) die Signalunterschiede verstärkt werden können. Die magnetischen Dipole verschiedener Moleküle haben unterschiedliche Relaxationszeiten und weisen damit unterschiedliche MR-Signale auf [69]. Mit einer sehr hohen räumlichen Auflösung (25-100 µm) kann die MRT dreidimensionale Bilder erzeugen, sowie molekulare und anatomische Informationen simultan darstellen [115].

Louie et al. [83] gelang die Darstellung der Genexpression mittels MRT und dem LacZ / ß-Galaktosidase-Reportergensystem in einem Xenopus Embryo (Krallenfrosch). Dabei wurde ein Reportersubstrat benutzt, in welchem das durch eine Carbohydratgruppe blockierte Gadolinium (Kontrastmittel) durch die ß-Galaktosidase aktiviert wurde und zu einer Kontrastverstärkung im MRT führte. Das Reportersubstrat konnte allerdings die Zellmembran

nicht überwinden und mußte intrazellulär appliziert werden. Die molekulare Bildgebung mittels MRT weist mit 10^{-3}-10^{-5} mol/l Substrat [115] eine deutlich geringere Sensitivität als PET und BLI auf. Aufgrund des sehr hohen technischen Aufwands und der relativ langen Untersuchungs-Zeiten ist die Anwendung dieser Technik auf wenige Zentren begrenzt. Rehemtulla et al. [112] vergleichen die Bildgebung intrazerebral implantierter, stabil Luciferase exprimierender 9L Gliomzellen in Ratten durch MRT und Biolumineszenz. Hierbei ergab sich zunächst eine gute Korrelation (r^2=0,83) zwischen der kernspintomografisch ermittelten Tumorgröße und der gemessenen Lichtemissionen der Luc exprimierenden Tumorzellen. Jedoch zeigt sich nach Therapiebeginn und dem damit verbundenen Untergang von Tumorzellen eine deutliche Abnahme der Korrelation, was sich durch die grundlegenden Unterschiede beider Methoden erklären läßt. Biolumineszenz detektiert nur lebende Zellen, während die MRT auch eingewanderte Zellen, Nekrosen und Ödem detektiert. Somit wird der durch Biolumineszenz detektierbare Untergang von Tumorzellen bei der MRT möglicherweise durch Darstellung von Nekrose oder Ödem etc. verschleiert.

1.4.3 Fluoreszenz-Bildgebung

Die Bildgebung mittels fluoreszierender Proteine beruht auf der Lichtemission nach externer Lichtanregung, ohne das die Applikation eines Reportersubstrats notwendig ist. Die Registrierung der Lichtsignale erfolgt mit einem Fluoreszenz-Mikroskop oder mit einer CCD (charged coupled device)-Kamera. Dabei werden emittierte Photonen einer Wellenlänge zwischen 400-1000 nm nach Kollision mit einer kristallinen Silikonmatrix der CCD-Kamera in Elektronen konvertiert. Hierbei wird eine Energie von ca. 2-3 eV freigesetzt und als Signal registriert [125]. Durch den Vergleich mit der PET, bei der Gamma-Strahlung mit einem Energiegehalt von 511 keV entsteht, wird die hohe Sensitivität einer CCD-Kamera deutlich [85]. Das fluoreszierende Protein GFP (green fluorescent protein) einer Qualle (Aequorea victoria) war in den vergangenen 10 Jahren das meist eingesetzte fluoreszierende Reporterprotein. Es emittiert Licht einer Wellenlänge von 509 nm (externe Anregung 395 nm) und wurde erstmals 1994 von Chalfie et al. [10] als stabiler Reporter in vivo eingesetzt.

Die Bildgebung durch fluoreszierende Proteine zeichnet sich durch ein sehr hohes räumliches Auflösungsvermögen aus, was es ermöglicht selbst einzelne Tumorzellen in vivo zu detektieren [155]. Durch die hohe Autofluoreszenz und die schlechte Gewebegängigkeit des von GFP emittierten Lichts (λ = 509 nm) ist die Darstellungstiefe jedoch auf wenige Millimeter begrenzt und eine genaue Quantifizierung oder Lokalisation oft unmöglich [155]. Die Arbeitsgruppe um Yang et al. [155] begegnete diesem Problem mit der Verwendung transparenter Hautfenster, die eine 10-fache Verbesserung des Fluoreszenzsignals bewirkten.

Es existieren jedoch auch neuere Fluoreszenzproteine, die Licht im roten Bereich emittieren (DsRed1, DsRed2, dsdrFP616; λ = 583-616 nm) und damit potentiell besser gewebegängig

sind [4]. Allerdings sah man sich dabei mit dem Problem konfrontiert, daß diese tetrameren Proteine zu einer hochmolekularen Aggregatbildung neigen [122] (**Abb. 18, S. 37**) und am Beispiel von DsRed vermutlich eine direkte Zytotoxizität aufweisen [67].

Quantum dots

„Quantum dots“ sind nanometergroße fluoreszierende Partikel, die an Peptide bzw. Makromoleküle gekoppelt werden können [70]. Da zur externen Lichtanregung blauwelliges Licht notwendig ist, bleiben die Probleme der hohen Autofluoreszenz und Lichtabsorption weiter bestehen. Seit kurzer Zeit existieren so genannte „self-illuminating“ Quantum dots [121]. Dabei werden fluoreszierende Quantum dots an Renilla-Luciferase gekoppelt und das Phänomen des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET) ausgenutzt. Bei Umsatz des Substrats Coelenterazin setzt die Luciferase Energie frei, mit welcher die benachbarten Fluorophore zur Lichtemission angeregt werden, eine externe Lichtquelle zur Anregung ist nicht mehr notwendig.

1.4.4 Biolumineszenz

Biolumineszenz tritt bei vielen Bakterien, wirbellosen Marineorganismen (z.B. Renilla reniformis) und Insektenspezies (z.B. Photinus pyralis) auf [56,57]. Durch eine biochemische Reaktion des Enzyms Luciferase (Luc) mit dem Substrat Luciferin (**Abb. 3**), wird in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und Sauerstoff das Substrat Luciferin durch Oxydation in einen angeregten Zustand versetzt. Zur Emission von Licht kommt es beim Übergang des Oxyluciferins in den Grundzustand, wobei die Wellenlänge des biolumineszenten Lichts zwischen 400-700 nm liegt [86,89].

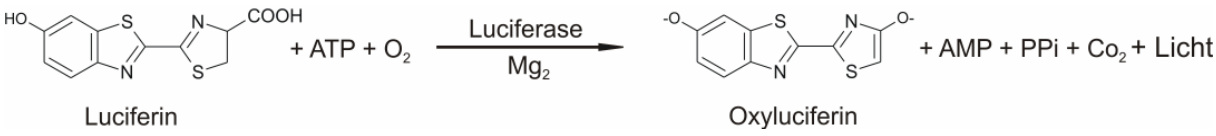


Abb. 3
Darstellung der Luciferase-Luciferin-Reaktion (ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PPi = Pyrophosphat) [Fa. Promega; www.promega.de]

Die Registrierung der sehr schwachen Lichtsignale erfolgt mit einer hochsensitiven gekühlten CCD (charged coupled device)-Kamera. CCD-Kameras ohne Kühlung, wie sie zur Detektion von Fluoreszenz-Signalen eingesetzt werden, weisen eine deutlich geringere Sensitivität auf. Durch die entstehende thermische Energie der Photonenkollision, wurden von der

Silikonmatrix ununterbrochen Elektronen freigesetzt, was zu einem starken Hintergrundsignal (Dunkelstrom) führte. Aus diesem Grund kommen heute in der Biolumineszenz-Bildgebung, mit Stickstoff auf ca. -120°C, gekühlte CCD-Kameras zur Anwendung, so daß eine Sensitivität von ca. 10^{-15}-10^{-17} mol/l eingesetztes Reportersubstrat, nahezu ohne störendes Hintergrundgeräusch, erreicht wird [45,85].

Es gibt verschiedene Luciferase-Spezies, die alle Monooxygenasen sind, sich aber in ihrer Größe, Struktur und Lichtemission unterscheiden. Zum Vergleich der biolumineszenten Reaktionen wurde der Begriff der Quantenausbeute von [89], als Maß für die Effizienz einer biolumineszenten Reaktion geprägt. Darunter versteht man die Anzahl der emittierten Photonen pro reagierendem Molekül des Substrats in Einstein/Mol.

Die zahlreich vorhanden Insekten-Luciferasen emittieren Licht über ein sehr breites Farbspektrum (λ. 547-620 nm) [146]. Die Luciferase des nordamerikanischen Glühwürmchens Photinus pyralis (F-Luc, MW 61 kDa) findet heutzutage die meiste Verwendung und hat mit 0.88 Einstein/Mol die höchste Quantenausbeute aller bekannten biolumineszenten Reaktionen [140]. Sie besteht aus 550 Aminosäuren und reagiert mit dem Substrat D-Luciferin (D(-)-2-(6´-Hydroxy-2´-Benzothiazolyl)-2-Thiazolin-4-Carboxylsäure [130]), wobei unter optimalen Bedingungen (pH 7.75) für jedes Molekül D-Luciferin ein Photon emittiert wird [24,25,86] (λ_{max}=562 nm) [145]. Die native P. pyralis Luciferase ist ein Enzym mit einer sehr kurzen Halbwertszeit (t_{50}=3 h), was auf die peroxisomale Lokalisation des nativen Enzyms zurückgeführt wird [59]. Für den zuverlässigen Einsatz der P. pyralis Luc als Reportergen in eukaryonten Zellen waren deshalb Veränderungen der Gensequenz notwendig. Neben der Deletion der peroxisomalen Lokalisationssequenz [46] und der Herstellung thermostabiler Mutanten [144], erfolgte durch die Fa. Promega eine „Humanisierung“ des Enzyms unter Berücksichtigung der humanen Codonverteilung und die Entfernung potentiell regulatorischer Sequenzen, die die genetische Neutralität in einer fremden Wirtszelle beeinflussen könnten. In der Forschung wird deshalb heutzutage üblicherweise die modifizierte Luciferase der Fa. Promega, die im Zytosol lokalisiert ist und im Vergleich zur nativen P. pyralis- Luciferase eine bis zu 700-fach gesteigerte Enzymaktivität aufweist [50], verwendet. Die von mir dargestellten Untersuchungen wurden ebenfalls mit diesem Enzym durchgeführt.

Bakterielle Luciferasen besitzen ein Molekulargewicht von 79 kDa und emittieren, bei einer Quantenausbeute von 0.2 [73], Licht mit einer Wellenlänge (λ) zwischen 460 und 490 nm. Die Luciferase der sog. Weichkoralle (Renilla reniformis) – Renilla Luc (R-Luc), mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, benötigt als Substrat Coelenterazin (Imidazolpyrazin [130]) und emittiert Licht mit der Wellenlänge 480-490 nm. Renilla Luc wird extrazellulär sezerniert und benötigt für die biolumineszente Reaktion keine Kofaktoren [64].

1.4.5 Biolumineszenz zur nichtinvasiven bildlichen Darstellung molekularer Prozesse

Bei der Verwendung der Biolumineszenz als nichtinvasives bildgebendes Verfahren nutzt man den Umstand, daß die Menge der emittierten Photonen proportional zur Expressionsrate des Reporterproteins Luciferase ist [4,15,16], wenn das Substrat D-Luciferin und ATP im Überschuß vorhanden sind [89]. Verschiedene Eigenschaften dieses Reportersystems machen es für die molekulare Bildgebung besonders interessant: (1) aufgrund der hohen Sensitivität können auch kleinste Veränderungen erfasst werden (die untere Nachweisgrenze in vitro liegt bei 10^{-20} M Luciferase), (2) Linearität über einen großen Bereich, (3) in vitro und in vivo praktisch keine Hintergrundaktivität, da die Luciferase in Säugetierzellen nicht vorhanden ist, (4) deutlich geringere intrazelluläre Akkumulation der Luciferase ($t_{½}$ = 3h) im Vergleich zu PET-Reportern, was die Untersuchung der Genexpression in „real time“ mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglicht, (5) gut standardisierbare Methode, die kaum anfällig für äußere Störeinflüsse ist.

Ein Nachteil der Detektion biolumineszenter Lichtsignale ist die Absorption und Streuung des emittierten Lichts durch die verschiedenen Gewebeschichten. So ist bekannt, dass z.B. Hämoglobin-Moleküle die blau-grünen Anteile des Luciferase-Spektrums absorbieren [56]. Nach den Arbeiten von Massoud et al. [85] geht man von einem 10-fachen Signalverlust pro cm Gewebetiefe aus. Aufgrund der zusätzlich auftretenden Lichtstreuung wird, trotz der hohen Sensitivität (10^{-15}-10^{-17} mol/l Substrat), eine relativ schlechte räumliche Auflösung von 3-5 mm [4,132] erreicht. Zur Verbesserung der Signalstärke wäre deshalb deutlich langwelligeres Licht, mit einer besseren Gewebegängigkeit, wünschenswert. Mögliche Ansatzpunkte sind die verschiedenen Luciferase-Isoformen oder das Substrat Luciferin. Derzeit werden große Anstrengungen unternommen die räumlichen Auflösung der biolumineszenten Bildgebung, beispielsweise durch die Erzeugung dreidimensionaler Bilder mittels rotierender CCD-Kameras, zu verbessern.

Die biolumineszente Bildgebung zur Darstellung von Tumorwachstum bzw. -proliferation, Metastasierung, Apoptose oder das Verhalten auf therapeutische Strategien hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen. Die Markierung von Tumorzellen mit dem Enzym Luciferase und die Darstellung ihrer Verteilung in Versuchstieren erlaubte neue Einblicke in die Biologie neoplastischer Prozesse. Edinger et al. [29] konnten nach intravenöser (i.v.) Applikation von $5x10^6$ bzw. $1x10^7$ HeLa-Luc Zellen (Zervixkarzinom) die Migration dieser Zellen im Organismus darstellen. Auch wurde durch diese Arbeitsgruppe die Biolumineszenz zur Erforschung der Wachstumskinetik von Lymphomen genutzt. Edinger et al. [31] transfizierten verschieden Lymphom-Zellinien mit einer GFP-Luc-Fusion. Nach Selektion GFP-positiver Zellen mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting), erfolgte die intravenöse Applikation der Zellen in Nacktmäuse. Die Verteilung dieser Zellen in vivo

konnte mittels Biolumineszenz bis in Leber und Milz der Versuchstiere verfolgt werden, während andere Zelllinien sich ausschließlich im Skelettsystem etablierten. Mittels Biolumineszenz konnten nach wenigen Tagen kleinste, osteolytische Knochenmetastasen, mit einem Tumorvolumen von 0,5 mm^3 (entspricht ca. $2x10^4$ Zellen), dargestellt werden. Die Bildgebung durch andere radiologische Techniken war zu diesem frühen Krankheitszeitpunkt noch nicht möglich. Gerade in diesem Zusammenhang sind die bisherigen Ergebnisse der Biolumineszenz-Bildgebung bei Tumorerkrankungen im Stadium der „minimal residual disease“ viel versprechend.

Auch die Untersuchung anderer therapeutischer Strategien mittels BLI gewinnt immer mehr an Bedeutung. Nyati et al. [98] untersuchten das Potential des Cytosindeaminase (CD) / 5´-FC (5´-fluorouracil) Suizidgen /Prodrug-Systems im Mausmodell mit intrahepatisch injizierten Kolon-Karzinom Zellen (HT-29), die stabil die Enzyme Cytosindeaminase und Luciferase exprimierten und konnte Wachstumskinetik und Therapieverlauf dieser Gentherapie darstellen.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit war die Etablierung eines Modells zur nichtinvasiven Darstellung der Gentherapie mit dem Suizidgen / Prodrug-System (HSV-Tk / GCV) mittels Biolumineszenz in humanen Gliomzellen. Hierzu wird eine Genfusion aus dem therapeutischen HSV-Tk Gens und dem Reportergen P.pyralis-Luciferase (Luc) eingesetzt, da nur dieses Konstrukt eine äquimolare Expression der Fusionspartner garantiert.

Die jeweiligen Enzymaktivitäten des Fusionsproteins wurden im Vergleich zum Einsatz der unfusionierten Gene sowohl in Zelllysaten, als auch in lebenden Zellen analysiert. Zusätzlich wurde im Mausmodell gezeigt, dass das HSV-Tk-Luciferase-Fusionsprotein in Verbindung mit GCV- bzw. Luciferin Gliome vollständig zerstören kann und gleichzeitig als Reporter für die nichtinvasive Darstellung und Quantifizierung der Gentherapie in vivo dient. Die Vor- und Nachteile der biolumineszenten Bildgebung im Kontext mit anderen nichtinvasiven Bildgebungsverfahren werden diskutiert und Perspektiven dieser Methode aufgezeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Agarose	Roth	Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ethanol 70%	MLU-Apotheke	Halle
Ethanol 96%	Merck	Darmstadt
Ethanol 99,8%	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck	Darmstadt
HCL	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Merck	Darmstadt
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom KG	Berlin

Weitere verwendete Chemikalien sind in den einzelnen Versuchsbeschreibungen angegeben. Lösungen wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser angesetzt.

2.2 Vektoren und Plasmide

In dieser Arbeit wurden zur Transfektion humaner Glioblastomzellen Plasmide verwendet, die von Frau Dr. A. Söling konstruiert und zur Verfügung gestellt wurden. Sie tragen die Gene der Herpes-simplex-Virus-Typ 1 – Thymidinkinase (HSV-Tk) (6941 bps), der „humanisierten“ Luciferase von Photinus pyralis (Luc) (6970 bps) oder eine Gen-Fusion zwischen Thymidinkinase und Luciferase (HSV-Tk-Luc) (6764 bps).

Die HSV-Tk cDNA entstammt dem retroviralen Vektor G1Tk1SvNa (E. Otto, GTI Inc., Gaithersburg, USA (7049 bps)) [84] bzw. das Gen der „humanisierten“ Luciferase (Photinus pyralis) dem pGL3 Vektor (Fa. Promega, Mannheim (4818 bps)) und wurde in den pcDNA 3.1 (-) Vektor (Fa. Invitrogen, Karlsruhe (5427 bps)) eingefügt. Für das Fusions-Konstrukt Tk-Luc wurde EGFP (enhanced green fluorescent protein) im pEGFP-Luc Vektor (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) durch die HSV-Tk cDNA des G1Tk1SvNa Vektors ersetzt. Zwischen den Sequenzen für HSV-Tk und Luc befindet sich eine 33 Nukleotid-Linker-Sequenz. Die Expression der integrierten Gene läuft konstitutiv unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid enthält weiterhin das „Neomycinphosphotransferase“-Gen, was die Selektion stabil transfizierter Zellen durch Zugabe von Geneticin (G418) ermöglicht.

2.3 Zellkultur-Materialien

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurden humane Glioblastom-Zellen (U87MG, T98G) verwendet.

2.3.2 Plastikmaterialien für die Zellkultur und andere Verbrauchsmaterialien

Faltenfilter Ø 125 mm	Schleicher & Schüll	Dassel
Glasgefäße	Schott Glas	Mainz
Kryoröhrchen	Fa. Dr. Ilona Schubert	Leipzig
Kulturflasche T25 (25 cm²)	Greiner	Nürtlingen
Kulturflasche T75 (75 cm²)	TPP	Trasadingen, Schweiz
Latexhandschuhe Safeskin	Kimberly-Clark	Roswell, USA
Mikrotiterplatten (6-Well)	TPP	Trasadingen, Schweiz
Mikrotiterplatten (96-Well), Flachboden	Becton Dickinson / TPP	Trasadingen, Schweiz
Mikrotiterplatten (96-Well), schwarz, mit oder ohne transparenten Boden	Nunc	Wiesbaden-Biebrich
Pasteur-Pipetten ungestopft/gestopft	Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen	Schubert	Leipzig
Polypropylenröhrchen 15 ml	Sarstedt	Nürnbrecht
Polypropylenröhrchen 50 ml, Cellstar®	Greiner	Nürtlingen
Schnappdeckel-Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nürnbrecht
Zell- u. Gewebekulturschalen Ø 10 cm	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Pipetten Cellstar®	Greiner / TPP	Nürtlingen/Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP	Trasadingen, Schweiz

2.3.3 Geräte

Autoklav ELV 5050	Systec	Wettenberg
Automatische Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann	Eberstadt
Automatische Pipettierhilfe Typ Multipette plus	Eppendorf	Hamburg
CO_2 Inkubator Typ CB210	Binder	Tuttlingen
Digitalkamera Coolpix 990	Nikon	Düsseldorf
Flachbett-Elektrophoresekammer, Comphor L Midi	Bioplastics	Landgraaf, Niederlande
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS100	Nikon	Düsseldorf
Heizblock TDB-120	Kisker	Steinfurt
High Voltage Power Pack, Consort E 802	Genaxis	Spechbach
Laborwaage, BP 121 S	Sartorius	Göttingen

Laminar Flow Werkbank UVUB 1200	UniEquip	München
Luminometer Victor 2 mit Injektor	Perkin Elmar	Turku, Finnland
Megafuge 1. OR - Zentrifuge	Heraeus	Hanau
Mikrowellengerät R 212	Sharp	Hamburg
Milliporeanlage „Milli-Q“, Sterilfilter	Millipore	Neuisenburg
Mastercycler® personal	Eppendorf	Hamburg
PCR-Röhrchen 0.2 ml	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter Calimatic 660	Knick	Berlin
Pipetten Labmate®		
Schüttelwasserbad 1083	GFL	Burgwedel
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus	Hanau
GeneGenius (Syngene)	Merck	Darmstadt
Vortexgenie 2	Scientific ind.	Bohemia, N.Y., USA
Wärmeschrank	Binder	Tuttlingen

Weitere in den Experimenten verwendete Geräte und Hilfsmittel sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

2.3.4 Zellkulturmedien, Antibiotika und Gebrauchslösungen

- Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) Medium mit 580 mg/l stabilem L-Glutamin, 3,7 g/l $NaHCO_3$ und 1 g/l D-Glucose (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (ohne Phenolrot) mit 300 mg/l L-Glutamin, 2 g/l $NaHCO_3$ und 2 g/l D-Glucose (Fa. Biochrom KG)
- RPMI-Kulturmedium (entspricht RPMI-Medium mit 4mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS)
- Fötales Kälberserum (FCS) (Fa. Biochrom KG)
- PBS (phosphate buffered saline) (Fa. Biochrom KG) : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4 (pH 7.3)
- Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS; Fa. Biochrom KG)
- Einfriermedium (DMEM+20% FCS+10% DMSO)
- OPTIMEM, serumfreies Medium (Fa. GIBCO, Eggenstein)
- Lipofectamin Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Selektionsmedium (DMEM mit 1 mg/ml G418)
- Penicillin / Streptomycin, 10.000 U / 10.000 µg/ml (Fa. Biochrom KG)
- G418 (Geneticin)(Calbiochem, Bad Soden), Stammlösung 50 mg/ml
- Ganciclovir (GCV) (Fa. Roche, Mannheim), Stammlösung 50 mg/ml in PBS gelöst, aliquotiert u. gelagert bei –20 ° C

- Solubilisierungspuffer : 0.1 M HCl in Isopropanol

Für die Zellkulturen wurde Dulbecco´s MEM-Medium mit 10 % FCS verwendet, welches neben den erforderlichen Wachstumsfaktoren auch Metabolite für die in Kultur gehaltenen Zellen enthält [3,35,49,96] (im folgenden DMEM-Kulturmedium genannt). Auf antibakterielle Medienzusätze wurde im Routinegebrauch verzichtet.

2.4 Routinemethoden der Zellkultur

2.4.1 Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem CO_2-begasten Brutschrank (5% CO_2) bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert und kultiviert.

2.4.2 Kultivieren der Zellen

Die Zelllinien wurden nach Standardmethoden [71] in 25 cm²-Plastik-Gewebekulturflaschen und 6-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert, wobei sie bei Erreichen von 80% Konfluenz passagiert wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel nach 4-5 Tagen [79]. Die Zellen wurden wie folgt passagiert : Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurden verbliebene Medium- und Zellreste durch zweimaliges Waschen der Zellschicht mit PBS-Puffer entfernt. Zum proteolytischen Ablösen der adhärenten Zellen wurden diese mit Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Wenn unter mikroskopischer Kontrolle ein Abrunden der Zellen sichtbar wurde, konnten die Zellen durch Klopfen abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren dispergiert werden. Für routinemäßiges Subkultivieren wurden die Zellen in einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung in neue Zellkulturgefäße überführt.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Alle Zellzahlbestimmungen einer Zellsuspension wurden in einer mit einem Deckglas verschlossenen Neubauer-Zählkammer (0,0225 mm² Fläche bei einer Tiefe von 0,1 mm) durchgeführt.

2.4.4 Lichtmikroskopische Dokumentation

Die Beobachtung der kultivierten Zellen erfolgte täglich an einem inversen Lichtmikroskop mit Phasenkontrastoptik oder bei fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung an einem modellgleichen Mikroskop mit UV-Lampe Nikon Y-FI. Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera (Fa. Nikon) vorgenommen.

2.4.5 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Viele Zellen können durch Gefrierkonservierung in flüssigem Stickstoff für lange Zeit gelagert werden. Das Einfrieren der Zellen ist problematisch, da durch langsame Eiskristallbildung, die Zellen geschädigt werden können. Um die Zellschäden so gering wie möglich zu halten, werden die Zellen dem sogenannten Einfriermedium 10% Dimethylsulfoxyd (DMSO) [51] ausgesetzt. Als kryoprotektive Substanz verhindert DMSO die Ausbildung von Eiskristallen und induziert Löcher in der Zellwand. Bei steigenden Temperaturen und in Konzentrationen über 0.1 % wirkt DMSO über einen längeren Zeitraum auf U87MG-Zellen in Kultur toxisch (**Abb. 4**). Deshalb ist es wichtig die Zellen im Einfrierprozeß möglichst schnell in den Bereich zwischen 0-4°C abzukühlen. Im weiteren Verlauf muß ein stufenweises Absenken der Temperatur erfolgen, um den Austritt von intrazellularem Wasser zu ermöglichen. Beim Auftauprozeß ist es wichtig, die Zellsuspension unverzüglich zu verdünnen und durch Abzentrifugieren auszuwaschen. Anschließend werden die Zellen mit frischem Medium in Kultur genommen.

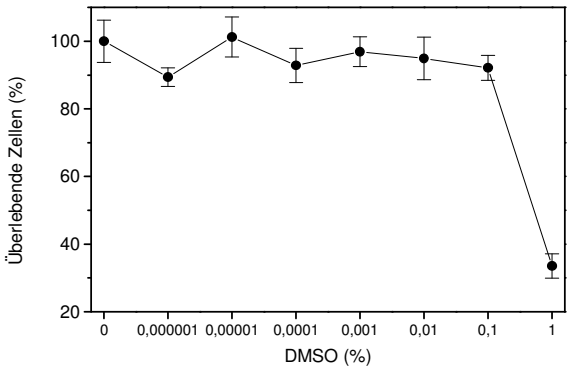


Abb. 4
Kultivierung von U87MG-Zellen (4000 Zellen pro Kavität) in DMEM + 5% FCS + DMSO für die Dauer von 96 Stunden bei 37 °C. Darstellung der im MTT-Zytotoxizitätstest gemessenen Überlebenskurve (N=4).

2.4.6 Mykoplasmen-Testung

Der Begriff Mykoplasmen umfaßt eine Gruppe von zellwandlosen Prokaryonten der Klasse Mollicutes (mollis: weich, cutis: Haut). Sie gehören mit einer Größe von 0.2 bis 0.8 µm zu den kleinsten sich autonom vermehrenden Mikroorganismen und schlüpfen so selbst durch die Poren eines 0.2 µm-Sterilfilters. Mykoplasmen können aufgrund ihres kleinen Genoms nicht alle zum Wachstum benötigten Stoffe selbst synthetisieren und leben deshalb parasitisch mit Wirtszellen. Zellkulturen bieten Mykoplasmen daher ideale Lebensbedingungen: Nährstoffe im Überfluß und optimale Temperaturen bei regelmäßiger Pflege. Die Kontamination von Zellkulturen durch Mykoplasmen macht aussagekräftige, reproduzierbare Tests mit den Zellen unmöglich und kann für eine Fülle von Kultivierungsartefakten verantwortlich sein. Sie greifen z.B. in den Metabolismus der Wirtszelle ein [87], verursachen zytogenetische Schäden [76], führen zur vermehrten Freisetzung von Interferonen und zum Zelltod [6]. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass 30 bis 50 % der in einer Zellkultur enthaltenen Proteinmenge mykoplasmatischen Ursprungs

sein kann. Aus diesen Gründen wurden alle verwendeten Zellen regelmäßig mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf Mykoplasmen untersucht. Auf diese Weise konnten infizierte Zelllinien ausgesondert und vernichtet werden.

2.4.7 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität transfizierter Zellen wurden die Zellen mittels CCLR (Cell Culture Lysis Reagent (Luciferase Zellkultur-Lysispuffer), Fa. Promega, siehe **Tab. 1**) lysiert. Die Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von ca. 80-90% in 6-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert.

Tabelle 1 Zusammensetzung – CCLR (Cell Culture Lysis Reagent), 1x (Fa. Promega)	
25 mM	Tris-phosphate (pH 7.8)
2 mM	DTT (Dithiothreitol)
2 mM	1,2-diaminocyclohexane-N,N,N´,N´-tetraacetat
10 %	Glycerol
1 %	Triton® X-100

Nach Entfernung des Zellkulturüberstandes, wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 100-120 µl CCLR zugegeben und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Nach Lösung der lysierten Zellen vom Plastikboden mittels eines Zellschabers, wurde das Zelllysat in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Alle Lysate wurden kurz gevortext und 4 Minuten bei 4 °C (13.000 U/min^{-1}) zentrifugiert bevor der Überstand bei minus 80 °C eingefroren wurden.

2.5 Gentechnische Methoden in der Zellkultur

Als gentechnische Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit transiente und stabile Transfektionen durchgeführt. Unter Transfektion versteht man das Einbringen zellfremder DNA mittels chemischer und/oder physikalischer Methoden in eine Zielzelle. Eine weit verbreitete Methode des Gentransfers stellt die Verwendung von Liposomen dar. Diese mono- oder polykationischen Lipide bilden Transportvesikel für DNA-Moleküle und ermöglichen durch endozytotische Verschmelzung mit der Zellmembran der Zielzelle den gewünschten Plasmidtransfer. In dieser Arbeit wurde, zur Transfektion humaner Glioblastomzellen in der Zellkultur, Lipofectamin der Fa. Invitrogen verwandt. Bei einer transienten Transfektion bleibt das eingeschleuste Plasmid nur für kurze Zeit in der Zelle, deshalb findet die Expression des Proteins auch nur für einen begrenzten Zeitraum statt. Wird jedoch auf die transfizierten Zellen ein Selektionsdruck ausgeübt, beispielsweise durch

Inkubation der transfizierten Zellen mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum, können nur die plasmidhaltigen Zellen überleben. Das Plasmid wird in das Genom der Zellen eingebaut und dessen genetische Information an die nächste Zellgeneration weitervererbt.

2.5.1 Transiente Transfektion

Für die Transfektionsexperimente wurden die Glioblastomzellen in 6-Loch-Platten kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit einer Dichte von 3-5 x 10^5 U87MG-Zellen / Kavität ausplattiert. Nach 16-24 Stunden erreichten die Zellen eine 60-80%ige Konfluenz und konnten transfiziert werden. Die polykationischen Liposomen wurden mit Plasmid und serumfreien Medium OPTIMEM für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung des DNA-Liposomen-Gemisch mit OPTIMEM auf ein Endvolumen von 1ml pro Kavität. Nach Absaugen des alten Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit dem DNA-Liposomen-Gemisch (**Tab. 2**) für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen passagiert und für die verschiedenen Experimente verwendet. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand der Luciferaseaktivität bzw. des Vorhandenseins von transient EGFP-exprimierenden Zellen beurteilt. Jede Transfektion wurde mindestens zweimal wiederholt (N=3).

Tabelle 2 Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für transiente Transfektionen

DNA	OPTIMEM	Lipofectamin	OPTIMEM (Zugabe nach 45 min Inkub. des DNA-Liposom-Gemisch)
2 µg (448 fmol)	300 µl	5 µl	800 µl
1 µg (224 fmol)	200 µl	4 µl	800 µl
0.5 µg (112 fmol)	200 µl	4 µl	800 µl
0.1 µg (22.1 fmol)	200 µl	4 µl	800 µl
0.05 µg (11.2 fmol)	200 µl	4 µl	800 µl
1 µg pEGFP-N1	200 µl	4 µl	800 µl

2.5.2 Stabile Transfektion

Um stabil transfizierte Zellen zu erhalten, wurde ein Vektor mit einem Antibiotikaresistenzgen eingesetzt, um die transfizierten Zellen mit einem Antibiotikum selektieren zu können. Die stabile Transfektion folgte dem Protokoll der transienten Transfektion. Der Unterschied besteht jedoch darin, daß die Zellen nach der Transfektion durch Inkubation mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) einem Selektionsdruck ausgesetzt werden. Das

Aminoglykosid G418 bindet irreversibel an die 80S Ribosomenuntereinheit und blockiert die Proteinsynthese der Zellen. Die transient transfizierten Zellen wurden passagiert und bei einer sehr geringen Zelldichte (10.000-50.000 Zellen, abhängig von der Transfektionseffizienz) auf Zellkulturschalen (10 cm) ausgesät. Unter regelmäßiger Erneuerung des Selektionsmediums (alle 4-5 Tage), konnten nur die Zellen mit stabil integriertem Plasmid überleben. Nach ungefähr 14-20 Tagen wuchsen auf der Zellkulturschale sichtbare Kolonien. Diese wurden nach Erreichen einer Größe von mindestens 100 Zellen mittels kleiner Glaszylinder isoliert und passagiert. Die separate Kultivierung der Zellklone erfolgte in 6-Loch-Platten unter weiter anhaltendem Selektionsdruck.
Das Selektionsmedium entspricht DMEM-Kulturmedium mit Zusatz des Aminoglykosids G418 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml.

Bestimmung der Resistenz gegenüber dem Selektionsantibiotikum G418

Zur Unterscheidung zwischen G418-resistenten und nicht resistenten Zellen war es notwendig die Antibiotikumkonzentration zu ermitteln bei welcher parentale Zellen ohne Plasmid absterben. Aus diesem Grund wurden 200 Zellen (U87MG) pro Kavität einer 96-Mikrotiterplatte mit G-418 Konzentrationen von 0-1,5 mg/ml inkubiert. Eine Erneuerung des G418-haltigen Kulturmediums erfolgte nach 5 Tagen. Die Bestimmung der Überlebensrate der Zellen erfolgte am 5. und 9. Tag mittels MTT-Zytotoxizitätstest. Alle Konzentrationen wurden in Oktaplikaten angesetzt.

2.6 Zellkultur-Assays

2.6.1 MTT - Zytotoxizitätsassay

Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen am Tetrazolring enzymatisch gespalten und in wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle überführt (**Abb. 5**) [48].
Die Succinat-Dehydrogenase ist ein mitochondriales Enzym des Citratzyklus, welches in enger Verbindung zur Atmungskette die Umwandlung von Succinat zu Fumarat katalysiert. Die optische Dichte (OD) des gelösten Formazans ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Zellen und deren Stoffwechselaktivität [92].
Hierzu wurden die Kavitäten einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit je 100 µl Zellsuspension in DMEM-Kulturmedium bei einer Zelldichte von 4 x 10^3 Zellen pro Kavität (=0,36 cm^2) bestückt. Die Ganciclovir (GCV)-Stammlösung wurde in DMEM-Kulturmedium verdünnt. Pro Kavität wurden 100 µl der GCV-Verdünnungen, bei einer Endkonzentration von 0, 0.1, 1.0 und 10 µg/ml, eingesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37°C (5% CO2) im Brutschrank für 96 Stunden inkubiert.

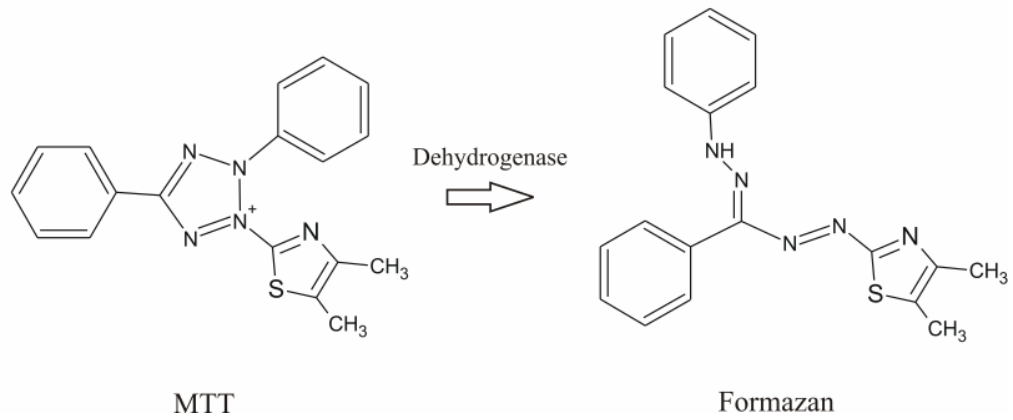


Abb. 5
Spaltung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT am Tetrazolring durch mitochondrale Succinat-Dehydrogenasen und Bildung des wasserunlöslichen, blau-violetten Formazans [48]

Nach 96 Stunden (**Abb. 14**) wurden in jede Kavität der Platte 20 µl MTT-Lösung (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Endkonzentration 0.5 mg/ml, pipettiert und die Platte für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die Formazankristalle (**Abb. 15**) in 100 µl Solubilisierungspuffer (0,1 M HCl/Isopropanol) gelöst. Die Extinktion OD_{abs} (590 nm als Testwellenlänge, 660 nm als Referenzwellenlänge) der Farblösung in den einzelnen Kavitäten wurde in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Victor2, Perkin Elmer Life Sciences, Turku, Finnland) gemessen. Die Werte unbehandelter Kontrollen (0 µg/ml GCV) entsprachen dabei 100%. Für jede GCV-Konzentration wurden vier bis acht Parallelproben angesetzt. Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde jeder Versuch mindestens zweimal wiederholt (N=3).

2.6.2 Bradford-Protein Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford [7] beruht auf der Farbreaktion funktioneller Gruppen der Proteine mit dem farbstoffbildenden Coomassie-Brilliantblue G-250, wobei die Intensität des sauren Farbstoffs mit der Konzentration der reagierenden Gruppen korreliert. Durch Erstellung einer Eichgeraden mit definierten Standards kann so durch photometrische Messung der Proteingehalt einer Probe bestimmt werden, vorausgesetzt das für die Eichung verwendete und das unbekannte Protein haben einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren. Rinder-Serum-Albumin hat sich als international anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt. In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassieblau von 465 nm (blau) zu 595 nm (orange). Der Messbereich des Assays liegt bei 1 bis 1000 µg/ml Protein. Für die Messung wurden die bei –80°C gelagerten Zell-Lysate aufgetaut, kurz zentrifugiert und 1:10 verdünnt (10 µl) in die Kavitäten einer schwarzen 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben. Für die Eichreihe wurden 10 µl der hergestellten BSA-Standards (0.1-0.5 mg/ml Protein in 0.1x

CCLR (Luciferase Zellkultur-Lysispuffer, Tab. 1) in Triplikaten pipettiert. Als Leerwert wurde nur der zur BSA-Verdünnung eingesetzte proteinfreien Puffer (CCLR) eingesetzt. Anschließend wurden 200 µl Bradford Reagens (Fa. BioRad) hinzugegeben und der Mix für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Absorption des Coomassie-Brilliantblue photometrisch bestimmt wurde.
Die Bestimmung des Proteingehaltes von Zell-Lysaten war für die quantitative Bestimmung der Luciferase-Aktivität notwendig.

2.6.3 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Das verwendete Luciferase Assay System (Fa. Promega) ermöglicht den quantitativen Nachweis des Enzyms Luciferase des nordamerikanischen Glühwürmchens (Photinus pyralis) in transfizierten Zellen. Wenn das Substrat Luciferin für diese Reaktion im Überschuss zur Verfügung steht, so ist die Lichtemission proportional zur Luciferasekonzentration (linearer Bereich zwischen 10^{-20} und 10^{-13} mol [nach Angaben Fa. Promega]) und kann in einem Luminometer quantifiziert werden.

Puffer und Lösungen

- CCLR (Cell Culture Lysis Reagent (**Tab. 1, Seite 17**)), war als 5x Konzentrat dem Kit beigefügt und wurde nach 1:5 Verdünnung mit dest. Wasser bei –20°C gelagert
- Luciferase Assay-Substrat / Assay-Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert, die Zusammensetzungen sind Firmengeheimnis
- Luciferase Assay-Reagent, enthält das Substrat Luciferin

Durchführung des Luciferase-Assays

Die Aktivität der Luciferase wurde in Zell-Lysaten transfizierter Zellen bestimmt. Nach Bestimmung des Proteingehalts der Zell-Lysate mit dem Bradford-Protein Assay, wurde je 10 µg Protein in die Kavitäten einer schwarzen 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Das Endvolumen pro Kavität, aufgefüllt mit 0.1 x CCLR, betrug 7 µl. In einem Mikroplatten-Luminometer wurde durch einen Injektor zu jeder Vertiefung 35 µl des Luciferase Assay-Reagents gegeben und das emittierte Licht über einen Zeitraum von 5 Sekunden von einem Detektor als „counts per second“ gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde in cps (counts per second)/µg Protein berechnet.

2.7 Biolumineszenz-Bildgebung intakter Zellen

2.7.1 Sensitivität

Zur Feststellung der kleinstmöglich detektierbaren Zellzahl durch Biolumineszenz, wurden stabil transfizierte U87MG-Luc Zellen bei einer Zelldichte von 1.000 Zellen bis 4 Zellen plattiert. Dazu wurde eine schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatte mit transparentem Flachboden und 100 µl RPMI-Kulturmedium pro Kavität verwendet. Nach einer 5 stündigen Adhärenzperiode der Zellen wurde zu jeder Kavität D-Luciferin in einer Endkonzentration von 500 µM zugegeben. Nach der 60 minütigen Aufnahmeperiode in der Dunkelkammer des Imagers, wurde die Zellzahl in den Kavitäten lichtmikroskopisch überprüft.

2.7.2 Optische Darstellung der HSV-Tk Aktivität in intakten Zellen

Parallel zur Durchführung des unter 2.6.1 beschriebenen MTT-Zytotoxizitätsassays wurden je 8.000 U87MG-Zellen, die stabil das HSV-Tk-Luc Fusionskonstrukt exprimierten, in RPMI-Kulturmedium resuspendiert und in die Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Nach der 96 stündigen Inkubation der Zellen mit Ganciclovir bei 37°C und 5% CO_2-Atmosphäre wurde der gesamte Zellkulturüberstand in den Kavitäten entfernt und durch 100 µl frisches RPMI-Kulturmedium, versetzt mit D-Luciferin in einer Konzentration von 500 µM, ersetzt. Das Ergebnis des MTT-Zytotoxizitätsassays wurde durch Messung der Biolumineszenz-Signale mittels CCD-Kamera über einen Zeitraum von 60 Minuten dargestellt. Alle GCV-Konzentrationen wurden in Quadruplikaten angesetzt.

2.8 Tierexperimentelle Methoden

Sämtliche Tierexperimente wurden entsprechend den Richtlinien der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Projekt Nr. 573 MLU HAL „Nichtinvasives Imaging von immuno-gentherapeutischen Strategien am Nackt-mausmodell für menschliche Hirntumore“) in Anwesenheit von Fr. Dr. A. Söling und nach Absolvierung des Tierschutzkurses durchgeführt.

2.8.1 Geräte und Materialien

- Isolatoren (Typ UniProtect; Fa. Ehret, Emmendingen)
- Imager mit CCD (charge-coupled device) Kamera (Fa. VisiLuxx, München)
- Einmalspritzen und Kanülen (Sterican ®; Fa. Braun, Melsungen)
- Heizmatte, Rotlichtlampe
- Pinzetten (chirurgisch/anantomisch), Scheren, Skalpell mit Einmalklingen, Schiebelehre (1/10 mm)
- Ketavet 100 mg/ml (Fa. Pharmacia & Upjohn, Erlangen)
- Rompun 2% (Fa. Bayer AG, Leverkusen)
- D-Luciferin (Fa. Biosynth, Staad, Schweiz)

2.8.2 Versuchstiere

Athymische Nacktmäuse (nu/nu) vom Stamm CD-1 wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die 4-5 Wochen alten Männchen wurden in Isolatoren bei 21-25°C und 40-50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere erhielten eine ad libidum-Fütterung mit bestrahlten Pellets für Nacktmaushaltung (Fa. Altromin, Lage) und autoklaviertem Wasser.

2.8.3 Vorbereitung der Zellen für die subkutane Injektion in Nacktmäuse

Die humanen Glioblastomzellen U87MG wurden in 75 cm^2-Plastik-Gewebekulturflaschen kultiviert. Bei 80% Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten anschließend in kaltem DMEM-Kulturmedium (mit 10% FCS) aufgenommen werden, wobei das Trypsin durch das FCS-haltige Kulturmedium inhibiert wurde. Zur Vermeidung immunologischer Reaktionen bei den Versuchstieren, mußten alle Serumbestandteile von den Zellen entfernt werden. Dazu wurden die Zellen zweimalig nach 8 Minuten Zentrifugation bei 1500 U/min^{-1} und 4°C mit 45 ml (pro 75 cm^2-Gewebekulturflasche) kaltem DMEM (ohne FCS) gewaschen. Nach erfolgter lichtmikroskopischer Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer und erneuter Zentrifugation erfolgte die Einstellung der gewünschten Zellzahl in 100 µl Injektionsvolumen.

2.8.4 Narkose

Während den subkutanen Zellinjektionen und den Biolumineszenz-Aufnahmen wurden die Versuchstiere mit Ketavet (Ketanest) und Rompun (Xylazinhydrochlorid) narkotisiert. Den Tieren wurde gewichtsadaptiert 6 mg/kg Körpergewicht Rompun und 65 mg/kg Körpergewicht Ketamin intraperitoneal appliziert. Einer Unterkühlung der Versuchstiere wurde durch Heizmatten und Rotlicht entgegengewirkt.

2.8.5 Zellinjektionen

Nach Ermittlung des Körpergewichts wurden die Tiere wie unter 2.8.4 beschrieben narkotisiert. Nachdem die vorgesehenen Regionen der Zellinjektionen mit einem Faserstift markiert wurden, erfolgte unter sterilen Bedingungen die Resuspension und Erwärmung der gekühlten (4°C) Zellsuspension. Nach Desinfektion der Injektionsorte wurde den Versuchstieren je 100 µl der Suspension subkutan in den Rücken und die Flanken beidseits injiziert. Nach den Injektionen wurden intermittierend ca. 100 µl der verbliebenen Zellen wieder in Antibiotika-freiem Medium kultiviert, um die Vitalität und Sterilität der Zellen nach der Injektion zu prüfen.

2.8.6 Bioluminеszenz-Bildgebung in vivo

Das verwendete D-Luciferin (Fa. Biosynth) lag in Pulverform vor und wurde dunkel bei –80°C gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde D-Luciferin in PBS in einer Konzentration von 30 mg/ml gelöst und in 500 µl-Aliquots bei –80°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die Tiere erhielten 150 mg/kg Körpergewicht D-Luciferin intraperitoneal injiziert. Bei einem Körpergewicht der Versuchstiere zwischen 25 und 38 g entsprach das einem Injektionsvolumen von 125-190 µl. Danach erfolgte die Anästhesie der Tiere wie unter 2.8.4 beschrieben. Die narkotisierte Nacktmaus wurde in der Dunkelkammer des Imagers (VisiLuxx Imager, Fa. Visitron, München –**Abb. 6**) platziert. Nach einer 2 Sekunden-Aufnahme bei leichtem Lichteinfall in die Kammer zur Erstellung des Oberflächenbildes der Maus erfolgte ca. 7 Minuten nach Luciferin-Applikation die Aufnahme der Bioluminеszenz-Signale (Aufnahmedauer 15 Minuten). Dabei wurde in der Dunkelkammer, durch eine mit Stickstoff auf –120°C gekühlte CCD (charge-coupled device) Kamera, ein Summationsbild der detektierten Lichtsignale erstellt. Die Signale wurden als Pseudofarben entsprechend ihrer Intensität dargestellt und durch die Computersoftware Metamorph (Fa. Visitron) über das Graubild der Nacktmaus projeziert.

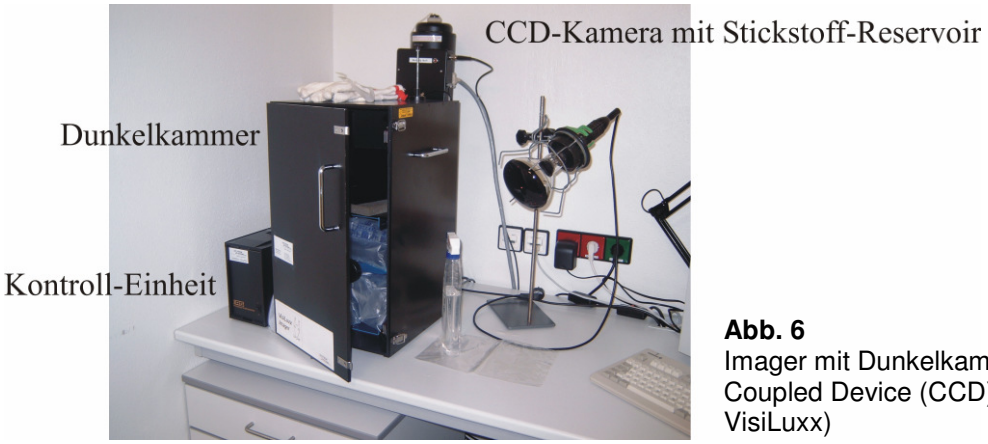


Abb. 6
Imager mit Dunkelkammer und Charge-Coupled Device (CCD) Kamera (Fa. VisiLuxx)

2.8.7 Bestimmung des Tumorvolumens

Zur Erfassung des Tumorwachstums wurde 3 bis 5 mal wöchentlich Länge und Breite der Tumore mit einer Schiebelehre gemessen. Das Tumorvolumen wurde nach folgender Formel berechnet : Tumorvolumen $V = \pi/6 \times \text{Breite}^2 \times \text{Länge}$

2.8.8 GCV-Therapie

Nachdem die subkutanen Tumore eine Größe von durchschnittlich 5 mm Länge bzw. Breite erreicht hatten (durchschnittlich 7 Tage nach der subkutanen Zellinjektion) wurde mit der systemischen Gabe von Ganciclovir (GCV) begonnen. Jedes Versuchstier (n=7) erhielt für

den Zeitraum von 14 Tagen zweimal täglich eine intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg GCV. Das entsprach bei einem Körpergewicht der Tiere zwischen 25 und 38 g einem Injektionsvolumen von 75-114 µl. Eine Narkotisierung der Versuchstiere war für die Injektion nicht notwendig. Die Kontroll-Mäuse (n=3) erhielten zweimal täglich eine intraperitoneale Injektion von NaCl 0,9 %.

2.8.9 Tötung und Tumorexplantation

Nach Beendigung des Tierexperiments bzw. nach Erreichen einer aus ethischer Sicht untragbaren Tumorlast wurden die Tiere schmerzlos getötet. Dies erfolgte durch Inhalation von Kohlendioxid. Sofort nach dem Tod des Tiers wurden die Tumore präpariert, gewogen und in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert.

2.9 Histologische Untersuchungen

2.9.1 Geräte und Materialien

Mikrotom (Typ RM 2155, Fa. Leica)
Objektträger, Poly-L-Lysin beschichtet (Fa. Starfrost)
Wärmeofen (Fa. Binder)
Glasküvetten
Kunststoffküvetten (hitzebeständig)
Mikrowelle (Typ R 212, Fa. Sharp)
Begasungsbrutschrank (Typ CB 210, Fa. Binder)
Wasserbad (Typ 1083, Fa. GFL)

2.9.2 Chemikalien, Gebrauchslösungen und Antikörper

- PBS (phosphate buffered saline) (Fa. Biochrom KG)
- Natrium-Citrat-Puffer (mengenangaben gelten für 1 Liter): 2.94 g Trinatriumcitrat x 2 H_2O, pH 6
- VECTASTAIN® ABC-Kit (Fa. Vector Laboratories, U.K.)
- AEC-Färbelösung (AEC chromogen solution Fa. DAKO)
- Mayer´s Hämatoxylin: 1 g Hämatoxylin, 0.2 g Natriumiodat ($NaIO_3$), 50 g Kalium-Aluminium-Sulfat in 1000 ml dest. Wasser lösen; 50 g Chloralhydrat und 1 g Citronensäure dazugeben
- Eosin (0.8%): 5 g Eosin Y in 100 ml dest Wasser auflösen, 12.8 ml dieser Lösung mit 67.2 ml dest Wasser verdünnen
- Antikörper
  - Erst-Antikörper : polyklonaler Kaninchen - anti-Luciferase (P. Pyralis)-Antikörper (Fa. Europa, Cambridge, U.K.)

- Zweit-Antikörper : biotinylierter Schweine – anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Fa. Europa)
- Wasserstoffperoxid (Fa. Roth, Karlsruhe)

2.9.3 Herstellung von Tumorgewebeschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Tumore wurden gekühlt, mit dem Mikrotom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und in einem Wasserbad (ca. 40°C) aufgefangen, um gestreckt und glatt auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.9.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Um Gewebeschnitte histologisch besser beurteilen zu können, werden Paraffinschnitte mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt. Eine der Standardfärbungungen, in denen basische und saure Proteine angefärbt werden, ist die HE-Färbung. Dabei werden Zellkerne blau-violett und Zytoplasma und Kollagenfasern durch Eosin rosa angefärbt. Dazu inkubierten die Paraffinschnitte zur Entparaffinisierung über Nacht bei 59°C in einem Wärmeofen und anschließend für 10 min in Xylol. Die entparaffinierten Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe für je 2 Minuten rehydriert (100%, 96%, 70%) und in H_2O gespült. Nach einer Anfärbung in Hämatoxylin (nach Mayer) für 1 Minute, wurden die Schnitte nach einer kurzen Spülung in H_2O für 10-15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Nach erneuter Spülung in H_2O, erfolgte die Färbung in Eosin (0.8%) für 1 Minute und anschließender Spülung in Leitungswasser. In einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 2x1 Minute (70%, 96%, 100%) wurden die Schnitte entfärbt, dehydriert und nach abschließendem Bad in Carboxyxylol und Xylol mit Entellan (Fa. Merck) eingedeckt.

2.9.5 Immunhistochemie

Die entparaffinisierten Schnitte (sh. oben) wurden zur Freilegung von Epitopen [21] in 10 mM Natrium-Citrat-Puffer pH 6.0, einer 560 W Mikrowellenbehandlung unterzogen. Unspezifische Bindungen wurden für 25 Minuten mit einer 1%-BSA-Lösung abgeblockt. Die Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität der Zellen erfolgte durch eine Behandlung mit 3%igem Wasserstoffperoxid [20]. Der primäre Kaninchen-anti-Luciferase-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 in PBS für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer mit den Gewebeschnitten inkubiert. Zur Detektion der gebunden Antikörper wurde nach zweimaligen Spülen in PBS ein biotinylierter anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper verwendet (1:100, 30 min, RT).

Das Vitamin Biotin bindet stöchiometrisch und mit hoher Affinität an Avidin, ein tetrameres Glykoprotein des Hühnereis mit vier Bindungsstellen für Biotin. Durch die Bindung von drei Peroxidase-gekoppelten Biotinmolekülen an Avidin wird der Avidin-Biotin-Komplex (AB-

Komplex) gebildet. Mit der letzten freien Bindungsstelle kann der Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper binden [54] (**Abb. 7**). Der Vorteil der Methode liegt in der hohen Bindungsaffinität zwischen Avidin und Biotin (über 1 Million fach höhere Affinität als die meisten Ak:Ag-Bindungen) und der daraus folgenden hohen Sensitivität der Methode. [20,96] Zur Bildung des beschriebenen AB-Komplexes wurde der VECTASTAIN® ABC-Kit (Fa. Vector Laboratories, U.K.), mit einer Verdünnung der Reagenzien A und B von 1:50 in PBS, verwendet. Nach der Inkubation des AB-Komplexes auf den Gewebeschnitten, 30 Minuten bei Raumtemperatur, folgte die Zugabe des 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC). AEC führt in Anwesenheit von Peroxidase zu einer Rotfärbung. Nach einer Inkubation von 10 Minuten mit der AEC-Lösung und Spülung mit Wasser, erfolgte die Gegenfärbung mit Mayer´s Hämatoxylin für 30 Sekunden mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser (2-3 Minuten). Das bei der Verwendung von AEC entstehende Reaktionsprodukt ist in organischen Lösungsmitteln löslich. Deshalb wurden die noch feuchten Schnitte mit Aquatex (Fa. Merck) eingedeckt.

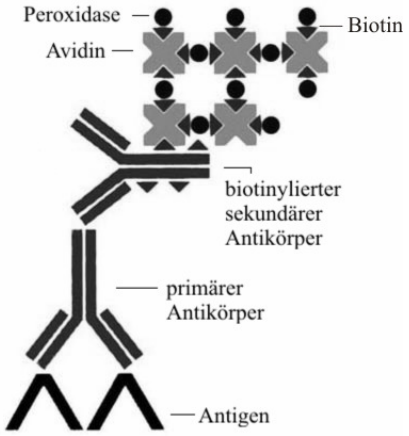


Abb. 7
Prinzip der ABC-Methode (schematische Darstellung) [21]

2.10 Verwendete Computer - Software

ACD/ChemSketch, Freeware 5.12 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada)

SPSS, Version 9.0 (SPSS Inc.)

Microsoft Office Premium Edition 2000 (Microsoft Corporation)

Metamorph-Software - Version 4.5 (Fa. Visitron)

Microcal Origin, Version 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA)

Adobe Photo Shop, Version 5.0 (Adobe Systems Inc.)

Paint Shop Pro, Version 7.0 (Jasc Software Inc.)
Corel Draw, Version10.410 (Corel Corporation)

2.11 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistik-Prgrammpaket SPSS Version 9.0 (SPSS Inc., 1999) und Microcal Origin (Version 5.0) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA-Analyse (analysis of variance) und Student´s t-test. Die Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde als $p < 0.05$ definiert.

3 Ergebnisse

Die verschiedenen Vektoren (siehe 2.2) wurden in humane U87MG Gliomzellen transient und stabil mithilfe kationischer Liposome transfiziert. Dabei wurden Transfektionsraten von max. 30 % erzielt. Zur Charakterisierung des Fusionsproteins HSV-Tk-Luc wurde die HSV-Tk- und Luciferaseaktivität der transfizierten Zellen im Vergleich zur alleinigen Expression der HSV-Tk bzw. Luc bestimmt.

3.1 MTT-Zytotoxizitätstest

Die HSV-Tk Aktivität in transfizierten U87MG Gliomzellen wurde bei allen folgenden Experimenten im MTT-Zytotoxizitätstest (siehe 2.6.1) durch die zytotoxische Wirkung nach Zugabe von Ganciclovir (GCV) bestimmt. Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Anzahl der eingesetzten Zellen auszuschließen, wurde ein MTT-Zytotoxizitätstest mit 4000, 6000 und 10000 stabil HSV-Tk exprimierende U87MG Zellen durchgeführt. Die photometrisch bestimmten Überlebenskurven sind bei einer Standardabweichung von ± 3 % nahezu identisch (**Abb. 8**). In allen folgenden MTT-Zytotoxizitätstests wurden 4000 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte eingesetzt.

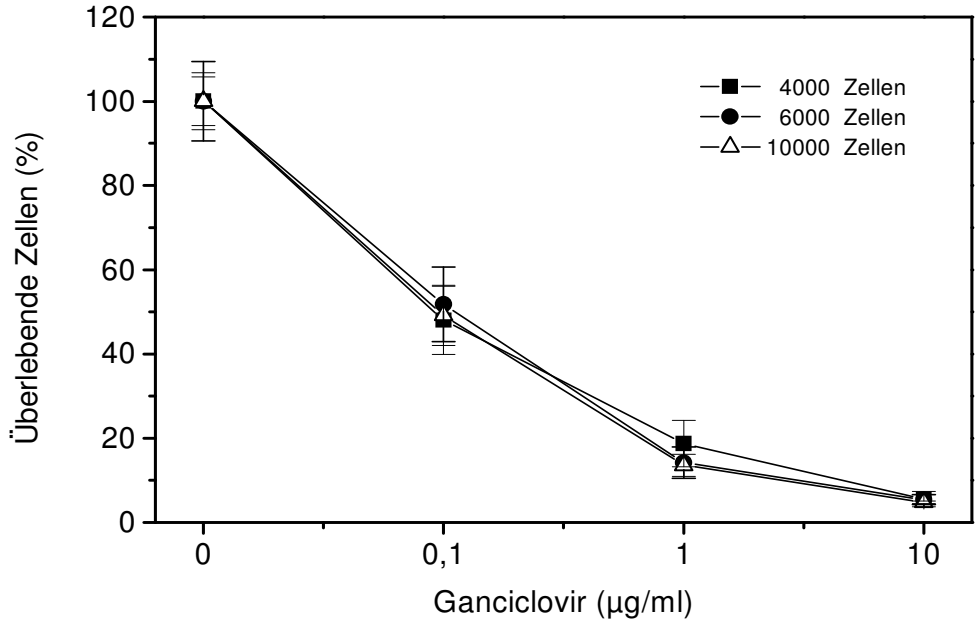


Abb. 8
MTT-Zytotoxizitätstest.Darstellung Überlebenskurven von humanen U87MG Gliomzellen, die HSV-Tk stabil exprimieren. Eingesetzt wurden 4000, 6000 und 10000 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in jeweils acht Parallelproben.

3.2 Transiente Expression der Luc, HSV-Tk und der Fusion zwischen HSV-Tk und Luc

Bei der Durchführung der transienten Transfektion von U87MG Zellen wurden äquimolare Mengen der Plasmid DNA (50 ng (~11.2 fmol) – 2 µg (~450 fmol)) von HSV-Tk, Luc, sowie HSV-Tk-Luc eingesetzt. Die im Folgenden angegebenen Werte der Tk- bzw. Luc-Aktivität beziehen sich auf die geringste bzw. höchste Menge der eingesetzten Plasmid DNA.

3.2.1 Transiente Expression der HSV-Tk

In U87MG Zellen, die nur mit HSV-Tk transient transfiziert wurden, zeigte sich eine zytotoxische Aktivität von 19 ± 2 % (0,05 µg DNA) bis 65 ± 4 % (2 µg DNA) getöteter Zellen (**Abb. 9**). Der Mittelwert der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Menge transfizierter Plamid-DNA betrug 43 ± 4 % getötete Zellen. In den Lysaten dieser Zellen wurde keine Luciferaseaktivität nachgewiesen.

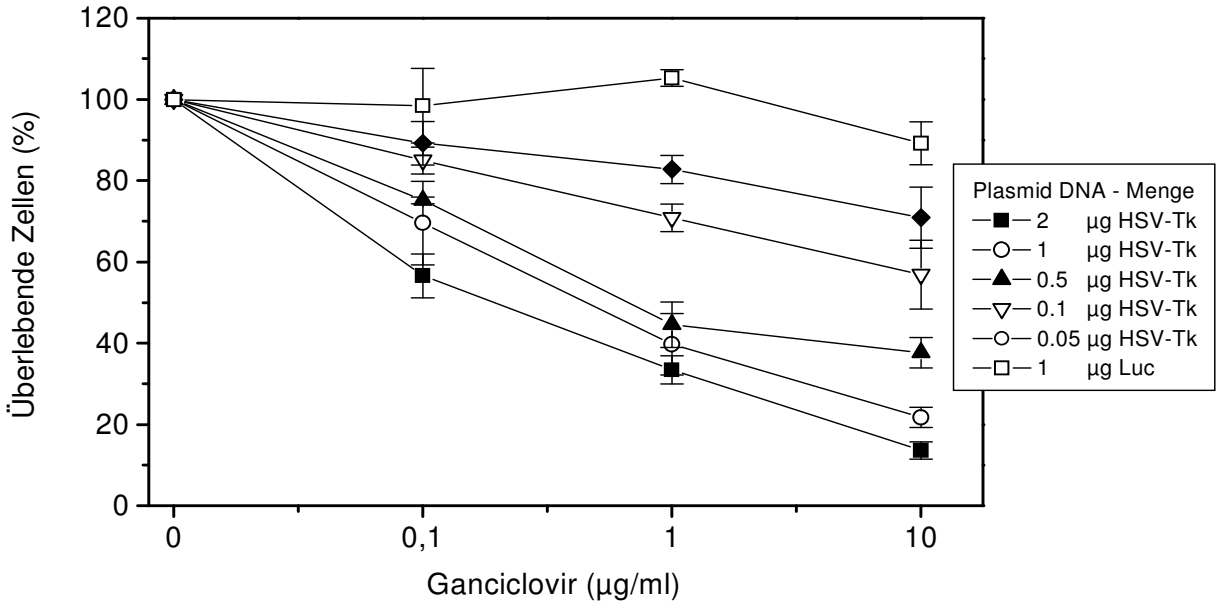


Abb. 9
MTT-Zytotoxizitätstest. Überlebensraten von humanen U87MG Gliomzellen, die HSV-Tk bzw. P.pyralis Luc transient exprimieren ± SD (n=4 Versuche).

3.2.2 Transiente Expression der P. pyralis Luc

Entsprechend der unterschiedlich eingesetzten Plasmidmengen lag die Luciferaseaktivität der allein mit Luc transient transfizierten U87MG Zellen bei 1175 cps/µg Protein (0,05 µg DNA) bis 41198 cps/µg Protein (2 µg DNA), was einem Mittelwert von 20180 ± 1174 cps/µg Protein entspricht. Eine zytotoxische Aktivität im MTT-Zytotoxizitätstest konnte bei diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (**Abb. 9**).

3.2.3 Transiente Expression des Fusionskonstrukts HSV-Tk-Luc

Bei transient das HSV-Tk-Luc Konstrukt exprimierenden U87MG Zellen, lag die HSV-Tk Aktivität im Mittel bei 26 ± 2 % getötete Zellen (9 ± 1 % (0,05 µg DNA) bis 42 ± 1 % (2 µg DNA)) (**Abb. 10A**), was einer Aktivität von ca. 60 %, im Vergleich zur transienten HSV-Tk Expression entspricht (**Abb. 12A, S. 33**). Die Luciferaseaktivität der HSV-Tk-Luc exprimierenden Zellen erreichte nur 14 % im Vergleich zur Expression von P. pyralis Luc alleine (**Abb. 12B, S. 33**), dabei lagen die Werte zwischen 562 ± 73 cps/µg Protein (0,05 µg DNA) und 5298 ± 494 cps/µg Protein (2 µg DNA). Die HSV-Tk- und Luc-Aktivität korrelierten in Abhängigkeit von den transfizierten Plasmid-Mengen sehr gut miteinander ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$) (**Abb. 10C**). Der Nachweis dieser Korrelation stellt die Basis für die nichtinvasive Biolumineszenz-Bildgebung einer Gentherapie mit HSV-Tk dar.

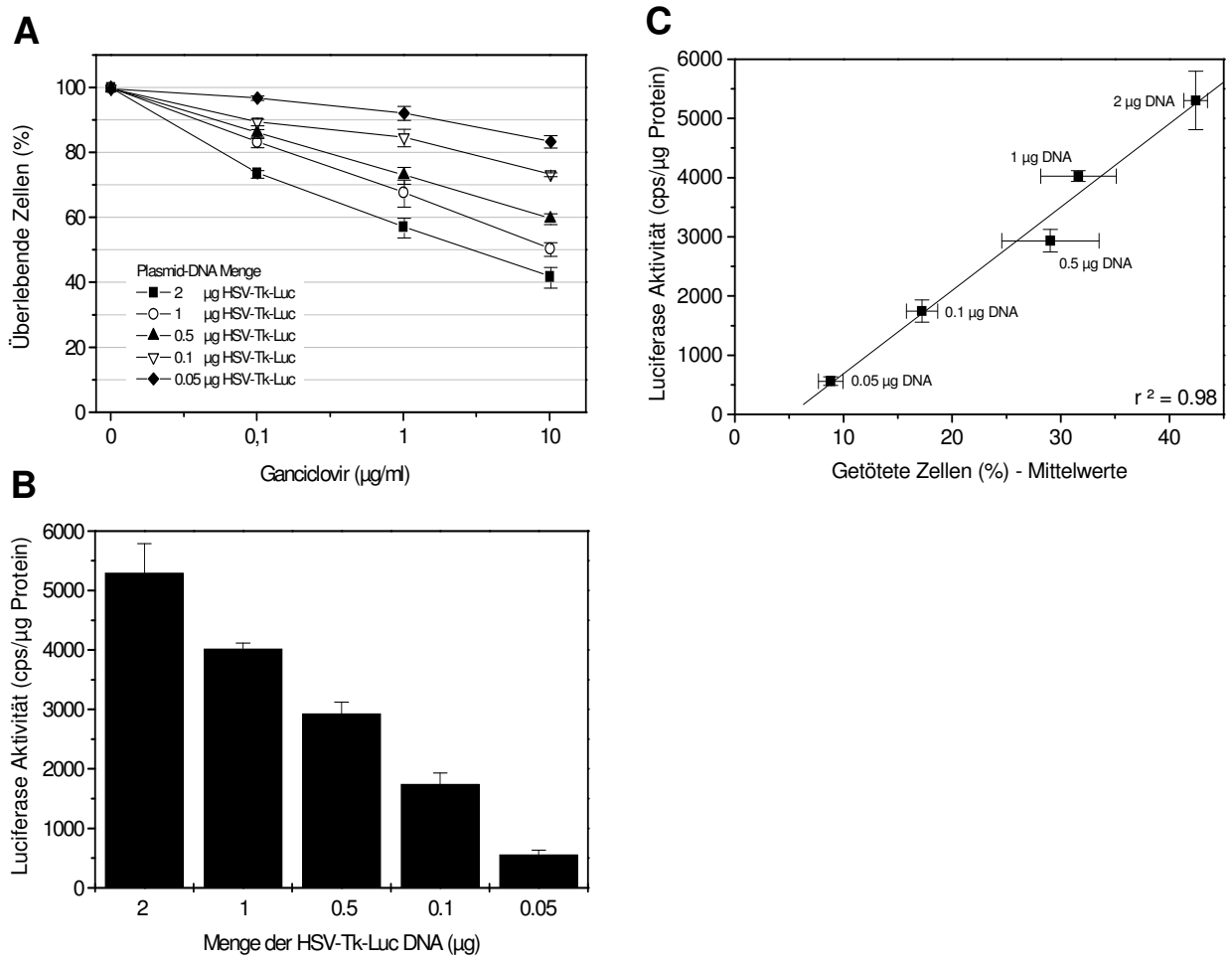


Abb. 10
Transiente Expression des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins in humanen U87MG Gliomzellen, bei unterschiedlichen Mengen an eingesetzter Plasmid-DNA. **(A)** Darstellung der im MTT-Zytotoxizitätstest bestimmten Überlebenskurven. **(B)** Luciferase-Aktivitäten. **(C)** Lineare Regressionsanalyse: beide Enzymaktivitäten wurden in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge gegeneinander aufgetragen ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$).

3.2.4 Transiente Kotransfektion der HSV-Tk und Luc auf verschiedenen Vektoren

In transient transfizierten U87MG Gliomzellen lagen die enzymatischen Aktivitäten der HSV-Tk und Luc im Fusionskonstrukt deutlich unter derjenigen der unfusionierten Enzyme. Somit stellte sich die Frage, ob bei äquimolarer Kotransfektion der für HSV-Tk und Luc kodierenden cDNAs auf getrennten Vektoren eine Erhöhung der Enzymaktivitäten in Verbindung mit einer guten Korrelation der Enzymaktivitäten erreichbar wäre.

Bei dieser Doppeltransfektion wurde eine Luciferaseaktivität von 837 ± 191 cps/µg Protein (0,05 µg Plasmid-DNA) bis 35678 ± 1872 cps/µg Protein (2 µg Plasmid-DNA) gemessen (**Abb. 11B**). Dies entspricht einer Luciferaseaktivität von ca. 82 % im Vergleich zur alleinigen Expression der Luc (**Abb. 12B, S. 33**). Die zytotoxische Aktivität lag zwischen 8.6 ± 4.78 % (0,05 µg DNA) und 57 ± 0.79 % (2µg DNA) getöteter Zellen (Mittelwert 36.7 ± 2.39 %) (**Abb. 11A**). Im Vergleich zur alleinigen Expression der HSV-Tk entspricht das einer 84 %-igen HSV-Tk Aktivität (**Abb. 12A, S. 33**).

Auch bei dieser äquimolaren Kotransfektion der für HSV-Tk bzw. Luc kodierenden cDNAs, zeigt sich eine sehr gute Korrelation der Enzymaktivitäten ($r^2 = 0.94$, $p < 0.007$) (**Abb. 11C**).

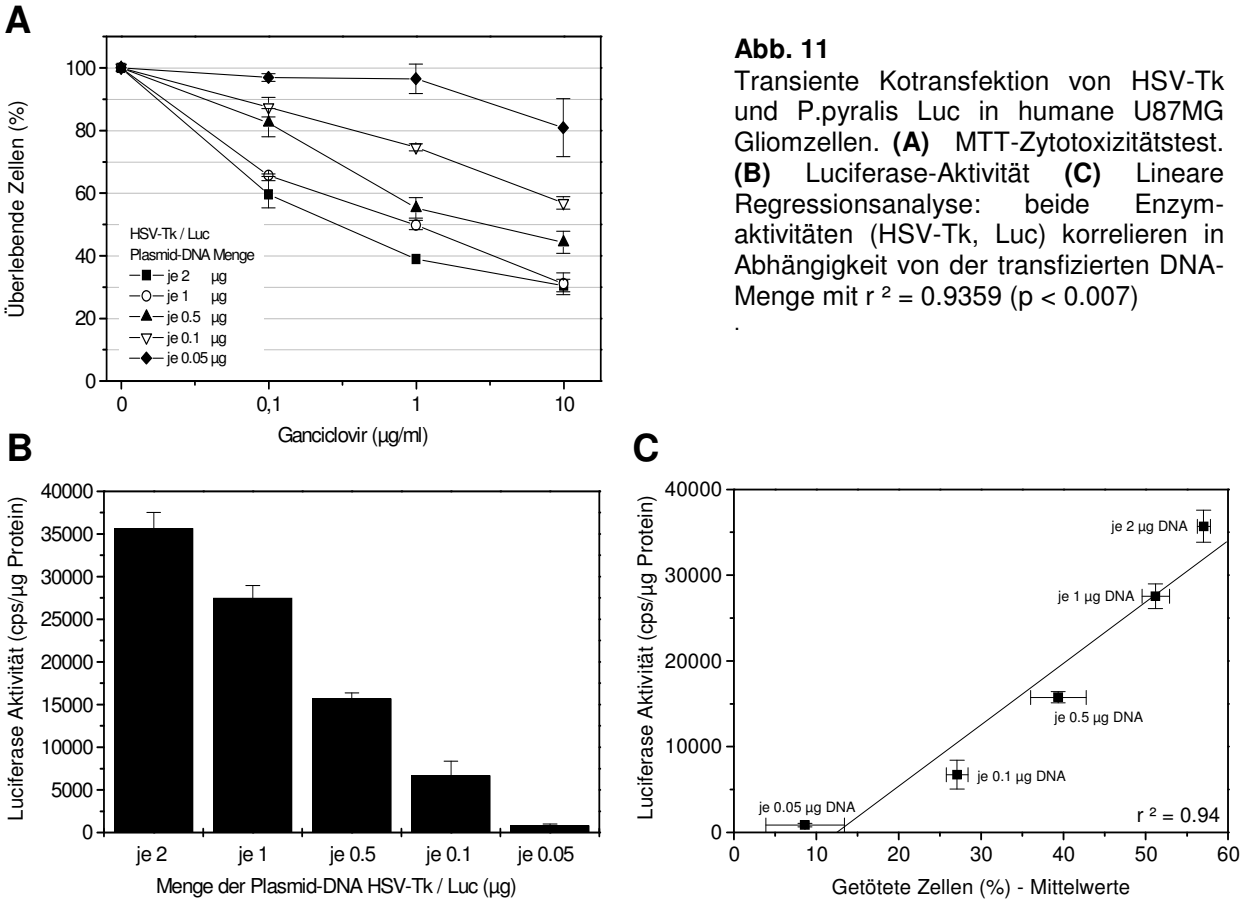


Abb. 11
Transiente Kotransfektion von HSV-Tk und P.pyralis Luc in humane U87MG Gliomzellen. **(A)** MTT-Zytotoxizitätstest. **(B)** Luciferase-Aktivität **(C)** Lineare Regressionsanalyse: beide Enzymaktivitäten (HSV-Tk, Luc) korrelieren in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge mit $r^2 = 0.9359$ ($p < 0.007$)
.

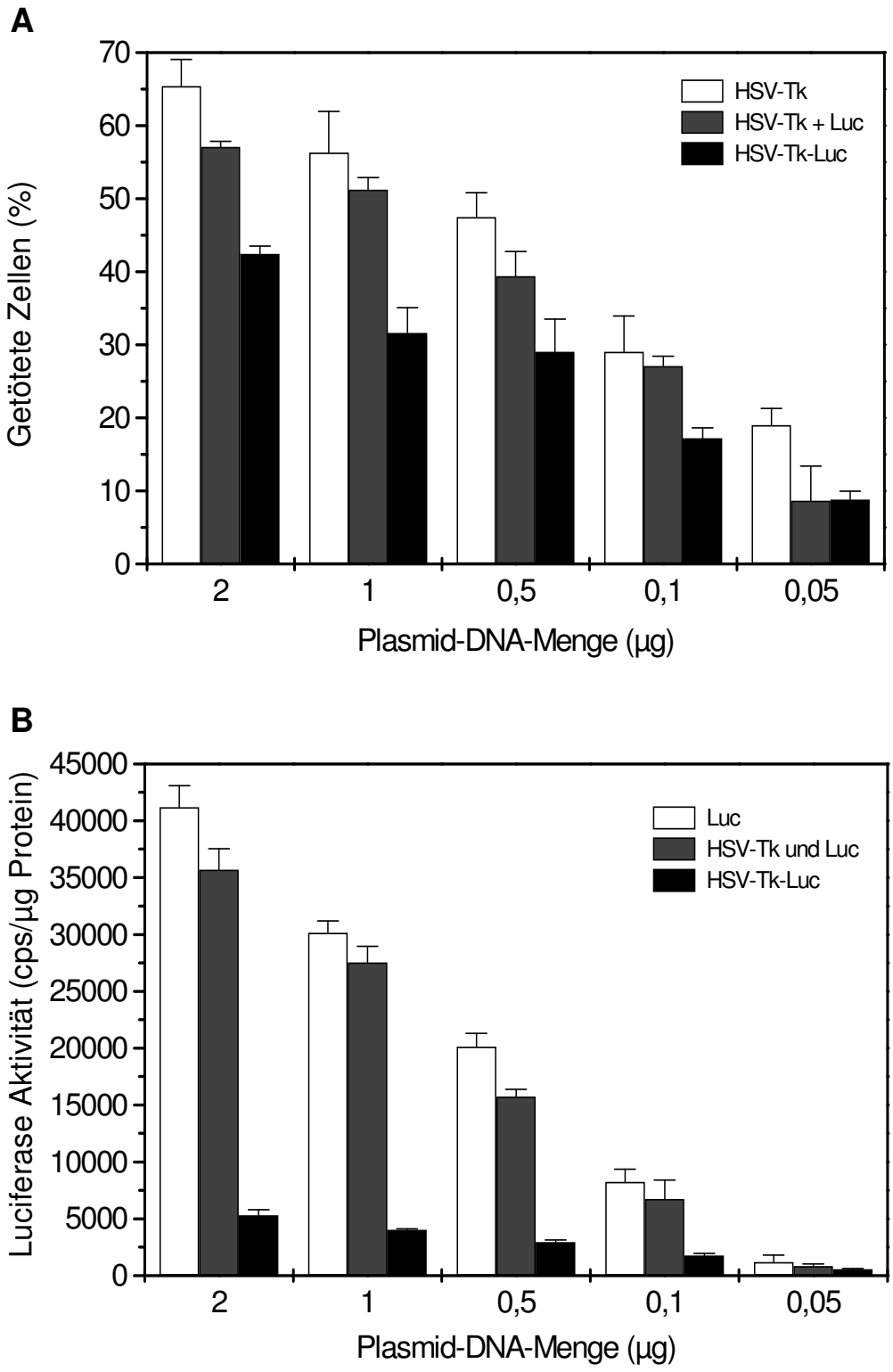


Abb. 12
(A) Vergleichende Darstellung der Thymidinkinase-Aktivitäten (% getöteter Zellen) der transienten Transfektionen humaner U87MG Gliomzellen in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge. Die Doppeltransfektion von HSV-Tk und Luc erreicht 84 % und die Transfektion mit dem Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc 60 % der zytotoxischen Aktivität im Vergleich zur der alleinigen HSV-Tk Expression.
(B) Vergleichende Darstellung der Luciferase-Aktivitäten der transienten Transfektionen humaner U87MG Gliomzellen in Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge. Die Doppeltransfektion von HSV-Tk und Luc erreicht 82 % und die Transfektion mit dem Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc 14.4 % der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur alleinigen Luc Expression.

3.3 Stabile Expression der Luc, HSV-Tk und Fusionen zwischen HSV-Tk und Luc

Die spätere Anwendung der nichtinvasiven Biolumineszenz-Bildgebung im Mausmodell wird, aufgrund der sehr geringen Transfektionseffizienz in vivo, mit stabil exprimierenden Zellklonen durchgeführt. Deshalb wurde die Aktivität des HSV-Tk-Luc Fusionskonstrukts auch in vitro an diesen Zellen untersucht.

Resistenzbestimmung gegenüber dem Selektionsantibiotikum G418

Zur Selektion von mit der Neomycinphosphotransferase-Kasette transfizierten Zellen mit dem Aminoglykosid G418 (siehe 2.5.2) wurde im MTT- Zytotoxizitätstest (**Abb. 13**) die Antibiotikumkonzentration ermittel, bei welcher parentale Zellen ohne Plasmid absterben. Hierbei zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml G418 nach 5 Tagen ein Sterben von 73 % ± 8 % der Zellen. Am 9. Tag der Inkubation überlebten bei dieser G418 - Konzentration nur noch 2 % ± 0.4 % der U87MG Gliomzellen. Um ein möglichst rasches Sterben der nicht G418-resistenten Zellen, bei ja gleichzeitiger Proliferation der resistenten Zellen, zu erreichen, wurde dem Selektionsmedium G418 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt.

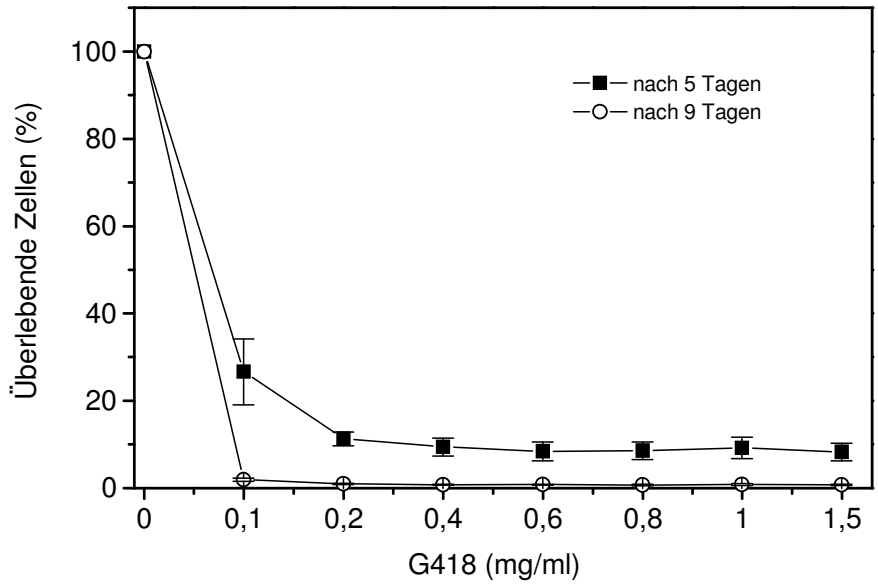


Abb. 13
Resistenz humaner U87MG Glioblastom-zellen gegenüber dem Aminoglykosid G418. Darstellung der im MTT-Zytotoxizitätstest bestimmten Überlebenkurven nach 5 bzw. 9 Tagen Inkubation der Zellen mit G418 unterschiedlicher Konzentration (n=2 mit jeweils Quadruplikaten).

Die zytotoxischen Aktivität der HSV-Tk nach Zugabe von GCV in einem HSV-Tk exprimierenden Zellklon betrug 74.9 ± 3.65 % getötete Zellen (**Abb. 14 und 16A**). Dabei handelte es sich um den Zellklon mit der höchsten HSV-Tk-Aktivität. In Lysaten dieser Zellen

wurde nach Zugabe von D-Luciferin keine Luciferaseaktivität nachgiewesen. In stabil Luc exprimierenden U87MG Gliomzellen wurde eine Luciferaseaktivität von 47685 ± 3396 cps/µg Protein detektiert (**Abb. 16B**). Auch hierbei handelte es sich um den Zellklon mit der höchsten Luc-Aktivität von insgesamt 24 getesteten Klonen. Eine HSV-Tk-Aktivität dieser Zellen im MTT-Zytotoxizitätstest war nicht nachweisbar.

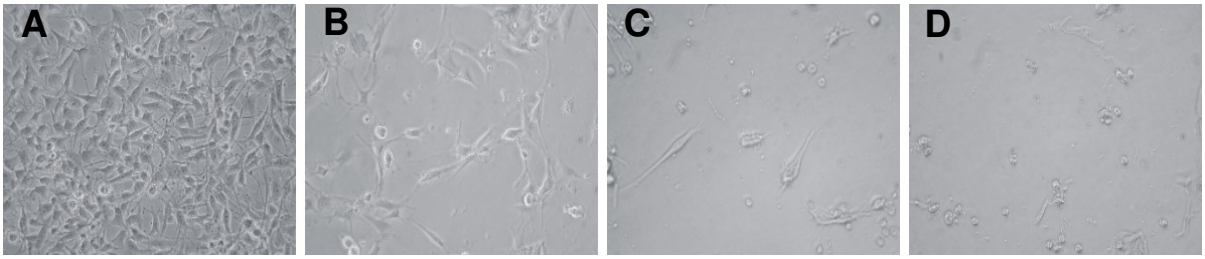


Abb. 14
U87MG-TK Zellen nach 96-stündiger Inkubation mit Ganciclovir. **(A)** 0 µg/ml GCV **(B)** 0.1 µg/ml GCV **(C)** 1 µg/ml GCV **(D)** 10 µg/ml GCV.

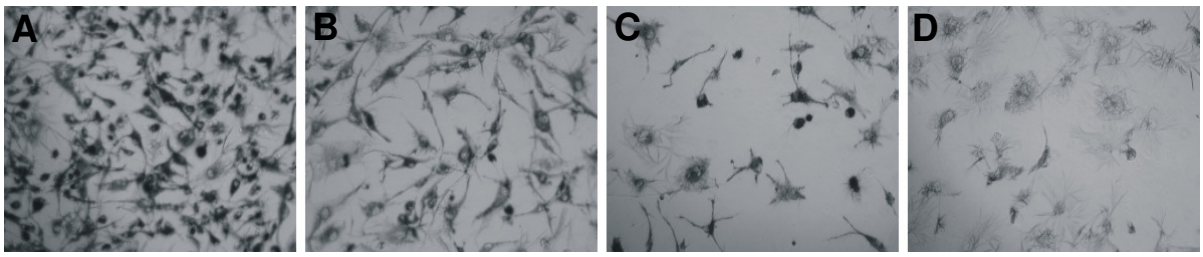


Abb. 15
Formazan-Kristalle (U87MG-TK Zellen nach 96-stündiger Inkubation mit Ganciclovir **(A)** 0 µg/ml GCV **(B)** 0.1 µg/ml GCV **(C)** 1 µg/ml GCV **(D)** 10 µg/ml GCV und anschließender 4-stündiger Inkubation mit 0.5 mg/ml MTT.

Der Vergleich verschiedener U87MG Zellklonen (N=18), die HSV-Tk-Luc stabil exprimieren, miteinander ergab eine Korrelation der Luciferase- und HSV-Tk-Aktivitäten von $r^2 = 0.78$ ($p < 0.001$). Bei der Auswahl von Zellklonen mit den höchsten Enzymaktivitäten ergibt sich eine Korrelation von r^2=0,91 (p<0,001) (N=4).

Die höchste zytotoxische Aktivität der HSV-Tk eines U87MG Zellklons, der das Fusionsprotein HSV-Tk-Luc stabil exprimiert, betrug im Mittel 63.11 ± 2.9 % getötete Zellen (N=4) (**Abb.16A**). Im Vergleich zur stabilen Expression der unfusionierten HSV-Tk wird somit durch das Fusionskonstrukt eine zytotoxische Aktivität der HSV-Tk von 84.3 % erreicht.

Die Luciferaseaktivität bei stabiler HSV-Tk-Luc Expression betrug 19307 ± 1991 cps/µg Protein (N=3) und ergab damit 45,5 % der Aktivität des unfusionierten Enzyms (**Abb. 16B**).

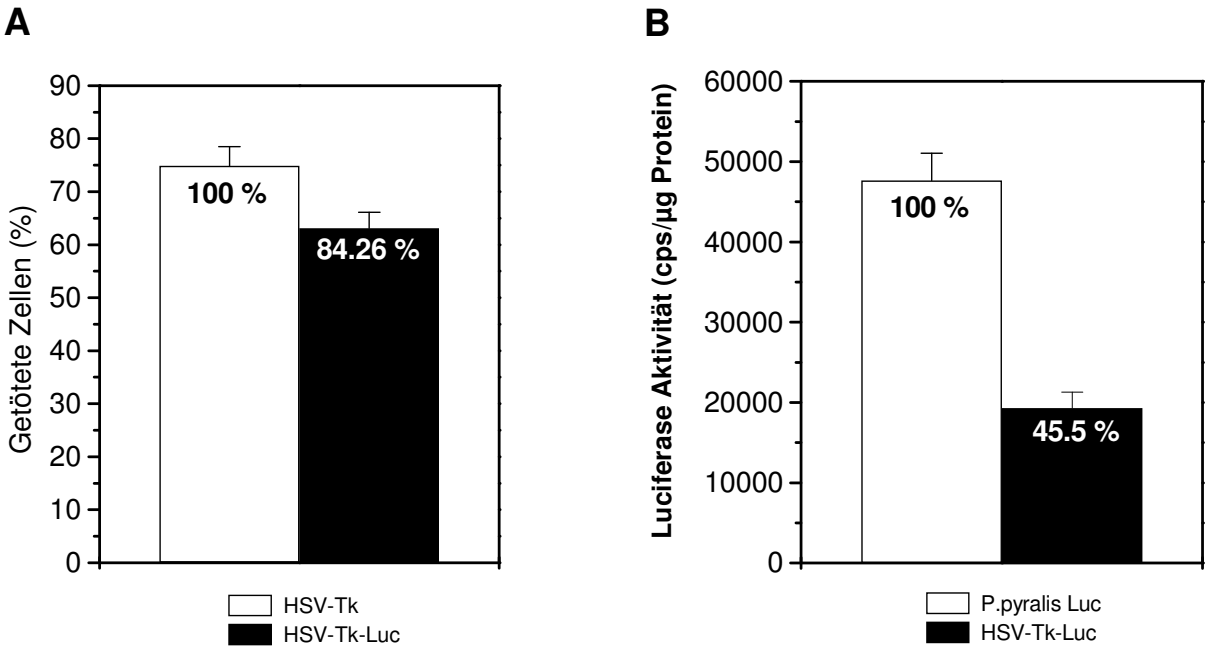


Abb. 16
Vergleichende Darstellung der Enzymaktivitäten von A) HSV-Tk und B) P.pyralis Luc in Zellklonen, die stabil das Fusionskonstrukts HSV-Tk-Luc bzw. die jeweils unfusionierten Enzymen exprimieren. Die Enzym-Aktivitäten d. unfusionierten Enzyme wurden mit 100% gleichgesetzt. HSV-Tk-Luc erreicht 84.26 % der zytotoxischen HSV-Tk-Aktivität und 45.5 % der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur stabilen Expression der jeweiligen unfusionierten Enzyme.

3.4 HSV-Tk in Fusion mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen

Da auch die nichtinvasive in vivo Bildgebung durch fluoreszierende Proteine in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat [135], war eine Alternative zur Biolumineszenz, die Darstellung von gentherapeutischen Strategien über Fluoreszenz.

Fusionen zwischen HSV-Tk und EGFP (enhanced green fluorescent protein), sowie zwischen HSV-Tk und verschiedenen rot fluoreszierenden Proteinen (DsRed2, dsdrFP616) wurden transient in U87MG Zellen transfiziert. Bei allen drei Fusionskonstrukte konnte im MTT-Zytotoxizitätstest eine zytotoxische HSV-Tk-Aktivität nachgewiesen werden (**Abb. 17 und 19**).

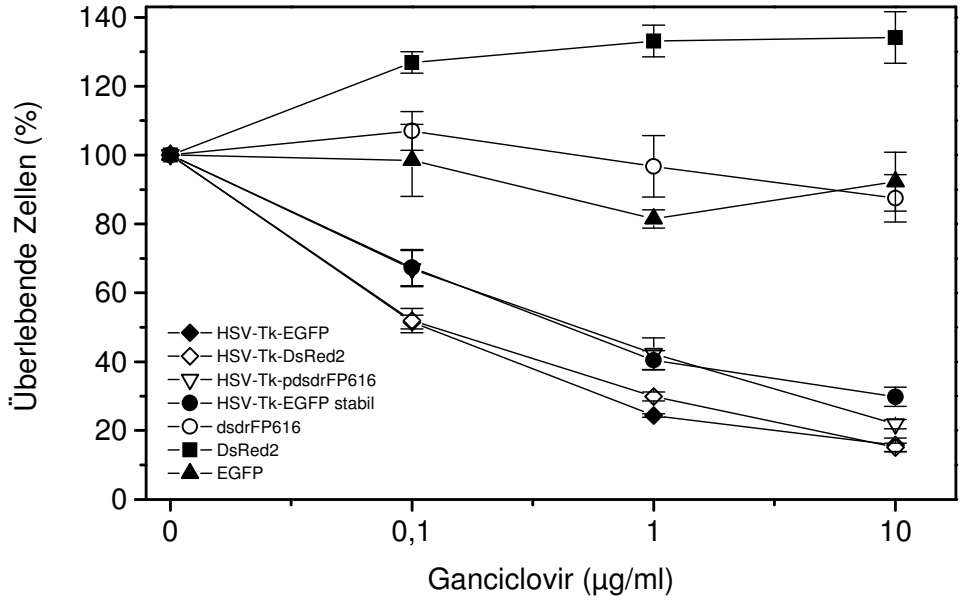


Abb. 17
MTT-Zytotoxizitätesttest. Transiente Transfektion von U87MG Glioblastom-zellen mit HSV-Tk-EGFP, HSV-Tk-DsRed2, HSV-Tk-dsdrFP616 sowie den entsprechenden Kontrollzellen. Stabile Transfektion mit HSV-Tk-EGFP.

Von besonderem Interesse für die Bildgebung mit Fluoreszenz ist die bessere Gewebepenetration des langwelligen, roten Lichts. Die Herstellung von U87MG Zellklonen die HSV-Tk-DsRed1 (red fluorescent protein) stabil exprimieren gelang allerdings nicht, vermutlich aufgrund der bekannten Toxizität von DsRed1 und DsRed2.

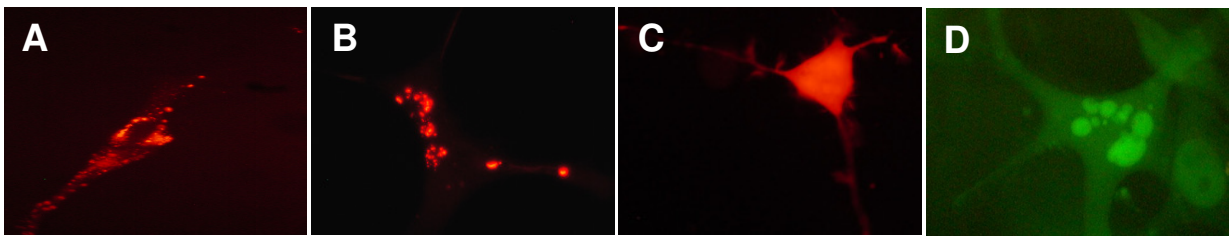


Abb. 18
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung transient **a)** dsdrFP616 und **b)** DsRed2 **c)** HcRed **d)** EGFP exprimierender U87MG Zellen. Deutliche Aggregationsneigung und typische intrazelluläre Lokalisation der Tetramere dsdrFP626 und DsRed2. Im Gegensatz dazu ein neueres rot fluoreszierendes Protein–HcRed, das als Dimer vorliegt und nicht zur Aggragation neigen soll [Fa.Clontech], sowie das als Monomer vorliegende EGFP.

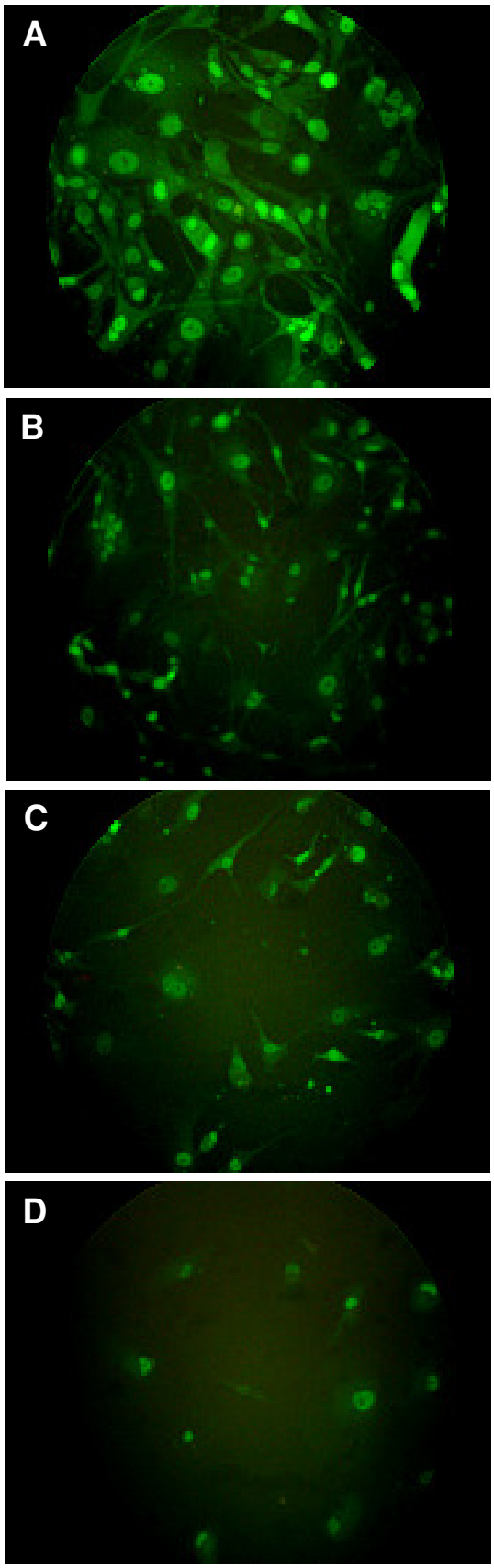


Abb. 19
MTT-Zytotoxizitätstest:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung stabil exprimierender HSV-Tk-EGFP U87MG Zellen nach einer 96 stündigen Inkubation mit **(A)** 0 µg/ml **(B)** 0.1 µg/ml **(C)** 1 µg/ml **(D)** 10 µg/ml GCV.

3.5 Biolumineszenz-Bildgebung in intakten Zellen

Ein Ziel dieser Arbeit ist die bildliche Darstellung der Gentherapie maligner Hirntumoren mit HSV-Typ 1-Thymidinkinase in vivo, bestimmt über die gleichzeitige Expression der Luciferase. Dafür ist es notwendig, daß die Bestimmung der Luciferaseaktivität nach Zugabe des als schwer membrangängig bekannten D-Luciferins [154] nicht nur in Zelllysaten, sondern auch in intakten Gliomzellen gelingt.

3.5.1 Sensitivität

Die Bildgebung der Luciferaseaktivität in intakten Gliomzellen erfolgte mit dem Visiluxx-System (Fa. Visitron) nach Zugabe von D-Luciferin. Minimal 500 U87MG Zellen, die stabil das Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc exprimierten, konnten detektiert werden (**Abb. 20A**). Dabei zeigte sich eine gute Korrelation zwischen der Photonenemission und der Anzahl der HSV-Tk-Luc exprimierenden Zellen (r^2 = 0.96, p < 0.0001). Die luminometrisch bestimmte Luciferase-Aktivität im Lysat dieser Zellen betrug 19307 cps/µg Protein. Bei stabil P.pyralis Luciferase exprimierenden U87MG Gliomzellen konnten minimal 125 Zellen detektiert werden (**Abb. 20B**). Die Luciferase-Aktivität im Zell-Lysat betrug 47684 cps/µg Protein.

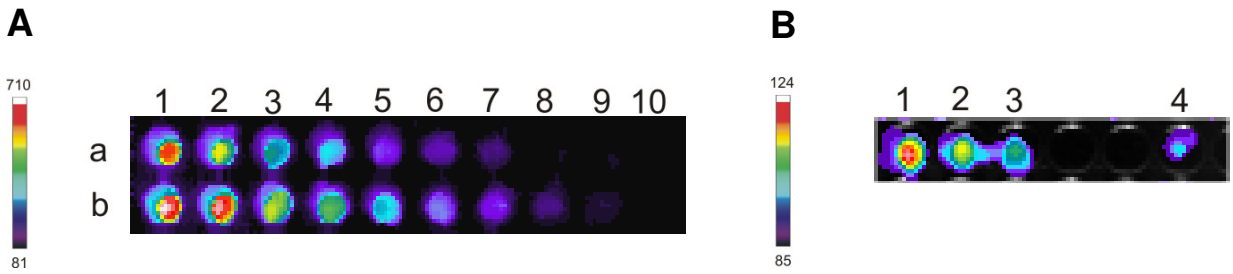


Abb. 20
Biolumineszenz-Bildgebung (60 Minuten Aufnahmedauer) in intakten U87MG Gliomzellen, die stabil mit A) HSV-Tk-Luc bzw. B) P.pyralis Luc transfiziert wurden. **(A)** a: 0.15 mg/ml D-Luciferin 3 Stunden vor Bildgebung zum Medium hinzugefügt; b: Zugabe von D-Luciferin unmittelbar vor Bildgebung; 1 = 80.000, 2 = 50.000, 3 = 30.000, 4 = 20.000, 5 = 10.000, 6 = 6.000, 7 = 4.000, 8 = 1.000, 9 = 500, 10 = 0 Zellen; Korrelation Photonenemission mit Zellzahl: r^2 = 0.96, p < 0.0001.
(B) 0.15 mg/ml D-Luciferin direkt vor Bildgebung zum Medium hinzugefügt; 1 = 1.000, 2 = 500, 3 = 250, 4 = 125 Zellen; Korrelation Photonenemission mit eingesetzter Zellzahl: r^2 = 0.98, p < 0.01.

3.5.2 Biolumineszenz-Signalstärke: D-Luciferin versus Aminoluciferin

Analog zur Verwendung von D-Luciferin (λ_{max} = 558 nm) wurde zur Verbesserung der Signalstärke auch Aminoluciferin (synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bruce Branchini, Conneticut College, U.S.A), als Substrat der humanisierten Luciferase, getestet. Mit einer zusätzlichen NH_2-Gruppe an der 6´-OH-Gruppe erschien es besonders deshalb interessant, da das emittierte Licht deutlich langwelliger (λ_{max} = 602 nm (lt. Branchini)) und damit potentiell besser gewebegängiger sein sollte. In den Experimenten

wurde ein Gemisch aus D- und L-Aminoluciferin eingesetzt, da aufgereinigtes D-Aminoluciferin nicht zur Verfügung stand, wobei nur bei der Reaktion des D-Enantiomers mit der P.pyralis Luciferase Licht emittiert wird.

In der Bildgebung der Luciferaseaktivität in intakten U87MG Zellen, die stabil Luc exprimierten, konnte bei der Verwendung des NH_2-Luciferins nur 29 % der Photonenemission im Vergleich zum D-Luciferins erreicht werden. Minimal wurden 5000 dieser Zellklone dedektiert, wobei eine sehr gute Korrelation zwischen der eingesetzten Zellzahl und der Photonenemission bestand ($r^2 = 0.99$, $p < 0.0001$) (**Abb. 21**).

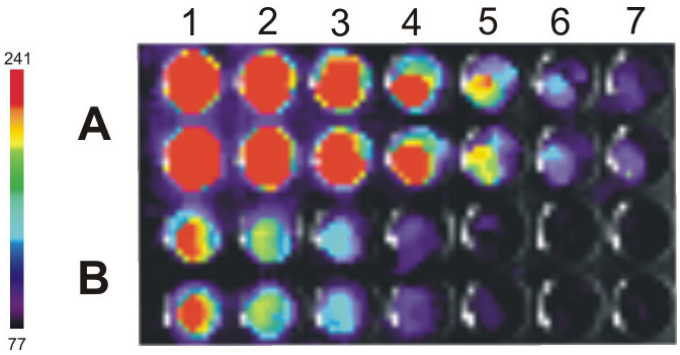


Abb. 21
Imaging der Luciferaseaktivität (15 Minuten) in intakten U87MG Gliomzellen, die stabil mit P.pyralis Luc transfiziert wurden.
A: 0.15 mg/ml (500 µM) D-Luciferin pro Kavität; **B**: 0.15 mg/ml NH_2-Luciferin pro Kavität; 1 = 80.000, 2 = 50.000, 3 = 25.000, 4 = 10.000, 5 = 5.000, 6 = 2.000, 7= 1.000; Photonenemission unter B entspricht 29 % der Lichtemission unter A.

Diese Zellkultur-Ergebnisse konnten in der in vivo Bildgebung von subkutanen Tumoren aus stabil HSV-Tk-Luc exprimierender Zellen bestätigt werden. Hier zeigte sich eine deutlich schwächere Photonenemission bei der Verwendung von NH_2-Luciferin im Vergleich zur Verwendung von D-Luciferin (**Abb. 22**).

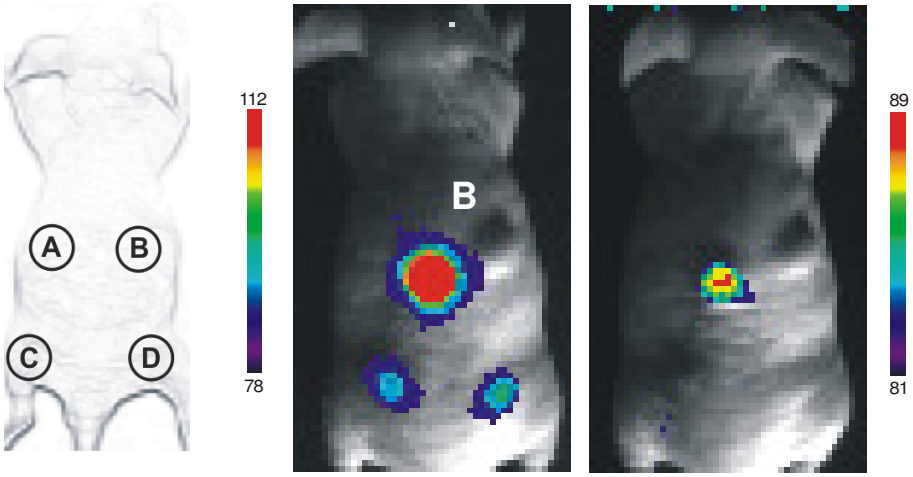


Abb. 22
Dargestellt sind s.c. injizierte Tumoren aus stabil HSV-Tk-Luc (A, C, D) bzw. HSV-Tk (B) exprimierenden U87MG Gliomzellen mit **(A)** 150 mg/kg KG D-Luciferin (i.p.) und 26 Stunden später mit **(B)** 150 mg/kg KG NH_2-Luciferin (i.p.); 37 Tage Zellinjektion; Die Photonenemission mit NH2-Luciferin erreichte nur 25 % der mit D-Luciferin erreichten Lichtemission im gleichen Versuchstier.

3.5.3 Bioluminezente Quantifizierung der HSV-Tk-Aktivität in intakten Zellen

Zur Darstellung und Quantifizierung der zytotoxischen HSV-Tk Aktivität in intakten, stabil das Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG Zellen mittels BLI wurden nach 96 h Inkubation mit GCV und Zugabe von D-Luciferin die bioluminezenten Signale im Imager via CCD-Kamera aufgezeichnet. Die detektierten Biolumineszenz-Signale (Photonenemission) zeigen dabei eine sehr gute Korrelation mit der parallel im MTT-Zytotoxizitätstest bestimmten HSV-Tk Aktivität von $r^2 = 0.94$ ($p=0.029$) (**Abb. 23**).

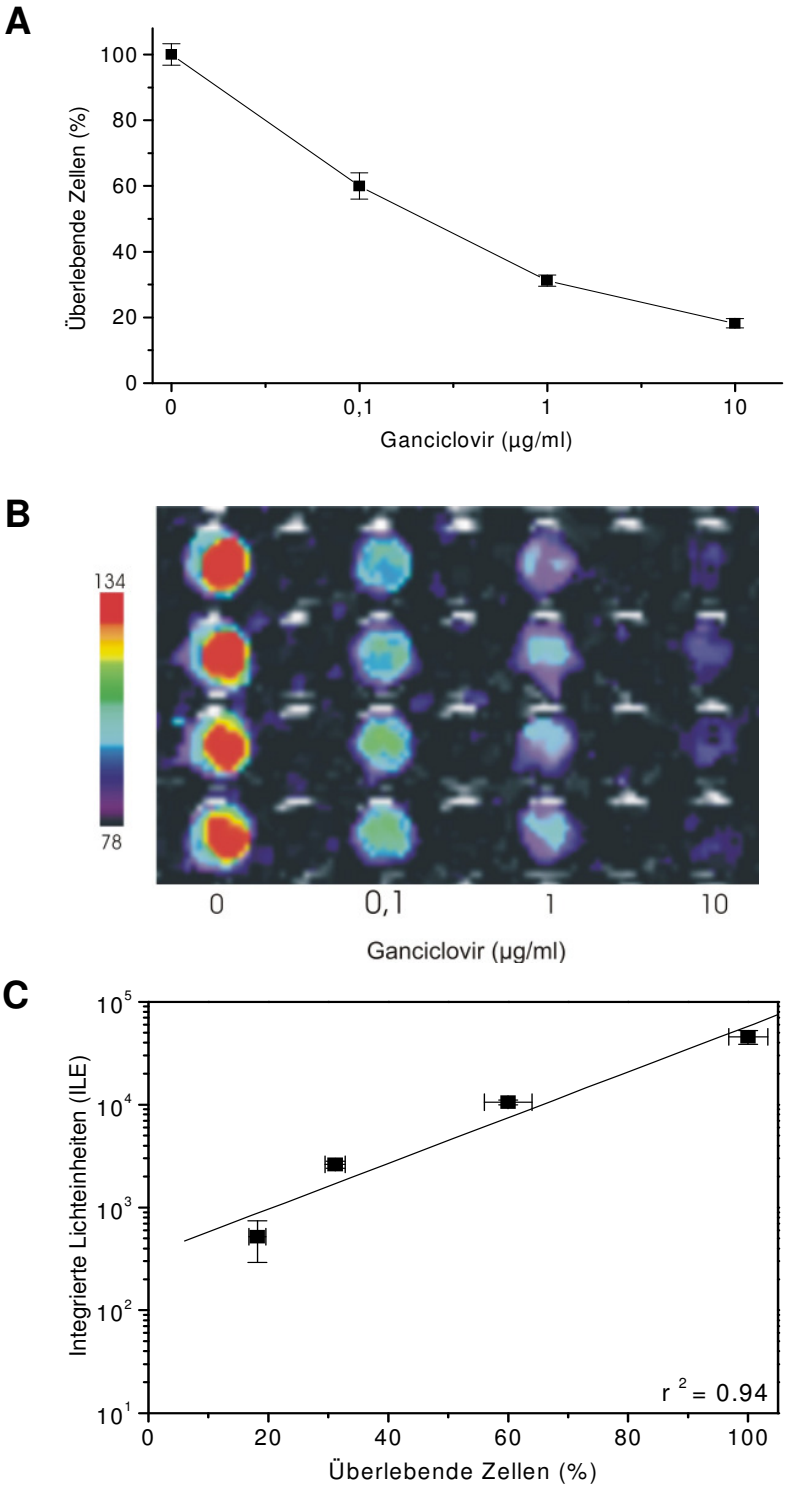


Abb. 23
Optische Darstellung und Quantifizierung der HSV-Tk-Aktivität in intakten, stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden humanen U87MG Gliomzellen mittels Biolumineszenz.
(A) Zytotoxische Aktivität nach 4 Tagen Ganciclovir-Behandlung (MTT-Zytotoxizitätstest)
(B) Biolumineszenz-Bildgebung der GCV behandelten Zellen (links: unbehandelt)
(C) Lineare Regressionsanalyse der registrierten Photonen-emission (CCD Kamera) und der zytotoxischen HSV-Tk-Aktivität ($r^2 = 0.94$, $p = 0.029$).

3.6 Biolumineszenz-Bildgebung in vivo

3.6.1 Zeitverlauf und Sensitivität des Biolumineszenz-Signals

Es ist wichtig den zeitlichen Verlauf der Luciferaseaktivität in vivo zu analysieren, um Dauer und Beginn der Aufnahmeperiode nach intraperitonealer Applikation des D-Luciferins festlegen zu können. In dieser Analyse des Zeitverlaufs der BLI-Signale (**Abb. 24B**) wurden maximale Werte in der Summationsaufnahme 16 Minuten nach intraperitonealer Luciferin-Applikation aufgezeichnet. In den folgenden Experimenten wurde eine 15 minütige Aufnahmeperiode, die ca. 7 Minuten nach der Luciferin-Injektion (i.p.) begann, ausgewählt.

Zur Untersuchung der Sensitivität der Biolumineszenz-Bildgebung im Mausmodell wurden pro Maus 10, $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$ stabil Luc exprimierende, humane Glioblastomzellen subkutan in Nacktmäuse injiziert (Injektions-Schema siehe **Abb. 24A**). Da U87MG-Gliomzellen, die nur Luc stabil exprimieren, in vivo nicht anwuchsen, wurden T98MG-Gliomzellen verwendet (Luciferaseaktivität 20000 cps/µg Protein). Am Tag nach der Zellinjektion waren minimal bioluminezente Signale bei $1x10^3$ stabil Luc exprimierenden T98MG-Zellen zu detektieren (**Abb. 24A**). Nach 11 Tagen konnte auch im Bereich der $1x10^2$ injizierten Zellen ein deutliches BLI-Signal detektiert werden. Am Beispiel des Fusionskonstrukts HSV-Tk-Luc, stabil in U87MG-Zellen exprimiert, konnten BLI-Signale von $2x10^4$ Zellen in vivo aufgezeichnet werden, wobei eine weitere Reduktion der Zellzahl nicht untersucht wurde.

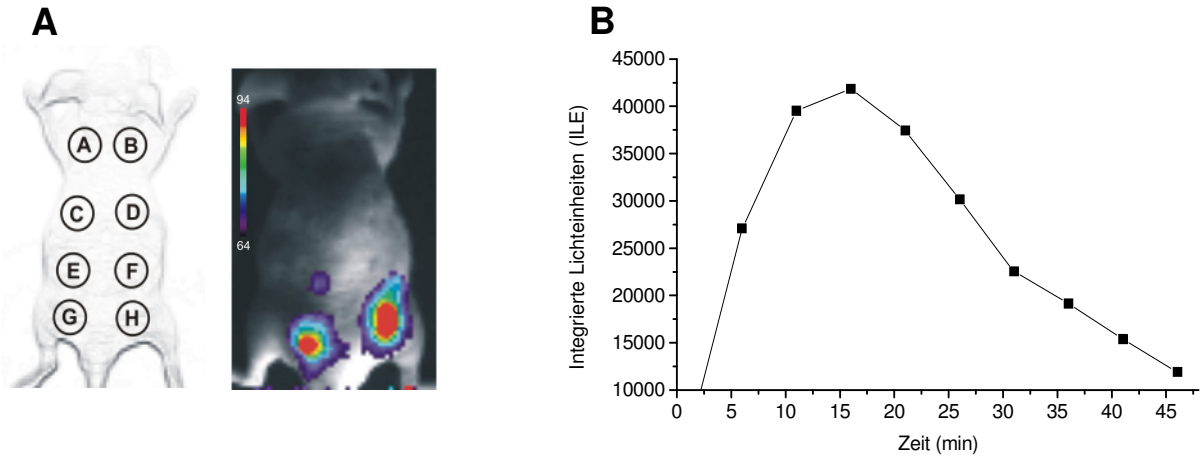


Abb. 24
(A) Subkutan injizierte humanen T98MG Gliomzellen, die stabil mit *P. pyralis* Luciferase transfiziert wurden: A, B = 10; C, D = $1x10^2$; E = $1x10^3$; F = $1x10^4$; G = $1x10^5$; H = $1x10^6$ Zellen. BLI-Bildgebung an Tag 1 nach der Zellinjektion. Minimal ist das Signal von $1x10^3$ T98MGLuc-Zellen zu detektieren. **(B)** Zeitverlauf des BLI-Signals 22 Tage nach Injektion (s.c.) der Zellen. Dargestellt sind bioluminezente Summationswerte der gesamten Maus von jeweils 5 Minuten mit Beginn 1 Minute nach intraperitonealer Luciferin-Applikation. Maximale Signale werden im Summationsbild 16 Minuten nach Luciferin-Applikation (i.p.) detektiert.

3.6.2 Bioluminеszenz-Darstellung der Gentherapie mit HSV-Tk-Luc im Mausmodell

3.6.2.1 Versuchsreihe in vivo (10 Versuchstiere)

Den Nacktmäusen wurden im Bereich des Rückens vier subkutane Zelldepots mit U87MG-Gliomzellen injiziert, die das Fusionsprotein HSV-Tk-Luc stabil exprimierten und in vitro die höchste zytotoxische und biolumineszente Aktivität aufwiesen. Bei Erreichen eines Tumor-Durchmessers von ca. 5 mm wurden die Tiere geimaged und eine 14-tägige GCV-Therapie (i.p.) begonnen (n=7). Die Kontrolltiere (n=3) erhielten NaCl 0,9 %ig (i.p.). Das initiale Tumorvolumen betrug 309 ± 37 mm^3 bei einer biolumineszenten Lichtemission von 122961 ± 22155 ILE (Tag 7, Therapiebeginn). Durch serielle Messungen (Tag 7,15,22,29,56) des Tumorvolumens mittels Schiebelehre und der Luc-Aktivität mittels CCD-Kamera (**Abb.25**) konnte während der GCV-Therapie sowohl ein Abfall der Lichtemissionen (**Abb. 26A**) als auch des Tumorvolumens (**Abb. 26B**) festgestellt werden. Bei allen behandelten Mäusen wurden die subkutanen HSV-Tk-Luc Tumore vollständig zerstört und zeigten bis zum Studienende (Tag 90 nach Zellinjektion) kein erneutes Tumorwachstum oder eine erneute biolumeszente Lichtemission.

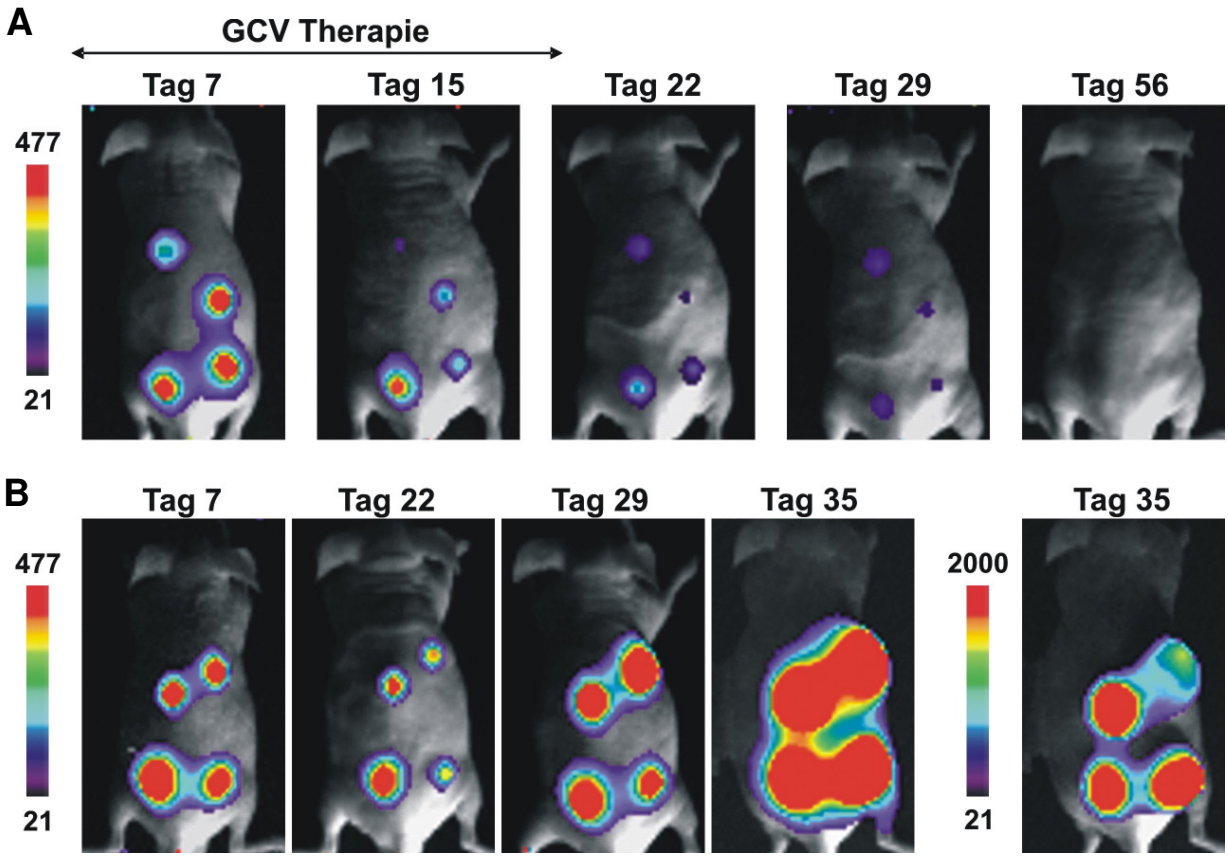


Abb. 25
Biolumineszenz-Bildgebung im Mausmodell. Dargestellt sind s.c. injizierte Tumoren aus stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG Gliomzellen (je $2x10^6$ Zellen). (A) behandel mit Ganciclovir (i.p.) von Tag 7 bis Tag 21 nach Zellinjektion. (B) Kontrollmäuse mit NaCl 0,9 % behandelt (i.p.).

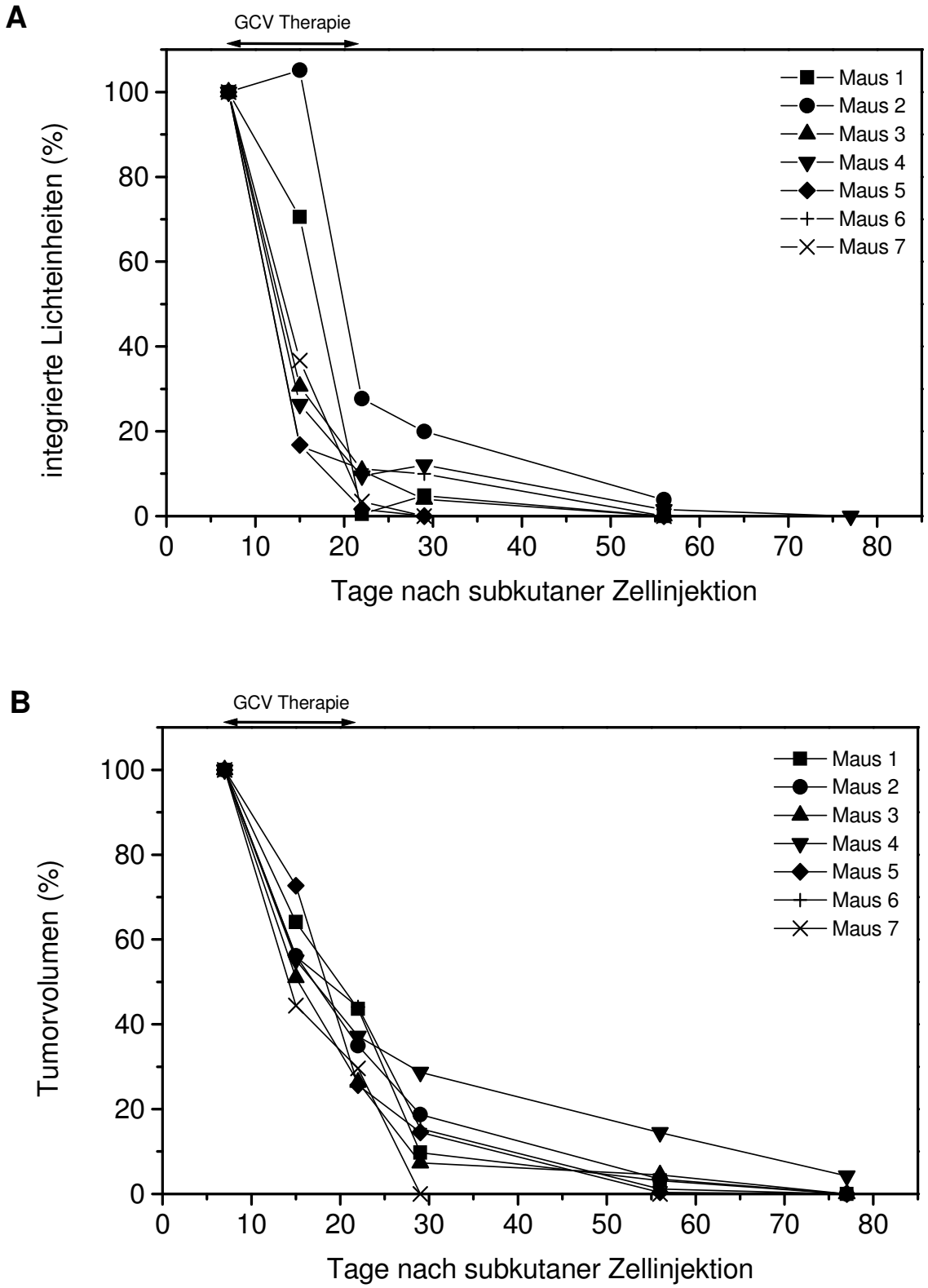


Abb. 26
Vergleichende Darstellung des (A) Biolumineszenz-Signals und der (B) Tumorvolumina in GCV behandelten Mäusen (n=7), die jeweils 4 HSV-Tk-Luc exprimierende subkutane U87MG Tumore trugen. GCV wurde für 14 Tage intraperitoneal appliziert (Beginn: Tag 7 nach Zellinjektion). Alle Mäuse wurden seriell an Tag 7, 15, 22, 29 und 56 nach Zellinjektion mittels CCD-Kamera untersucht. Das BLI Signal bzw. das Tumorvolumen an Tag 7 wurde mit 100% gleichgesetzt.

Bei den behandelnden Mäusen betrug die Korrelation zwischen Tumorvolumen und Lichtemission $r^2 = 93$ ($p = 0.008$) (**Abb. 27A**). Die 3 Kontrolltiere zeigten eine Korrelation von $r^2 = 98$ ($p = 0.010$) (**Abb. 27B**), wobei bei Erreichen einer Tumorgröße von über 12-15 mm Durchmesser der Anstieg der Lichtemissionen deutlich geringer ausfiel wie der Anstieg des Tumorvolumens.

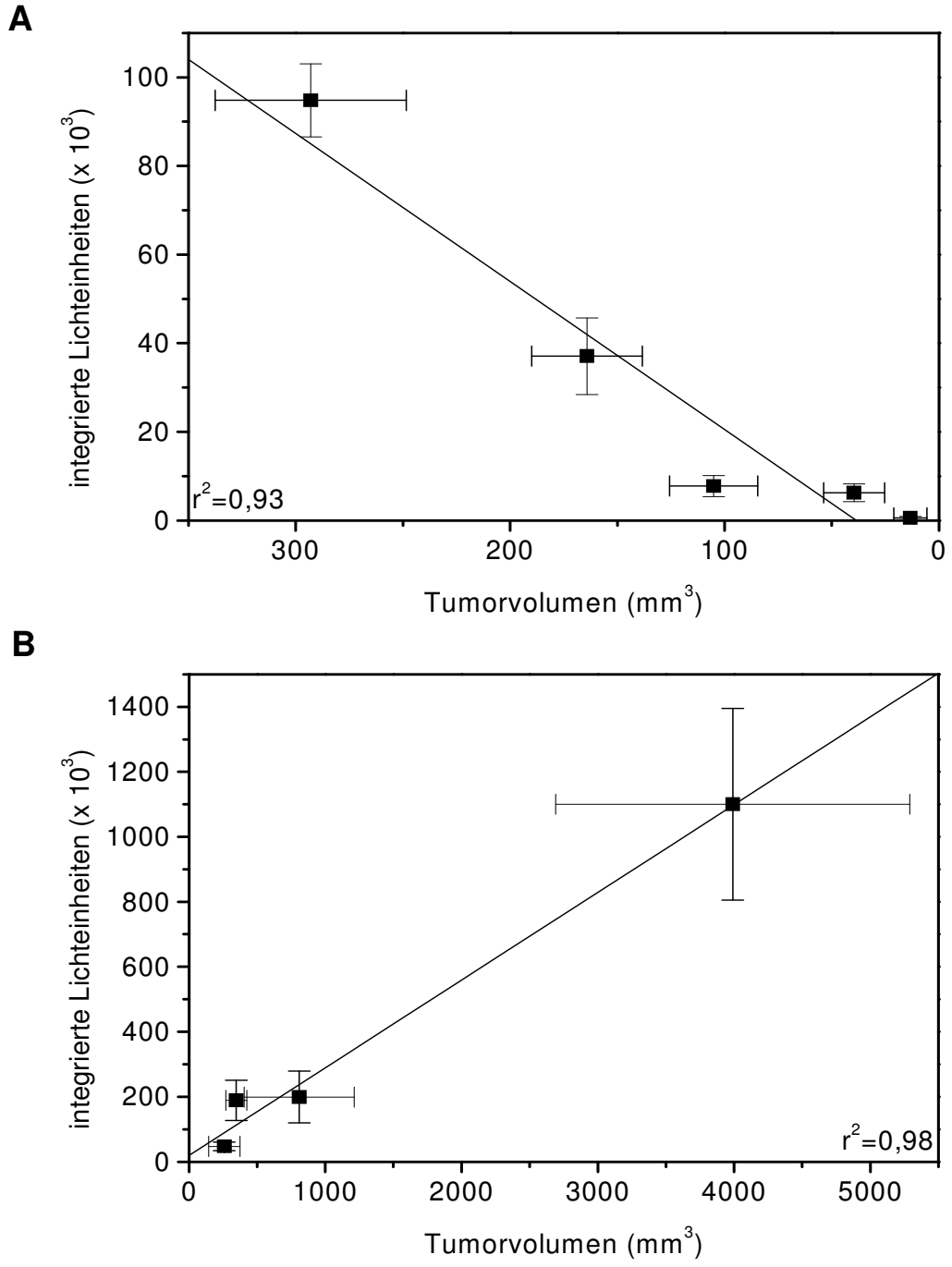


Abb. 27
Lineare Regressionsanalyse. Die Lichtemissionswerte aller Versuchstiere, gemessen mittels CCD-Kamera an Tag 7, 15, 22, 29 und 56 nach Zellinjektion, wurden den Tumorvolumina gegenüber gestellt. (A) GCV behandelte Tiere (n=7): $r^2 = 93$ ($p = 0.008$), (B) mit NaCl 0,9% behandelte Kontrolltiere (n=3): $r^2 = 98$ ($p = 0.010$).

Maus 11

Diese Nacktmaus enthielt im Bereich des Rückens drei subkutane Tumore aus stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden Zellen ($2x10^6$ Zellen injiziert) und einen Tumor aus stabil HSV-Tk exprimierenden U87MG-Gliomzellen ($2x10^6$ Zellen injiziert).

Der HSV-Tk Tumor wurde durch eine zweimalige 14-tägige GCV-Therapie vollständig eliminiert. Das initiale Tumorvolumen betrug 156 mm^3. Nach 14 Tagen GCV-Therapie bestand eine 16%ige Resttumormasse (25 mm^3), die innerhalb von weiteren 28 Tagen ohne Therapie wieder auf 45 % des Initialvolumens (auf 70 mm^3) anstieg. Nach einer erneut durchgeführten GCV-Therapie (14 Tage) war der Tumor palpatorisch nicht mehr nachweisbar (**Abb. 29A**) und zeigte auch im weiteren Verlauf keine erneute Wachstumstendenz.

Zwei der HSV-Tk-Luc Tumoren waren palpatorisch zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die initiale Lichtemission dieser Tumoren von 3750 ILE wurde durch die GCV-Therapie auf 206 ILE (Tag 1 nach Abschluß der Therapie) verringert.

Ein Tumor (**Abb. 28**) aus stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG Zellen im gleichen Versuchstier zeigt dagegen das in **Abb. 28 und 29B** dargestellte gegensätzliche Lichtemissions- und Wachstumsverhalten.

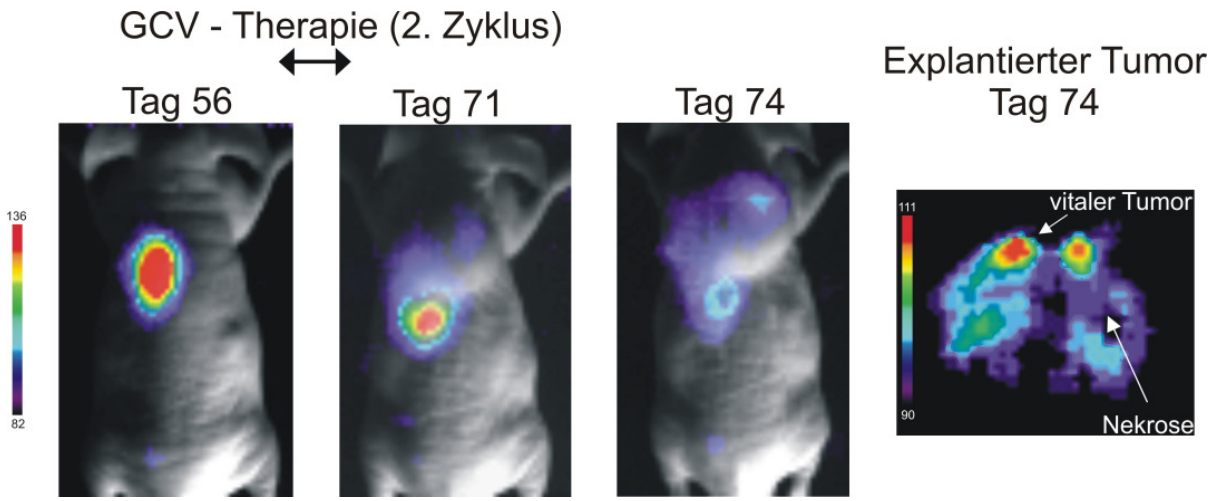


Abb. 28
Biolumineszenz-Bildgebung eines Tumors aus stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG Zellen, nach zweimalig durchgeführter GCV-Therapie (je 14 Tage), zeigt sich eine Abnahme der Luciferase-Lichtemission bei Erhöhung des Tumorvolumens. Der explantierte Tumor zeigt breits makroskopisch große nekrotische Areale, die sich auch in der biolumineszenten Bildgebung (10 Minuten Aufnahmedauer) des explantierten Tumors und in der histologischen Untersuchung wiederfinden.

Das initiale Tumorvolumen dieses HSV-Tk-Luc Tumors war bei einer Luc-Lichtemission von 5827 ILE nicht palpabel. Als Erklärung wurde ein intramuskuläres Wachstum der Tumorzellen vermutet, was sich bei der späteren Obduktion bestätigte. Während der 14-tägigen GCV-Therapie zeigte der Tumor einen Abfall der Luciferase-Lichtemission auf 32 % (1850 ILE) des Ausgangswertes. In den 28 nachfolgenden Tagen ohne Therapie stieg die Lichtemission erneut auf 146 % (8514 ILE) des Ausgangswertes, bei einer palpablen Tumorlast von 313 mm^3, an.

Die erneut durchgeführte GCV-Therapie (14 Tage) führte zwar zu einem Abfall der Lichtemission auf 5326 ILE , das Tumorvolumen stieg jedoch um mehr als das 15fache an (**Abb. 29B**). Bei der Explantation des Tumors imponierte die Schnittfläche mit ausgeprägten Nekrosen, die sich in der biolumineszenten Darstellung des explantierten Tumors als Regionen mit geringer Lichtemission zeigten (**Abb. 30**).

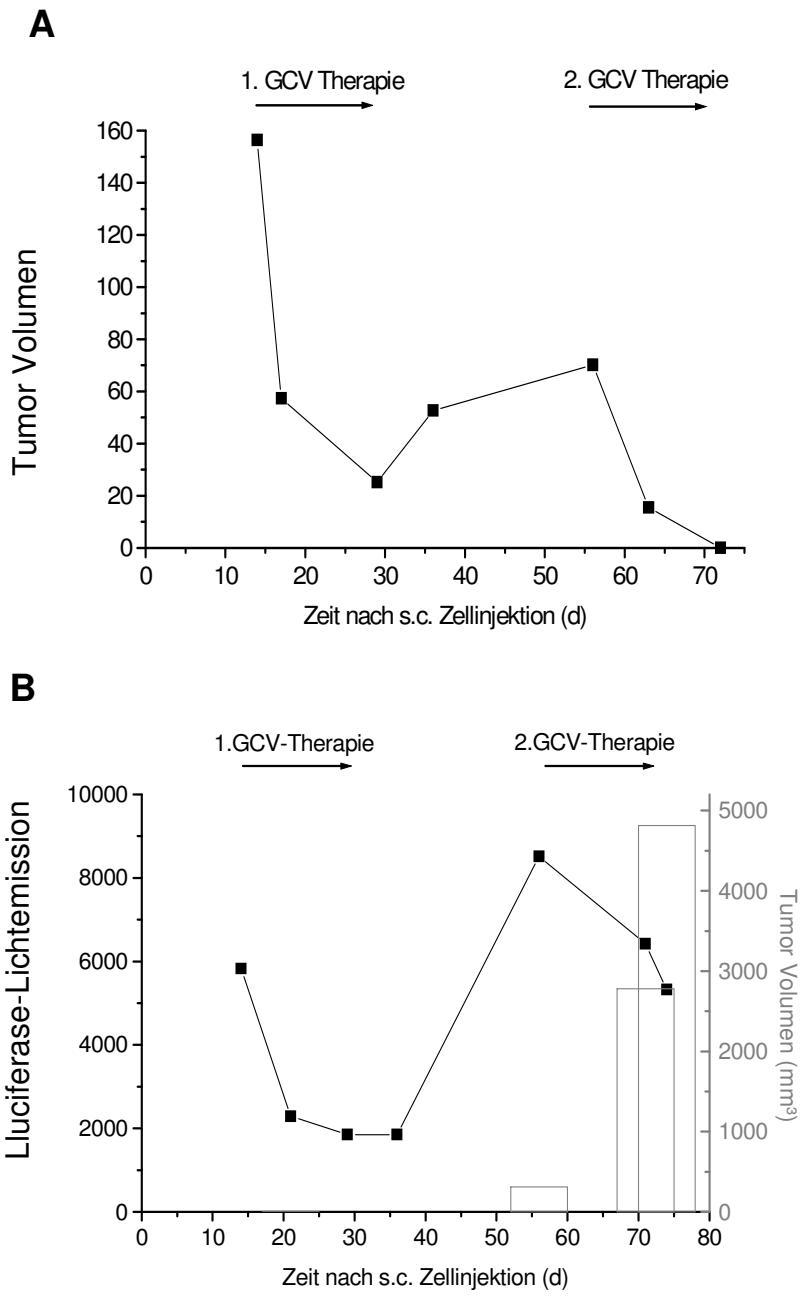


Abb. 29
(A) Tumorvolumina des HSV-Tk Tumors.
(B) Tumorvolumen und Lichtemission des HSV-Tk-Luc Tumors bei zweimalig durchgeführter 14-tägiger GCV-Therapie.

3.6.2.2 Histologische Ergebnisse – Maus 11

Die histologische Untersuchung des HSV-Tk-Luc Tumors (**Abb. 28** / **29B**) zeigt, sowohl in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch in immunhistochemischen Färbungen mit einem polyklonalen Luciferase-Antikörper, ausgedehnte nekrotische Areale im Tumorgewebe. Im Gegensatz zu vitalen Gewebeabschnitten, lässt sich in den Nekrosezonen Luciferase immunhistochemisch nicht nachweisen (**Abb. 30**).

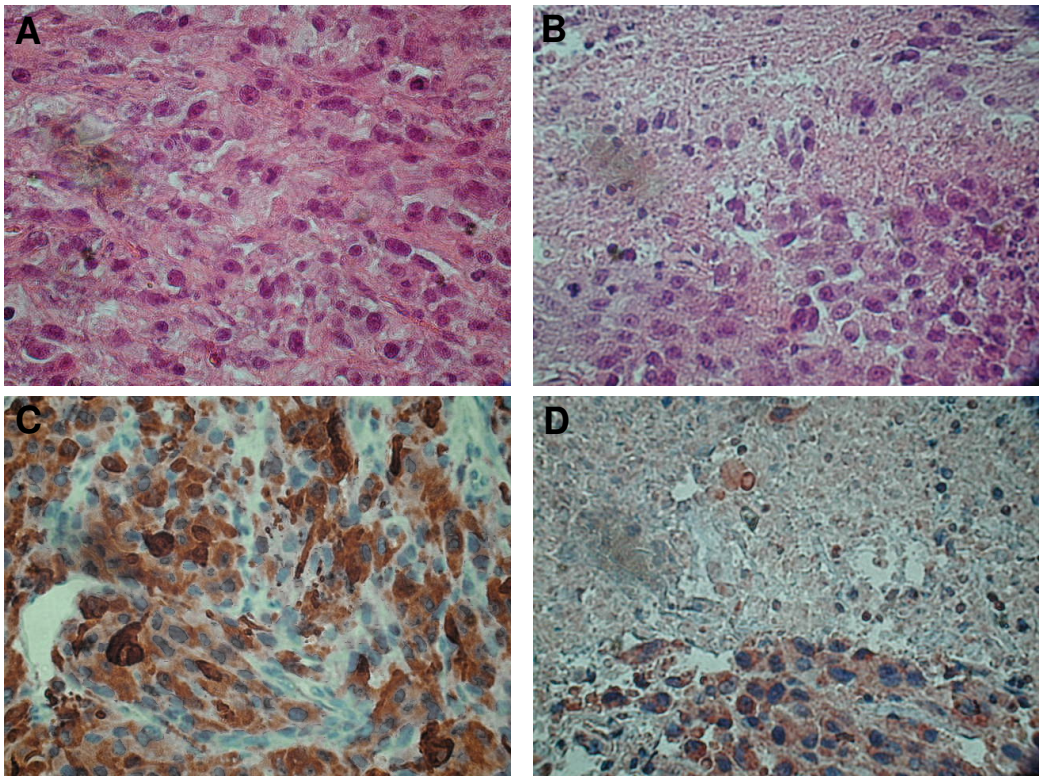


Abb. 30
Histologische Untersuchung von Gewebeschnitten eines HSV-Tk-Luc Tumors mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und immunhistochemischer Anfärbung (ICH) mit einem polyklonalen Anti-Luciferase-Antikörper.
(A) vitales Tumorgewebe (HE);
(B) nekrotische Gewebeanteile (HE);
(C) vitales Gewebe mit positiver IHC-Färbung;
(D) nekrotischer Gewebeanteil ohne positive immunhistochemische Anfärbung.

4 Diskussion

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Idee ist die optische Darstellung und Quantifizierung der Gentherapie mit dem Suizidgen / Prodrug-System (HSV-Tk / GCV) am Beispiel des Glioblastoma multiforme. Da die tierexperimentellen Erfolge dieser Therapieform [91,107,148] sich in klinischen Studien bei Gliompatienten nicht wiederfanden [55, 104,108,119], stellte sich die Frage nach dem Warum ? Ein wichtiges methodisches Problem scheint die sehr geringe Transfektionseffizienz zu sein [55], die in den wenigen ex vivo untersuchten Tumoren zwischen 0.002 % und 11 % lag [Übersicht 106].

Zur Optimierung der Gentherapie, z.B. durch die Entwicklung effizienterer Möglichkeiten des Gentransfers, ist neben der Beurteilung von Lokalisation und Stärke der Genexpression vor allem der zeitliche Verlauf dieses Prozesses von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit wird die Nutzung biolumineszenter Lichtemissionen als Technologie zur nichtinvasiven quantitativen und bildlichen Darstellung der Gentherapie in vitro und in vivo evaluiert. Dabei wird erstmals ein HSV-Tk-Luciferase-Fusionsprotein eingesetzt, welches in Verbindung mit GCV- bzw. Luciferin Gliome vollständig zerstören kann und gleichzeitig als Reporter für die nichtinvasive Darstellung und Quantifizierung der Gentherapie dient.

4.1 Darstellung der HSV-Tk - Aktivität mittels eines biolumineszenten Reportergens

Das Prinzip der nichtinvasiven Darstellung der Gentherapie mittels Biolumineszenz beruht auf der Kombination des therapeutischen Gens (HSV-TK Gen) mit dem Reportergen (Luc Gen). Dabei ist eine indirekte Darstellung des therapeutischen Genprodukts (HSV-Tk) durch das leicht detektierbaren Reportergenprodukt (Luc) möglich.

Um eine stoichiometrische Koexpression äquimolarer Mengen von Transgen und Reporter zu gewährleisten [40,123], verwendete ich in meiner Arbeit eine Genfusion der entsprechenden cDNAs unter der Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors, da die getrennte Koexpression von Genen auf einem Vektors die Gefahr einer durch vielfältige Mechanismen gestörten Genexpression birgt. Mizuguchi et al. [90] untersuchten die Expression zweier Gene, die in einem viralen Vektor über eine IRES miteinander verbunden wurden. Dabei erreichte die Expression des zweiten Gens (nach der IRES), sowohl in vitro als auch in vivo, nur 20-50 % der Expression des ersten Gens (vor der IRES). Ähnliche Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Sun et al. [127] beschrieben. Dementsprechend wird bei der Positionierung im Vektor immer zum Nachteil eines der beiden Gene entschieden: Zytotoxizität oder Biolumineszenz ?

De et al. [22] untersuchten N2a Neuroblastomzellen, die stabil HSV-Tk und Luc –verbunden über eine IRES- exprimierten. Nach s.c. Implantation in Mäuse, stellten sie eine korrelierte Expression beider Enzyme von r^2=0,86 fest. Genaue Angaben zur Aktivität der beiden Enzyme bzw. dem möglichen Aktivitätsverlust eines Enzyms wurden nicht gemacht. Des

Weiteren existieren mehrere Arbeiten [34,44,149,151], die das Phänomen der Promotor-Interferenz, also die gegenseitige Beeinflussung von verschiedenen Promotor – bzw. Enhancersequenzen eines Vektors und damit der Enzymaktivitäten, beschreiben.

4.2 Charakterisierung der HSV-Tk-Luc Fusion

4.2.1 Korrelation der Enzymaktivitäten

Zur Beurteilung der korrelierten Koexpression der Fusions-Partner innerhalb der HSV-Tk-Luc-Fusion, habe ich die für HSV-Tk, Luc und HSV-Tk-Luc kodierende cDNAs in vitro äquimolar in unterschiedlichen Mengen transient und stabil in U87MG-Zellen transfiziert und die entsprechenden Enzymaktivitäten miteinander verglichen. Die enge Korrelation der Enzymaktivitäten bei transient mit der HSV-Tk-Luc Fusion transfizierten U87MG-Zellen von r^2=0,98 ($p<0,001$) ist die Grundvoraussetzung für die Verwendung der Luciferase als Reporter für den zytotoxischen Effekt des HSV-Tk/GCV-Systems [40].

Bei stabil HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG-Zellklonen zeigte der Klon mit der höchsten zytotoxischen und höchsten Luciferaseaktivität zwischen photometrisch bestimmter Lichtemission und Zellzahl eine sehr gute Korrelation über mindestens 5 Größenordnungen (r^2=0,99; $p<0,001$). Bei der Aktivitätsbestimmung der Luciferase durch das CCD-Kamera-System, zum Beispiel während eines MTT-Zytoxizitätstests, konnte ich eine Korrelation der Enzymaktivitäten dieses U87MG-HSV-Tk-Luc-Zellklons von r^2=0,94 (p=0,029) nachweisen.

Auch Ray et al. [110] konnten für ihre Fusion aus HSV1-sr39tk und R-Luc in stabil transfizierten N2a-Zellen, eine Korrelation der Enzymaktivitäten in vitro von r^2=0,91 (N=4) aufzeigen. Verwendet wurde allerdings die für das PET-Imaging optimierte HSV-Tk (HSV1-sr39tk) und die Renilla-Luciferase (R-Luc), Enzyme die sich von den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen strukturell unterscheiden. Des Weiteren erfolgte die Aktivitäts-bestimmung der HSV-Tk mittels microPET und nicht mittels MTT-Zytotoxizitätstest, was die direkte Vergleichbarkeit mit meinen Daten einschränkt.

4.2.2 Mögliche Limitationen für den Einsatz der HSV-Tk-Luc Genfusion

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen einen deutlichen Funktionsverlust des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen. Die HSV-Thymidinkinase-Aktivität des Fusionsproteins war bei transient transfizierten U87MG-Zellen um 40% und bei stabil transfizierten Zellen um 16%, im Vergleich zur nukleär lokalisierten HSV-Tk, erniedrigt. Die Luciferase-Aktivität der Fusion war bei transienter Transfektion um 86% und bei stabiler Transfektion um 55% reduziert.

Die Frage, ob die intrazelluläre Lokalisation der HSV-Tk Einfluß auf deren Aktivität ausübt, wird in der Literatur vielfach diskutiert. Das Protein HSV-Tk ist als Homodimer vorwiegend im Zellkern lokalisiert, wobei der nukleäre Transport des Proteins durch mehrere nukleäre

Zielsequenzen (NLS) initiiert wird. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der räumlichen Konfiguration des Moleküls und diesen nukleären Zielsequenzen [26,28,58,72]. Hierbei ist z.B. die so genannte K317-R318 Region des Enzyms essentiell an der Dimer-Bildung des Moleküls beteiligt. Die Arbeitsgruppe um Degrève et al. [28] propagiert sogar, dass die HSV-Tk nur als Dimer in den Zellkern transportiert werden kann, da nur in dieser Konfiguration alle nukleären Zielsequenzen einwandfrei identifiziert werden können.
Der festgestellte Funktionsverlust der HSV-Tk-Luc Fusion könnte also einerseits auf sterischen Behinderungen beruhen und/oder auf der von uns immunhistochemisch nachgewiesenen prädominanten zytosolischen Lokalisation des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins (Abb. 30, S. 48).
Auch Ray et al. [110] berichten von einer um 80 % reduzierten HSV-Tk Aktivität nach Fusion des Enzyms an Renilla-Luciferase. Nach transienter Transfektion verschiedener Zelllinien (HEK293, N2a, C6) konnte das Fusionsprotein sowohl mittels BLI als auch mittel PET (HSV-Tk als Reporter) nachgewiesen werde, die zytotoxische Aktivität der HSV-Tk wurde jedoch nicht untersucht. Die R-Luc zeigte innerhalb des Fusionsproteins eine 6-8 x höher Aktivität im Vergleich zur unfusionierten R-Luc, wobei R-Luc deutlich kleiner ist als die in meiner Arbeit verwendete Luciferase (36 kDa versus 62 kDa) und mit dieser strukturell nicht verwandt ist. Bemerkenswert sind allerdings die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe mit variablen Linkersequenzen (Verbindungssequenz) zwischen den Fusionspartnern. Hierbei ergab sich eine ansteigende HSV-Tk Aktivität mit ansteigender Länge der Verbindungssequenz. Die Tk-R-Luc Fusion mit der längsten Linker-Sequenz erreichte die höchste Thymidinkinase-Aktivität von ca. 45% im Vergleich zur unfusionierten HSV-Tk. Im Hinblick auf meine Daten scheinen die verminderten Enzymaktivitäten des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins also vor allem auf einer Konformationsänderung der Enzyme zu beruhen. Trotzdem konnte ich zeigen, dass für die bioluminezente Darstellung der Suizidgentherapie eine ausreichende Aktivität der HSV-Tk und der Luciferase erhalten bleibt. Durch eine längere Linkersequenzen bzw. die Einführung flexibler Polyglycinlinker und damit einer größeren Freiheit in der Konformationsbildung könnte möglicherweise eine Steigerung der Enzymaktivitäten bewirkt werden [110].
Neuere Arbeiten berichten sogar über die Konstruktion von Fusionen mir drei Fusionspartnern, als so genannte „Dreifach-Fusions-Proteine“ bezeichnet [103,111]. Ray et al. [111] bestimmten die Enzym- bzw. Fluoreszenz-Aktivitäten verschiedener Dreifach-Fusionen nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen. Diese Fusionen beinhalteten R-Luc oder F-Luc, fluoreszierende Proteine und HSV-sr39tk, wobei die zytotoxische, also therapeutische Aktivität des HSV-Tk-Anteils nicht evaluiert wurde. Die Luciferase-Aktivität der F-Luc enthaltenen Konstrukte zeigte einen Aktivitätsverlust zwischen 22-63% im Vergleich zur unfusionierten Luciferase. Bezüglich der Tk-Aktivität erreichte eine Fusion (Luc-mRFP-

sr39tk) die volle Enzymaktivität, während bei den anderen Fusionen eine 30-61% Reduktion im Vergleich zur unfusionierten Tk auftrat. Limitierend für den Vergleich mit meiner Arbeit sind die Orientierung der Fusionspartner, die Verwendung einer PET-optimierten HSV-sr39tk und deren Aktivitätsbestimmung mittels intrazellulärer Tracer-Akkumulation (PET). Die Gruppe um Ponomarev et al. [103] präsentierte keine Ergebnisse zur korrelierten Expression oder zu den Enzymaktivitäten im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen, konnten jedoch mit ihrer HSV-Tk-EGFP-Luc Fusion bestätigen, dass auch die N-terminal fusionierte Luciferase suffizient für in vivo Biolumineszenz bleibt.
In vielen genannten Arbeiten wird die Renilla Luciferase verwendet, es gibt jedoch laut Söling et al. [123] verschiedene Faktoren die für eine Verwendung der F-Luc als Reporter sprechen: (1) die Lichtemission der R-Luc bei 480 nm (F-Luc λ_{max}=562 nm) limitiert die Gewebepenetration, (2) das benötigte Substrat Coelenterazin zeigt eine ausgeprägte Autolumineszenz und damit eine höhere Hintergrundaktivität bei i.p. Applikation [139], (3) Coelenterazin wird über ein sog. MDR1 P-Glycoprotein transportiert, welches in Tumorgewebe überexprimiert sein kann und somit bei unklarem Pgp-Status die Versuchs-Ergebnisse beeinflusst [101], (4) Coelenterazin ist wesentlich kostenintensiver als das Substrat der F-Luc (D-Luciferin).

Eine auch in meiner Arbeit aufgezeigte Alternative zur Genfusion, die transiente Kotransfektion von Zellen mit 2 separaten Transgenkassetten (Vektoren), zeigt fast identische Aktivitäten der Enzyme. Die HSV-Tk erreichte 84% und die Luciferase 82 % der Enzymaktivität im Vergleich zur jeweils alleinigen Transfektion (Korrelation d. Enzym-aktivitäten r^2=0,94; p<0,007). Bei Etablierung dieses Modells zur optischen Darstellung in vivo beschreiben Iyer et al. [66] nach simultaner i.v. Applikation von HSV-Tk und Luc auf getrennten Plasmiden (CD-1 Mäuse) jedoch eine Differenz der Aktivitäts-Maxima beider Enzyme von über 19 Stunden, entsprechend der unterschiedlichen Halbwertszeiten der Enzyme. Diese Ergebnisse unterstützen eher die Verwendung eines Fusionsproteins, bestehend aus Reporter und therapeutischem Gen, zur Stabilisierung der unterschiedlichen Proteineigenschaften.

4.3 Sensitivität der bioluminezenten Bildgebung

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten CCD-Kamera-System konnten in vitro, bei stabiler Expression der HSV-Tk-Luc Fusion, 500 U87MG Zellen detektiert werden. Bei stabiler Expression der unfusionierten Luciferase war es möglich, nur 125 U87MG Zellen zu registrieren, wobei bei diesen Zellklonen bereits luminometrisch eine 2,5 fach höhere Luciferase-Aktivität (in Zelllysaten) bestimmt werden konnte. Die gemessenen Licht-emissionen korrelierten zur Anzahl der eingesetzten U87MG-HSV-Tk-Luc- bzw. U87MG-Luc

Zellen mit r^2=0,96-0,98. In vivo verwendeten wir zur Testung der Sensitivität T98MG- Zellen, die Luciferase stabil exprimierten, da stabil Luciferase exprimierenden U87MG-Zellklone in vivo nicht etabliert werden konnten. Am Tag nach der Zellinjektion waren minimal $1x10^3$ T98MG-Luc Zellen nachweisbar (Abb. 24A, S, 42), nach 11 Tagen konnte auch im Bereich der $1x10^2$ injizierten Zellen ein Signal detektiert werden. Am Beispiel des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins, welches stabil in U87MG-Zellen exprimiert wurde, konnten in vivo BLI-Signale von $2x10^4$ Zellen aufgezeichnet werden.

Sweeney et al. [128] erreichten in vitro mit stabil Luciferase exprimierenden HeLa-Zellen eine untere Nachweisgrenze von 31 Zellen. Szentirmai et al. [129] arbeiteten, analog zu meiner Arbeit, mit stabil Luciferase exprimierenden U87MG Zellen. In vitro konnte die Arbeitsgruppe minimal 40 U87MG-Luc Zellen detektieren und bestätigt damit die hohe Sensitivität der biolumineszenten Bildgebung. Nach intracerebraler Implantation von $1x10^5$ U87MG-Luc Zellen war bereits am nächsten Tag eine suffiziente Registrierung der BLI-Signale möglich. Wohingegen Honigman et al. [60] nach subkutaner Implantation von $1,5x10^7$ HepG2-Zellen (Leberkarzinom) in Nacktmäusen erst nach 9 Tagen ein BLI-Signal detektieren konnte.

Diese Daten sind mit meinen Ergebnissen gut vereinbar und demonstrieren den großen Einfluß der Luciferase-Aktivität der eingesetzten Zellen auf die Sensitivität der biolumineszenten Bildgebung und die zur Zeit noch deutlich qualitativen Unterschiede der eingesetzten Detektionssysteme.

4.4 Quantifizierung der biolumineszenten Lichtemission

Bei der biolumineszenten Lichtemission werden zur Quantifizierung der Signale zwei unterschiedliche Strategien eingesetzt: (1) die Registrierung der maximalen Lichtemission (Maxima) oder (2) die Regsitrierung von integrierten Lichteinheiten (ILE) über einer ausgewählten Fläche (ROI = region of interest).

In meinen in vivo Experimenten bestanden zwischen Tumorvolumen und biolumineszenter Lichtemission innerhalb der ROI Korrelationen von r^2=0,90 (p=0,05) bis 0,99 (p=0,011), wobei abnehmende Korrelationen bei besonders großen Tumoren zu verzeichnen waren. Bei der in Abb. 25B (Seite 43) dargestellten Kontrollmaus zeigte sich bei dem größten Tumor (rechts oben) bis Tag 35 eine Korrelation zwischen Biolumineszenz-Signal innerhalb der ROI und Tumorvolumen von r^2=0,90 (p=0,05). Registriert man hingegen die maximale Lichtemission (Maxima) versus Tumorvolumen fällt die Korrelation auf r^2=0,37 (p=0,4).

Einige Autoren wie Wu et al. [150] sehen trotzdem in der maximalen Lichtemissionen einen zuverlässigen Parameter zur Quantifizierung der BLI-Signale. Ausgehend von subkutanen Tumoren im Mausmodell, zeigte sich jedoch auch hier bei Tumoren über 1 cm Durchmesser eine abnehmende Korrelation zwischen maximaler Lichtemission und Tumorgröße. Andere Arbeitsgruppen [31,32,98,138] beschreiben, analog zu meinen Ergebnissen, eine gute Korrelation

zwischen der Lichtemission innerhalb einer ROI und Tumorgröße bzw. Tumorgewicht von r^2=0,99, wobei ebenfalls ein deutlicher Abfall der Korrelation (bis r^2=0,74) bei zunehmender Tumorgröße auftrat. In größeren Tumoren ist durch Nekrosen, intratumorale Einblutungen oder Ödemzonen eine verringerte Lichtemissionen infolge erhöhter Streuung und Absorption, reduzierter Sauerstoff- und Luciferin-Versorgung anzunehmen [123]. Ich konnte an explantierten Tumoren zeigen, dass hämorrhagische und nekrotische Tumoranteile eine deutlich geringere Lichtemission aufweisen als vitales Tumorgewebe (Abb. 28, Seite 46). Eine verringerte Expression der Luciferase in diesen Arealen konnte immunhistochemisch dargestellt werden (Abb. 30, Seite 48).

Zusammenfassend scheint die Veränderungen der Tumorgröße bzw. der Zellvitalität besser durch die Lichteinheiten der gesamten Tumorfläche als durch einen einzelnen Maximalwert reflektiert zu werden.

4.5 Darstellung der Gentherapie mit der HSV-Tk-Luc Fusion im Mausmodell

Mit dem bereits in vitro charakterisierten U87MG-Zellklon, der stabil HSV-Tk-Luc exprimierte, führten wir Xenograftexperimente an Nacktmäusen durch. Pro Maus wurden im Bereich des Rückens 4 Tumore aus $2x10^6$ U87MG-HSV-Tk-Luc Zellen gesetzt. Ab einem Tumorvolumen von ca. 125 mm^3 wurde eine 14-täge GCV-Therapie durchgeführt (n=7 Tiere). Nicht behandelte Tiere (n=3) erhielten für diesen Zeitraum NaCl 0,9 %ig.

Die Korrelation zwischen den seriellen simulatanen Detektion der biolumineszenten Signale (CCD-Kamera) und der vermessenen Tumorgröße (Schiebelehre) betrug r^2=0,93 (p=0,08).

Im Gegensatz zur den in vitro Zytotoxizitätstests konnte bei der Anwendung der HSV-Tk-Luc Fusion in vivo durch die 14tägiger GCV-Therapie eine vollständige Regression der subkutanen Tumoren erreicht werden. Ein erneutes Tumorwachstum trat bis Tag 90 nicht auf. Ein wichtiger Mechanismus hierfür könnte das Immunsystem der Versuchstiere darstellen, beispielsweise im Sinne einer antitumoralen Immunreaktion. Verschiedene Arbeitsgruppen [5,53,136] berichteten von solchen Immunreaktionen, die von HSV-Tk exprimierenden Tumorzellen in immunsupprimierten Versuchstieren ausgelöst werden können. Dabei handelt es sich meistens um natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die im Rahmen des GCV vermittelten Zelluntergangs aktiviert werden. Es ist möglich, dass solch eine Immunreaktion zu der vollständigen Regression der HSV-Tk-Luc Tumore in vivo beigetragen hat.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass durch den Einsatz eines HSV-Tk-Luc Fusionsproteins eine erfolgreiche Gentherapie maligner Gliome möglich ist und das die Effektivität dieser Therapie durch die biolumineszente Bildgebung seriell, nichtinvasiv und quantitativ sowohl in vitro als auch in vivo dargestellt werden kann.

Bei Maus 11 zeigte ein HSV-Tk-Luc-Tumor durch die 14-tägige GCV-Therapie einen deutlichen Abfall der Lichtemission (auf 30% des Ausgangswertes). In den nachfolgenden 4 Wochen kam es erneut zu einer Größenprogression und Zunahme der Photonenemission. Ab einem Tumorvolumen von über 300 mm^3, konnte die Zunahme der Tumorgröße durch einen zweiten Therapieversuch mit GCV (14 Tage), bei einer Reduktion der biolumineszenten Lichtsignale, nicht mehr aufgehalten werden. Nach Explantation des Tumors und der histologischen Untersuchungen zeigte sich eine stark ausgeprägte Nekrose. Mendel et al. [88] berichten bei der Therapie s.c. implantierter Prostata-Tumore mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor, dass das initiale Tumorvolumen vor Therapie 100 mm^3 nicht überschreiten sollte. Die Arbeitsgruppe erreichte bei Volumina von 200-300 mm^3 ein verlangsamtes Tumorwachstum, jedoch keine vollständige Tumorregression. Angenommen wurde eine reduzierte Substratversorgung innerhalb großer Tumoren, was auch für mein Experiment (Maus 11) in Form einer reduzierten Sauerstoff- und Luciferinversorgung zutreffend sein könnte.

5 Schlußfolgerung und Ausblick

Die Verwendung biolumineszenter Bildgebung ist eine wertvolle Technologie zur nicht-invasiven quantitativen Darstellung des zytotoxischen Effekts einer Gentherapie [108,109]. Aufgrund der limitierten Gewebegängigkeit der Lichtsignale durch Absorption und Streuung [56] und der fehlenden apparativen Möglichkeiten ist der Einsatz dieses Verfahrens in größeren Versuchstieren oder Menschen derzeit noch nicht möglich. Wichtige Aufgaben sind deshalb die Optimierung biolumineszenter Enzyme/Substrate und die Entwicklung effizienterer Detektions-Systeme, beispielsweise in Form rotierender CCD-Kameras [123] zur Erzeugung dreidimensionaler Bilder und Erhöhung des räumlichen Auflösungsvermögens. Aufgrund der hohen Sensitivität der Biolumineszenz können bereits kleine Tumoren in vivo detektiert werden, die durch das bloße Auge (bei s.c. Tumoren) oder durch andere Bildgebungsverfahren nicht erkannt werden können [143]. Auch die Abhängigkeit der biolumineszenten Reaktion vom intrazellulären Energiehaushalt (ATP), ist ein zuverlässiger Garant der Detektion von metabolisch aktiven lebenden Zellen und ermöglicht die Beurteilung der Effektivität therapeutischer Strategien. Dieses Verfahren ist besonders für orthotope Tumore (z.B. intracerebrale Tumore) geeignet, die für die Vermessung mit der Schiebelehre nicht zugänglich sind.

Der Erfolg der Suizidgentherapie mit dem HSV-Tk/GCV-System in vivo wird zukünftig zu einem nicht geringen Teil von der Weiterentwicklung effizienterer Transfermethoden abhängen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die nichtinvasive quantitative Darstellung der HSV-Tk-Expression mittels des biolumineszenten Reportergens Luciferase in vitro und in vivo möglich ist. Das hierzu eingesetzte HSV-Tk-Fusionskonstrukt ermöglichte eine

äquimolare Koexpression der Fusionspartner. Dies wurde in vitro u.a. über die korrelierten Enzymaktivitäten bei transienten Transfektionen mit r^2=0,98 (p<0,001) und in vivo über die zur Photonenemission korrelierte zytotoxische Wirkung der HSV-Tk als Äquivalent zur abnehmenden Tumorgröße mit r^2=0,93 (p=0,008) verifiziert. Damit wurde erstmals im Mausmodell durch den Einsatz einer Genfusion die vollständige Regredienz subkutaner Gliome mittels Biolumineszenz dargestellt.

6 Zusammenfassung

Das Ziel meiner Arbeit war die Etablierung eines Modells zur nichtinvasiven Darstellung der Gentherapie mit dem Suizidgen / Prodrug-System (HSV-Tk / GCV) mittels Biolumineszenz in humanen Gliomzellen. Hierzu wurde eine Genfusion aus der HSV-Thymidinkinase und Luciferase eingesetzt. Beim *transient* exprimierten HSV-Tk-Luc Fusionsprotein zeigte sich eine HSV-Tk-Aktivität von 60% und eine Luciferaseaktivität von 14,4% im Vergleich zu den Aktivitäten der unfusionierten Enzyme. Eine im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen reduzierte Aktivität zeigte sich auch bei *stabiler* Transfektion von U87MG-Gliomzellen mit dem HSV-Tk-Luc Fusionskonstrukt (für den aktivsten U87MG-Zellklon: HSV-Tk 84,3% / Luc 45,5%). Trotz dieser verringerten Aktivitäten des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins gelang uns erstmals die nichtinvasive biolumineszente Darstellung einer erfolgreichen Suizidgen-therapie mit dem HSV-Tk / GCV-System bei humanen Gliomen sowohl in vitro als auch in vivo.

In intakten Gliomzellen (in vitro Experimente) konnten minimal 500 U87MG Zellen, die stabil das Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc exprimierten, detektiert werden. Dabei zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen der Photonenemission und der Anzahl der HSV-Tk-Luc exprimierenden Zellen (r^2 = 0.96, p < 0.0001). Bei stabil P.pyralis Luciferase exprimierenden U87MG Gliomzellen konnten minimal 125 Zellen detektiert werden. Bei stabil das Fusionskonstrukt HSV-Tk-Luc exprimierenden U87MG Zellen zeigte sich nach 96 h Inkubation mit GCV eine Korrelation von r^2 = 0.94 (p=0.029) zwischen Biolumineszenz-Signal (Photonenemission) und zytotoxischer HSV-Tk Aktivität.

Für die in vivo Experimente wurden Nacktmäusen vier subkutane humane U87MG-Gliome gesetzt, die das Fusionsprotein HSV-Tk-Luc stabil exprimierten. Bei Erreichen eines Tumor-Durchmessers von ca. 5 mm wurde eine 14-tägige GCV-Therapie (i.p.) durchgeführt. Während der GCV-Therapie zeigte sich bei den therapierten Mäusen ein mittlerer Abfall der Lichtemission von 92 ±7% bei gleichzeitiger Verringerung des Tumorvolumens von im Mittel 65±19%. Alle GCV-behandelten Mäuse überlebten; Tumorrezidive traten bis Tag 90 (Ende der Studie) nicht auf. Bei den behandelnden Mäusen betrug die Korrelation zwischen Tumorvolumen und Lichtemission r^2 = 0,93 (p = 0.008), bei den 3 Kontrolltiere zeigte sich eine Korrelation von r^2 = 0,98 (p = 0.010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein HSV-Tk-Luc Fusionsproteins als Reporter für die Gentherapie maligner Gliome ein hilfreiches Instrument zur Optimierung einer Suizidgentherapie mit der HSV-Tk darstellen könnte.

7 Literaturverzeichnis

[1] Adachi N, Könü DL, Frei K, Roth P, Yonekawa Y : **The HSV-TK/GCV gene therapy for brain tumors.** Gene Ther Mol Biol 4 (1999) 249-260

[2] Andreotti PE : **Luminescence applications for chemotherapeutic drug development.** Recent Results Cancer Res 161 (2003) 3-12

[3] Ashida H, Yamamoto K, Kumagai H : **Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endoalpha-N-acetylgalactosaminidase.** Biosci Biotechnol Biochem 64(10) (2000) 2266-2258

[4] Benaron DA, Contag PR, Contag CH : **Imaging brain structure and function, infection and gene expression in the body using light.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 352 (1997) 755-761

[5] Bi W, Kim YG, Feliciano ES, Pavelic L, Wilson KM, Pavelic ZP, Stambrook PJ: **An HSVtk-mediated local and distant antitumor bystander effect in tumors of head and neck origin in athymic mice.** Cancer Gene Ther 4 (1997) 246-252

[6] Birke C et al. : **Mycoplasma contamination in human tumor cell lines : effect on interferon induction and susceptibility to natural killing.** J Immunol 127 (1981) 94-98

[7] Bradford MM : **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding.** Analyt Biochem, 72 (1976), 248-254

[8] Breakefield XO: **Gene delivery in the brain using virus vectors.** Nat Genet 3 (1993) 187-189

[9] Brown DG, Vise R, Sandhu G, Davies A, Rizkallah PJ, Melitz C, Summers WC, Sanderson MR : **Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type-1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir.** Nat Struct Biol 2 (1995) 876–881

[10] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC : **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** Science 263 (1994) 802-805

[11] Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA, Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER : **Patterns of care for adult with newly diagnosed malignant glioma.** JAMA 293(5) 2005 557-564

[12] Chen, CY. Chang, YN, Ryan, P, Linscott, M, McGarrity, GJ, Chiang, YL : **Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the "bystander effect".** Hum Gene Ther 6 (1995) 1467-76

[13] Commack BP, Valdivia RH, Falkow S : **FACS – optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).** Gene 173 (1996) 33-38

[14] Contag CH, Contag PR, Mullins JI, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA: **Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts.** Mol Microbiol 18 (1995) 593-603

[15] Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennery P, Stevenson DK, Benaron DA : **Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter.** Photochem Photobiol 66 (1997) 523-531

[16] Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH : **Bioluminescent indicators in living mammals.** Nat Med 4 (1998) 245-247

[17] Craig FF, Simmonds AC, Watmore D, McCapra F, White MR: **Membrane-permeable luciferin esters for assay of firefly luciferase in live intact cells.** Biochem J 276 (1991) 637-641

[18] Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM: **In vivo gene transfer with retroviral vectorproducer cells for treatment of experimental brain tumors.** Science 256 (1992) 1550–1552

[19] Culver KW, van Gilder J, Link CJ, Carlstrom T, Buroker T, Yuh W, Koch K, Schabold K, Doornbas S, Wetjen B et al. : **Clinical Protocol: Gene therape for the treatment of malignant brain tumors with in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system.** Hum Gene Ther 5(3) (1994) 343-379

[20] DAKO (Fa.) : **Leitfaden zur Antigendemaskierung in formalin-fixierten paraffineingebetteten Geweben.** 2. Auflage (1989)

[21] DAKO (Fa.) : **Handbuch II immunchemische Färbemethoden.** (1989)

[22] De A, Lewis XZ, Gambhir SS : **Noninvasives imaging of lentiviral-mediated reporter gene expression in living mice.** Mol Ther 7 (2003) 681-691

[23] De Angelis L : **Brain Tumors.** New England Journal of Medicine 344 (2001) 114-123

[24] De Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M : **Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli.** Proc Natl Acad Sci USA 82 (1985) 7870-7873

[25] De Wet JR, Wood K, DeLuca M, Helinski D, Subramani S : **Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells.** Mol Cell Biol 7 (1987) 725-737

[26] Degrève B, Johansson M, De Clercq E, Karlsson A, Balzarini J : **Differentail intracellular compartimentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells : molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK.** J Virol 72(12) (1998) 9535-9543

[27] Degrève B, De Clercq E, Balzarini J : **Bystander effect of purine nucleoside analogues in HSV-1 tk suicide gene therapy is superior to that of pyrimidine nucleoside analogues.** Gene Ther 6(2) (1999) 162-170

[28] Degrève B, Esnouf R, De Clercq E, Balzarini J : **Characterisation of multiple nuclear localization signals in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase.** Biophys Res Commun 264(2) (1999) 338-342

[29] Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH: **Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models.** Neoplasia 1 (1999) 303-310

[30] Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, Negrin RS, Contag CH : **Advancing animal models of neoplasia throught in vivo bioluminescence imaging.** Eur J Cancer 38 (2002) 2128-2136

[31] Edinger M, Cao Y, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS : **Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging.** Blood 101 (2003) 640-648

[32] EL Hilali N, Rubio N, Martinez-Villacampa M, Blanco J : **Combined noninvasive imaging and luminometric quantification of luciferase – labeled human prostate tumors and metastases.** Lab Invest 82 (2002) 1563-1571

[33] Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ : **Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-guanine.** Proc Natl Acad Sci USA 74 (1977) 5716-5720

[34] Emerman M, Temin HM : **Comparison of promotor suppression in avian and murine retrovirus vectors.** Nuclei Acids Res 14(23) (1986) 9381-9396

[35] Frank W, Ristow H, Schwalb S : **Untersuchungen zur wachstumsstimulierenden Wirkung von Kälberserum auf Kulturen embryonaler Rattenzellen.** Exp Cell Res 70 (1972) 390-396

[36] Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN: **The 'bystander effect': tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified.** Cancer Res 53 (1993) 5274–5283

[37] Freeman SM, Whartenby JL, Abboud CN, Marrogi AJ : **In situ use of suicide genes for cancer therapy.** Seminars in Oncology 23(1) (1996) 31-45

[38] Gambhir SS, Barrio JR, Wu L, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, Parrish C, McLaren DC, Borghei AR, Bauer E, Green LA, Sharfstein S, Berk AJ, Cherry SR, Phelps ME, Hershman HR : **Imaging of adenoviral directed herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir.** J Nucl Med 39 (1998) 2003-2011

[39] Gambhir SS, Barrio JR, Phelps ME, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, Wu L, Green LA, Bauer E, MacLaren DC, Nguyen K, Berk AJ, Cherry SR, Herschmann HR : **Imaging adenoviral directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography.** Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 2333-2338

[40] Gambhir SS, Herschmann HR, Cherry SR, Barrio JR, Satyamurthy N, Toyokuni T, Phelps ME, Larson SM, Balatoni J, Finn R, Sadelain M, Tjuvajev J, Blasberg R : **Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies.** Neoplasia 2 (2000) 118-138

[41] Gambhir SS, Bauer E, Black ME, Liang Q, Kokoris MS, Barrio JR, Iyer M, Namavari M, Phelps ME, Herschmann HR : **A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomographie.** Proc Natl Acad Sci USA 97 (2000) 2785-2790

[42] Gambhir SS : **Molecular imaging of cancer with positron emission tomography.** Nature Rev Cancer 2 (2002) 683-693

[43] Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V et al.: **Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope.** Gene Ther 7 (2000) 2036-2040.

[44] Ginn SL, Fleming J, Rowe PB, Alexander IE: **Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence**

detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. Hum Gene Ther 14(12) (2003) 1127-1137

[45] Golden J, Ligler F : **A comparison of imaging methods for use in an array biosensor.** Biosens Bioelectron 17 (2002) 719

[46] Gould SG, Keller GA, Subramani S: **Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase.** J Cell Biol 105 (1987) 2923-2931

[47] Graf, Nicolas : **Untersuchungen zu Mechanismen der Triomzell-induzierten Tumorabstoßung.** München, Univ., Med. Fak., Diss., 2003

[48] Green LM, Reade JL, Ware CF : **Rapid colometric assay for cell viabilty: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines.** J Immunol Methods 70 (1984) 257-268

[49] Grinnell F, Hays G, Minter D : **Cell adhesion and spreading factor: Partial purification and properties.** Exp Cell Res 110 (1977) 175-190

[50] Groskreutz DJ, Sherf BA, Wood KV, Schwenborn ET : **Increased expression and convenience with the new pGL3 luciferase reporter vectors.** Promega Notes Mag 50 (1995) 2-7

[51] Gross WO : **Die Optimalbedingungen zur Gefrierkonservierung mit Dimethylsulfoxid.** Ztschr Naturf 23 (1968) 512-519

[52] Haberkorn U, Altmann A, Morr I, Germann C, Oberdorfer F, van Kaick G : **Multi tracer studies during gene therapy of hepatoma cells with HSV thymidine kinase and ganciclovir.** J Nucl Med 38 (1997) 1048-1054

[53] Hall SJ, Sanford MA, Atkinson G, Chen SH: **Induction of potent antitumor natural killer cell activity by herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer.** Cancer Res 58 (1998) 3221-3225

[54] Harlow E, Lane D: **Using antibodies: a laboratory manual.** Cold Springer Harbor Laboratory Press, Cold Springer Harbor, NY (1999)

[55] Harsh GR, Deisboeck TS, Louis DN, Hilton J, Colvin M, Silver JS, Qureshi NH, Kracher J, Finkelstein D, Chiocca EA, Hochberg FH : **Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study.** J Neurosurg 92 (2000) 804-811

[56] Hastings JW : **Biological diversity, chemical mechanism and the evolutionary origins of bioluminescent systems.** J Mol Evol 19 (1983) 309-321

[57] Hastings JW : **Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review.** Gene 173 (1996) 5-11

[58] Hatzis P, Al-Madhoon AS, Jullig M, Petrakis TG, Eriksson S, Talianidis I : **The intracellular localization of deoxycytidine kinase.** J Biol Chem 273(46) (1998) 30239-43

[59] Himes SR, Shannon MF: **Assays for transcriptional activity based on the luciferase reporter gene.** Meth Mol Biol 130 (2000) 165-174

[60] Honigman A, Zeira E, Ohana P, Abramovitz R, Tavor E, Bar I, Zilberman Y, Rabinovsky R, Gazit D, Joseph A, Panet A, Shai E, Palmon A, Laster M, Galun E : **Imaging transgene expression in live animals.** Mol Ther 4 (2001) 239-249

[61] Hooper CE, Ansorge RE, Browne HM, Tomkins P: **CCD imaging of luciferase gene expression in single mammalian cells.** J Biolumin Chemilumin 5 (1990) 123-130

[62] Hsu SM, Raine L, Fanger H: **A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies.** Am J Clin Pathol, 75(5) (1981), 734-738

[63] Hsu SM, Raine L, Fanger H: **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** J Histochem Cytochem, 29(4) (1981), 577-580

[64] Inouye S, Shimomura O : **The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate.** Biochem Biophys Res Commun 233 (1997) 349-353

[65] Iyer M, Barrio JR, Namavari M, Bauer E, Satyamurthy N, Nguyen K, Toyokuni T, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS : **8-[F-18]-fluoropenciclovir: An improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET.** J Nucl Med 42 (2001) 96-105

[66] Iyer M, Berenji M, Templeton NS, Gambhir SS: **Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice.** Mol Ther 6 (2002) 555-562

[67] Jacobs A, Dubrovin M, Hewett J, Sena-Esteves M, Tan CW, Slack M, Sadelain M, Breakefield XO, Tjuvajev JG : **Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: implications for noninvasive imaging of transgene expression.** Neoplasia 1(2) (1999) 154–161

[68] Jacobs A, Voges J, Reszka R, Lercher M, Gossmann A, Kracht L, Kaestle C, Wagner R, Wienhard K, Heiss WD : **Positron-emission tomography of vector mediated gene expression in gene therapy of gliomas.** Lancet 358 (2001) 727-729

[69] Jacobs RE, Cherry SR : **Complementary emerging techniques: High-resolution PET and MRI.** Curr Opin Neurobiol 11 (2001) 621-629

[70] Jaiswal JK, Simon SM : **Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging.** Trends Cell Biol 14 (2004) 497-504

[71] Jakoby WB, Pastan ICH (Hrsg.): **Cell culture: Methods in Enzymology.** Academic Press 58, New York, USA 1979

[72] Johannsson M, Brismar S, Karlsson A: **Human deoxycytine kinase localized in the cell nucleus.** Proc Natl Acad Sci 94 (1997) 11941-11945

[73] Karatani H, Wilson T, Hastings JW : **A blue fluorescent protein from a yellow-emitting luminous bacterium.** Photochem Photobiol 55 (1992) 293-299

[74] Kramm CM, Sena-Esteves M, Barnett FH, Rainov NG, Schuback DE, Yu JS, Pechan PA, Paulus W, Chiocca EA, Breakfield XO : **Gene therapy for brain tumors.** Brain Pathol 5 (1995) 345-381

[75] Kruse CA, Roper MD, Kleinschmidt-DeMasters BK, Banuelos SJ, Smiley WR, Robbins JM, Burrows FJ : **Purified herpes simplex virus thymidine kinase retrovector^{TM} particles. I. In vitro characterization, in situ transduction efficiency and histopathological analysis of gene therapy-treated brain tumors.** Cancer Gene Ther 4 (1997) 118-128

[76] Lang K : **Mykoplasmen und Zellkulturen.** Biologie in unserer Zeit 15 (1985) 52-61

[77] Laxman B, Hall DE, Bhojani MS, Hamstra DA, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A : **Noninvasive real-time imaging of apoptosis.** Proc Natl Acad Sci USA 99(26) (2002) 16551-16555

[78] Liang Q, Gotts J, Satyamurthy N, Barrio J, Phelps ME, Gambhir SS, Herschman HR : **Noninvasive, repetitive, quantitative measurement of gene expression from a**

bicistronic message by positron emission tomography, following gene transfer with adenovirus. Mol Ther 6(1) (2002) 73–82

[79] Lindl T, Bauer J : **Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.** Spektrum, Heidelberg, 5.Aufl. (2002)

[80] Lipshutz GS, Flebbe-Rehwaldt L, Gaensler KM : **Reexpression following readministration of an adenoviral vector in adult mice after initial in utero adenoviral administration.** Mol Ther 2(4) (2000) 374-80

[81] Lipshutz GS, Gruber CA, Cao YA, Hardy J, Contag CH, Gaensler KM : **In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression.** Mol Ther 3 (2001) 284-292

[82] Long Z, Lu P, Grooms T, Mychkovsky I, Westley T, Fitzgerald T, Sharma-Chiber S, Shand N, McGarrity G, Otto E : **Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving in vivo retroviral gene therapy.** Human Gene Ther 10 (1999) 733-740

[83] Louie AY, Huber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ : **In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging.** Nat Biotechnol 18 (2000) 321-325

[84] Lyons RM, Forry-Schaudies S, Otto E, Wey C, Patil-Koota V, Kaloss M, McGarrity GJ, Chiang YL: **An improved retroviral vector encoding the herpes simplex virus thymidine kinase gene increases antitumor efficacy in vivo.** Cancer Gene Ther 2 (1995) 273–280

[85] Massoud TF, Gambhir SS : **Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light.** Genes Dev 17 (2002) 545-580

[86] McElroy WD, DeLuca M : **Firefly luminescence.** In: Chemie- und Bioluminescence. Burr JG (Ed), Dekker, New York (1985) S. 387-399

[87] McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J : **Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell culture: a review.** In vitro 20 (1985) 1-18

[88] Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM: **In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived**

growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationship. Clin Cancer Res 9 (2003) 327-337

[89] Metzing R : **Entwicklung eines Biolumineszenzverfahrens für den Nachweis von Nukleinsäuren.** Diss., Hamburg 1995, pp. 165

[90] Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T: **IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.** Mol Ther 1 (2000) 376-382

[91] Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzman G : **Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration.** Jpn J Cancer Res 89 (1998) 76-80

[92] Mosmann T : **Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay.** J Immunol Methods 65 (1983) 55-63

[93] Moolten FL : **Suicide genes for cancer therapy.** Sci Med 4 (1997) 16-25

[94] Mullen CA, Anderson L, Woods K, Nishino M, Petropoulos D : **Ganciclovir chemoablation of herpes thymidine kinase suicide gene-modified tumors produces tumor necrosis and induces systemic immune responses.** Hum Gene Ther 9(14) (1998) 2019-30

[95] Nagy HJ, Panis Y, Fabre M, Engelmann C, Soubrane O, Houssin D, Klatzmann D: **Efficient suicide gene therapy of transduced and distant untransduced ovary tumors is correlated with significant increase of intratumoral T and NK cells.** Biomed Pharmacother 54(10) (2000) 479-486

[96] Nie Z : **Fetuin: its enigmatic property of growth promotion.** Am J Physiol 263(3) (1992) 551-562

[97] Noll S, Schaub-Kuhnen S : **Praxis der Immunhistochemie.** Urban und Fischer, 1. Auflage (2000)

[98] Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS: **The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model.** Gene Ther 9 (2002) 844-849

[99] Osada H, Tokunaga T, Hatanaka H, Kawakami T, Tsuchida T, Abe Y, Tsugu A, Kijima H, Yamazaki H, Shima K, Osamura Y, Ueyama Y, Nakamura M : **Gene expression of angiogenesis related factors in glioma.** International of Oncology 18 (2001) 305-309

[100] Phair RD, Misteli T : **Kinetic modelling approaches to in vivo imaging.** Nat Rev Mol Cell Biol 2 (2001) 898-907

[101] Pichler, A, Prior JL, Piwnica-Worms D: **Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazine.** Proc Natl Acad Sci 101 (2004) 1702-1707

[102] Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC, Kay SA: **Quantitative analysis of Drosophila period gene transcription in living animals.** J Biol Rhythms 12 (1997) 204-217

[103] Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T, Ivanova A, Ageyeva L, Tourkova V, Balatoni J, Bornmann W, Blasberg R, Tjuvajev G: **A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging.** Eur J Nucl Med Mol Imaging (2004), E-pub ahead of print

[104] Rainov NG : **A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme.** Hum Gene Ther 11 (2000) 2389-2401

[105] Rainov NG, Kramm CM, Banning U, Riemann D, Holzhausen HJ, Heidecke V, Burger KJ, Burkert W, Korholz D : **Immune response induced by retrovirus-mediated HSV-tk/GCV pharmacogene therapy in patients with glioblastoma multiforme.** Gene Ther 7(21) (2000) 1853-8

[106] Rainov NG, Ren H : **Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy – what have we learned ?** J Neurooncol 65(3) (2003) 227-236

[107] Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH : **In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats.** Cancer Res 53 (1993) 83-88

[108] Ram Z, Culver KW, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH : **Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells.** Nat Med 3 (1997) 1354-1361

[109] Ray P, Bauer E, Iyer M, Barrio JR, Satyamurthy N, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS : **Monitoring gene therapy with reporter gene imaging.** Semin Nucl Med 31 (2001) 312-320

[110] Ray P, Wu AM, Gambhir SS: **Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice.** Cancer Res 63 (2003) 1160-1165

[111] Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS: **Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects.** Cancer Res 64 (2004) 1323-1330

[112] Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD : **Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging.** Neoplasia 2 (2000) 491−495

[113] Rehemtulla A, Hall DE, Stegman LD, Prasad U, Chen G, Bhojani MS, Chenevert TL, Ross BD : **Molecular imaging of gene expression and efficacy following adenoviral-mediated brain tumor gene therapy.** Mol Imag 1(1) (2002) 43-55

[114] Rosenthal MS, Cullom J, Hawkins W, Moore SC, Tsui BM, Yester M : **Quantitative SPECT imaging : a review and recommendations by the Focus Committee of the Society of Nuclear Medicine Computer and Instrumentation Council.** J Nucl Med 36(8) (1995) 1489-1513

[115] Ross BD, Chenevert TL, Rehemtulla A : **Magnetic resonance imaging in cancer research.** Eur J Cancer 38 (2002) 2147-2156

[116] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabel DNA polymerase.** Science 239 (1988) 487-491

[117] Sandmair AM, Turunen M, Tyynela K, Loimas S, Vainio P, Vanninen R, Vapalahti M, Bjerkvig R, Janne J, Yla-Herttuala S: **Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions.** Cancer Gene Ther 7 (2000) 413–421

[118] Sanson M, Marcaud V, Robin E, Valery C, Sturtz F, Zalc B : **Connexin 43 – mediated bystander effect in two rat glioma cell models.** Cancer Gene Ther 9(2) (2002) 149-155

[119] Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, Sorensen AG, Barbier N : **A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent**

glioblastoma multiforme by tumor transduction with herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI 328 European-Canadian study group. Human Gene Ther 10 (1999) 2325-2335

[120] Simpson, I, Rose, B, Loewenstein, WR : **Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels.** Science 195 (1977) 294-6

[121] So MK, Xu C, Loening AM, Gambhir SS, Rao J : **Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging.** Nat Biotechnol 24 (2006) 339-43

[122] Söling A, Simm A, Rainov NG : **Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag.** FEBS letters 26444 (2002) 1-6

[123] Söling A, Rainov NG : **Bioluminescence imaging in vivo – application to cancer research.** Expert Opin Biol Ther 3(7) (2003) 1-10

[124] Söling A, Theiss C, Jungmichel S, Rainov NG: **A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma.** Genet Vaccines Ther 2(1) (2004) 7

[125] Spibey CA, Jackson P, Herick K : **A unique charge-coupled device/xenon arc lamp based imaging system for the accurate detection and quantitation of multicolour fluorescence.** Electrophoresis 22 (2001) 829-836

[126] Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S : **Implications of the human genome for understanding human biology and medicine.** JAMA 286 (2001) 2296-2307

[127] Sun X, Annala AJ, Yaghoubi SS, Barrio JR, Nguyen KN, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS : **Quantitative imaging of gene induction in living animals.** Gene Ther 8 (2001) 1572–1579

[128] Sweeney TJ, Mailänder V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, Negrin RS, Contag CH : **Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals.** PNAS 96(21) (1999) 12044-12049

[129] Szentirmai O, Baker CH, Lin N, Szucs S, Takahashi M, Kiryu S, Kung AL, Mulligan RC, Carter BS : **Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect.** Neurosurgery 58(2) (2006) 365-372

[130] Thompson JF, Geoghegan KF, Lloyd DB, Lanzetti AJ, Magyar RA, Anderson SM, Branchini BR : **Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties.** J Biol Chem 272 (1997) 18766-18771

[131] Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, Blasberg RG : **Imaging the expression of transfected genes in vivo.** Cancer Res 55 (1995) 6126-6132

[132] Tjuvajev JG, Finn R, Watanabe K, Joshi R, Oku T, Kennedy J, Beattie B, Koutcher J, Larson S, Blasberg RG : **Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy.** Cancer Res 56 (1996) 4087-4095

[133] Tjuvajev JG, Avril N, Oku T, Sasajima T, Miyagawa T, Joshi R, Safer M, Beattie B, DiResta G, Daghighian F, Augensen F, Koutcher J, Zweit J, Humm J, Larson SM, Finn R, Blasberg R : **Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography.** Cancer Res 58 (1998) 4333-4341

[134] Uphoff CC, Drexler HG : **Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis.** Hum Cell 12(4) (1999) 229-236

[135] Viallet PM, Vo-Dinh T : **Monitoring intracellular proteins using fluorescence techniques: from proteins synthesis and localization to activity.** Curr Protein Pept Sci 4(5) (2003) 375-388

[136] Vile RG, Castleden S, Marshall J, R. Camplejohn CU, Chong H : **Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression.** Int J Cancer 71(2) (1997) 267-274

[137] Vrionis, FD, Wu, JK, Qi, P, Waltzman, M, Cherington, V, Spray, DC : **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 Ther 4 (1997) 577-585

[138] Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, Berns A : **Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-depent tumors in mice.** Cancer Res 62 (2002) 1862-1867

[139] Wang W, El-Deiry WS: **Bioluminescent molecular imaging of endogenous and exogenous p53-mediated transcription in vitro and in vivo using an HCT116 human colon carcinoma xenograft model.** Cancer Biol Ther 2 (2003) 196-202

[140] Waud JP, Sala-Newby GB, Matthews SB, Campbell AK : **Engineering the C-terminus of firefly luciferase as an indicator of covalent modification of proteins.** Biochem Biophys Acta 1292 (1996) 89-98

[141] Weissleder R : **Molecular imaging: Exploring the next frontier.** Radiology 212 (1999) 609-614

[142] Weissleder R, Mahmood U : **Molecular imaging.** Radiology 219 (2001) 316-333

[143] Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, Lowik CW, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG : **Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow.** Am J Pathol 160 (2002) 1143-1153

[144] White JB, Squirrel DJ, Arnaud P, Lowe CR, Murray JAH : **Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354.** Biochem J 319 (1996) 343-350

[145] Wood KV, Lam YA, McElroy WD : **Introduction to beetle luciferase and their applications.** J Biolum Chemilum 4 (1989) 289-301

[146] Wood KV : **Luc genes: introduction of colour into bioluminescence assays.** J Biolumin Chemilumin 5 (1990) 107-114

[147] Wood KV: **Firefly luciferase: a new tool for molecular biologists.** Promega Notes 28(1) (1990)

[148] Wu JK, Cano WG, Meylaerts SA, Qi P, Vrionis F, Cherington V : **Bystander tumoricidal effect in the treatment of experimental brain tumors.** Neurosurgery 35 (1994) 1094-1102

[149] Wu X, Holschen J, Kennedy SC, Ponder KP : **Retroviral vector sequences may interact with some internal promotors and influence expression.** Hum Gene Ther 7(2) (1996) 159-171

[150] Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS: **Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice.** Mol Ther 4 (2001) 297-306

[151] Xu L, Yee JK, Wolff JA, Friedmann T : **Factors affecting long-term stability of Moloney murine leukemia virus-based vectors.** Virology 171(2) (1989) 331-341

[152] Yaghoubi SS, Wu L, Liang Q, Toyokuni T, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Herschman HR, Ganbhir SS : **Direct correlation between positron**

emission tomographic images of two reporter genes delivered by two distinct adenoviral vectors. Gene Ther 8 (2001) 1072–1080

[153] Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T : **Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice.** Cancer Gene Ther 4(2) (1997) 91-96

[154] Yang J, Thomason DB: **An easily synthesized, photolyzable luciferase substrate for in vivo luciferase activity measurement.** BioTechniques 15 (1993) 848-850

[155] Yang M, Baranov E, Wang JW, Jiang P, Wang X, Sun FX, Bouvet M, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM : **Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model.** Proc Natl Acad Sci USA 99 (2002) 3824-3829

[156] Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, Cherry SR, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS : **Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals.** Nature Med 6 (2000) 933–937

[157] Zlokovic BV, Apuzzo MLJ : **Cellular and molecular neurosurgery: Pathways from concept to reality-part I: target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system.** Neurosurgery 40 (1997) 789-804

8 Thesen

1. Durch die Suizidgentherapie mit der Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase (HSV-Tk) ist eine vollständige Zerstörung maligner Gliome in vivo möglich.
2. Die HSV-Tk/GCV-Gentherapie war in klinischen Studien bei Gliompatienten nicht erfolgreich. Daher steht zur Optimierung der Gentherapie die Entwicklung effizienterer Vektorsysteme im Vordergrund. Hierzu wäre ein Verfahren zur nichtinvasiven und quantitativen Darstellung der Genexpression in vivo hilfreich.
2. Die biolumineszente Bildgebung mit der Photinus pyralis - Luciferase stellt ein geeignetes Verfahren für die Darstellung und Quantifizierung der Expression eines therapeutischen Transgens dar.
3. Die Fusion des Suizidgens HSV-Tk an die P. pyralis – Luciferase ermöglicht die stoichiometrische Koexpression beider Fusionspartner in vitro und in vivo.
4. Die Enzymaktivitäten des HSV-Tk-Luc-Fusionsproteins sind im Vergleich zu den unfusionierten Enzymen erniedrigt. Eine Steigerung der Enzymaktivitäten des Fusionsproteins könnte durch die Auswahl geeigneter Verbindungssequenzen zwischen den Fusionspartnern erreicht werden.
5. Mittels Biolumineszenz sind bereits Tumorstadien detektierbar, die durch andere bildgebende Verfahren noch nicht dargestellt werden können.
6. Die Quantifizierung der Lichtemission über einer ausgewählten Region (*Tumorfläche*) korreliert besser mit der Tumorgröße als die *maximale* Lichtemission in dieser Region.
7. Die Abhängigkeit der biolumineszenten Reaktion vom intrazellulären Energiehaushalt (ATP) ist ein zuverlässiger Garant der Detektion von metabolisch aktiven lebenden Zellen.
8. Die Verwendung des HSV-Tk-Luc Fusionsproteins ermöglicht im Nacktmausmodell sowohl die vollständige Zerstörung maligner Gliome als auch die serielle, nicht-invasive und quantitative Darstellung dieses Therapieverfahrens.

Tabellarischer Lebenslauf

Persöhnliche Angaben

Name, Vorname:	Theiß, Christian
Geboren:	Halle (Saale), 21.08.1976
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig
Wohnanschrift:	Herderstraße 2 06114 Halle
Eltern:	Wolfgang Theiß, Versicherungskaufmann Ilona Theiß, Medizinisch-Technische-Assistentin
Geschwister:	Petra Mayer (1970-1996) Andreas Theiß (1966)

Schulbildung

1983 – 1984	Polytechnische Oberschule „Otto Schlag“, Hohenmölsen
1984 – 1991	Polytechnische Oberschule „Arthur Becker“, Halle (Saale)
1991 – 1995	Gymnasium der Kooperativen Gesamtschule „Wilhelm v. Humboldt“, Halle (Saale)
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1995 – 1996	Klinik für Dermatologie u. Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Ausbildung

seit 1996	Studium an der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg
09/2000	1. Staatsexamen
09/2003	2. Staatsexamen
2003 – 2004	Praktisches Jahr (Wahlfach: Neurochirurgie)
11/2004	3. Staatsexamen / Approbation

Beruflicher Werdegang:

seit Januar 2005	Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Neurochirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (in Weiterbildung – Facharztkunde Neurochirurgie)

Poster / Publikationen

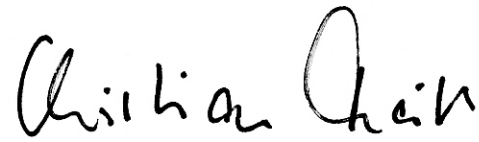
2002 Söling A, Simm A, Theiß C, Rainov NG : Gentherapie von malignen Hirntumoren mit dem Suizidgen Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase.

2003 Söling A, Theiß C, Jungmichel S, Rainov NG: A novel Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase – luciferase fusion protein with cytotoxic activity is a sensitive reporter for noninvasive imaging of tumour growth and response to ganciclovir therapy.

2003 Söling A, Sinske D, Sackewitz M, Volkmar M, Jacob R , Diez G, Theiß C, Rainov NG : Minichromosome maintenance protein 3 (MCM3) represents a tumor-associated antigen in malignant glioma.

2004 Söling A, Theiss C, Jungmichel S, Rainov NG: A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma. Genet Vaccines Ther 2004 Aug. 4;2(1):7.

Halle, den 12.09.2006



.....

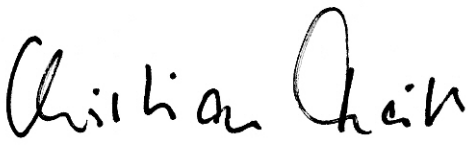
Christian Theiß

Diese Dissertation wurde im Neuroonkologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht und vollständig im Literaturverzeichnis aufgeführt. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind, nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. Ariane Söling, von mir selbst durchgeführt worden.

Halle, den 12.09.2006



.....

Christian Theiß

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit:

Söling A, Theiss C, Jungmichel S, Rainov NG: **A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma.** Genet Vaccines Ther 2004 Aug. 4;2(1):7

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Burkert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Unterstützung zur Erstellung dieser Arbeit.
Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Ariane Söling, Leiterin des Neuroonkologischen Labors der Klinik, für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete wissenschaftlich-theoretische Ausbildung und die großzügige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, allen voran meine lieben Eltern, für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Ausdauer und Hilfe während der Erstellung dieser Arbeit.

Halle, den 12.09.2006

Christian Theiß