

Fremdgenexpression in Glioblastomen mit zwei unterschiedlichen Vektorsystemen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dillmann, Sven
aus Haiger

Gießen, 2006

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. D.-K. Böker

1. Gutachter: Prof. Dr. med. D.-K. Böker

2. Gutachter: PD Dr. med. K. Kuchelmeister

Tag der Disputation: 27.09.2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angabe, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsnachweis	8-9
Tabellenübersicht	9
Abkürzungsverzeichnis	10

1. Einleitung

1.1. *Listeria monocytogenes*

1.1.1. Morphologie und Wachstum	13
1.1.2. Infektionsweg und Ausbreitung	13
1.1.3. Das Virulenzgencluster	14
1.1.4. Virulenzgene von <i>L. spp.</i>	15
1.1.5. Listeriose	16
1.1.6. ZNS-Listeriose	17
1.1.7. Therapie	17

1.2. Das Influenzavirus Typ A

1.2.1. Aufbau	18
1.2.2. Einteilung der Influenzaviren	20
1.2.3. Replikation der Orthomyxoviridae	21
1.2.4. Genetische Variabilität der Influenzaviren	22
1.2.5. Neurovirulenz des Influenzavirus	23
1.2.6. Klinische Symptomatik einer Influenzainfektion	24
1.2.7. Immunabwehr	24
1.2.8. Antivirale Therapie	24

1.2.9. Impfprophylaxe	24
1.2.10. Reverse Genetik von Influenzaviren	24
1.3. Glioblastoma multiforme	26
1.4. Suizidgentherapie	28
1.4.1. Herpes simplex Thymidinkinase	29
1.4.1.1. Ganciclovir	29
1.4.2. Cytosindeaminase (CD)	29
1.4.2.1. 5-Fluorcytosin	30
1.4.3. Purinnukleosidphosphorylase (PNP)	30
1.4.4. Bystander-Effekt	30
1.4.5. Vektoren für Suizidgentherapie	31
1.5. Problemstellung	34
2. Materialien	35
3. Methoden	
3.1. Zellkultur kommerzieller Zelllinien	42
3.2. Zellkultur von OP-Präparaten	42
3.3. Zählkammer	42
3.4. Zytotoxizitätsversuche	43
3.5. Alamar-Blue-Assay	43
3.6. Molekularbiologie	
3.6.1. PCR	43
3.6.2. Agarosegelelektrophorese	44
3.6.3. Aufreinigung der Amplifikate	45

3.6.4. Restriktionsverdau der Amplifikate und Plasmide	45
3.6.5. Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus	45
3.6.6. Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen	46
3.6.7. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	46
3.6.8. Ligation	46
3.7. Klonierungsstrategie Listerien	46
3.8. Klonierungsstrategie Influenza	50
4. Ergebnisse	
4.1. Listeriensystem	54
4.2. Ergebnisse der PCR der Suizidgene	58
4.3. Ergebnisse der GFP-Transfektion in Glioblastome mit dem reversen Influenzamodel	59
4.3.1. Optimierung des Transfektionsprotokolls	60
4.4. Ergebnisse Suizidgentherapie pcDNA3.1-TK	61
4.5. Ergebnisse Suizidgentherapie pcDNA3.1-CD	62
4.6. Ergebnisse Suizidgentherapie polI-PNP/TK und CD	64
5. Diskussion	
5.1. Diskussion der Listerienmethodik	74
5.1.1. Zellkultur	74
5.2. Diskussion der Ergebnisse der Transfektionsversuche mit dem Vektor Listeria monocytogenes	75
5.3. Diskussion der Listerienstrategie	76
5.4. Diskussion der Methodik des reversen Influenzamodels	76

5.5. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion von pcDNA 3.1+	77
5.6. Diskussion der Ergebnisse der Suizidgentherapie mit dem reversen Influenzamodelle	
5.6.1. polI-PNP/6-MPdR	78
5.6.2. polI-TK/GCV	78
5.6.3. polI-CD/5-FC	79
5.7. Ausblicke	80
6. Zusammenfassung	80
7. Literaturverzeichnis	82
Danksagung	97
Lebenslauf	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Infektionsprozesses von <i>Listeria monocytogenes</i>	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Virulenzgenclusters und der Bedeutung des PrfA	14
Abbildung 3: Schematische Zeichnung des Influenza-A-Virus und des viralen RNA-Polymerasekomplexes	18
Abbildung 4: Replikationszyklus des Influenzavirus	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Antigenic shift von Influenza A	23
Abbildung 6: Plasmidbasiertes reverses Influenzamodell zur Expression von GFP	26
Abbildung 7: Grundprinzip der Suizidtherapie	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Transfektionsversuchs	50
Abbildung 9: Schematische Darstellung der 24 Well-Platte mit Zuordnung der Transfektionsansätze	53
Abbildung 10: LacZ-Expression in zwei unterschiedlichen Glioblastomlinien	54
Abbildung 11: PNP in der Gelelektrophorese	58
Abbildung 12: CD und TK in der Gelelektrophorese	59
Abbildung 13: GFP Expression in U87-Zellen	59

Abbildung 14: GFP Expression in 293 T-Zellen	60
---	----

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Übersicht Serovare Listeria spp.	13
--	----

Tabelle 2: Übersicht der Virulenzgene und deren Funktion	16
---	----

Tabelle 3: Die RNA-Genomsegmente und die Proteine, für die sie codieren am Beispiel des Influenza-A-Stamms A/PR/8/34	20
--	----

Tabelle 4: Übersicht über die wichtigsten humanpathogenen Influenza-A-Subtypen	22
---	----

Tabelle 5: Überblick über Suizidgene und ihre Genprodukte	28
--	----

Tabelle 6: Übersicht über die aufgetretenen Zellverluste und Anzahl an spezifischen und unspezifischen LacZ-positiven Zellen nach Listerieninfektion	56
---	----

Tabelle 7: Überblick über die Ergebnisse der Transfektion mit polI-PNP/TK/CD	64
---	----

Diagramme:

Diagramme 1 - 4 : Ergebnisse Listerientransfektion	54-58
--	-------

Diagramme 5 - 25 : Ergebnisse Transfektion mit reversem Influenzasystem	60-73
---	-------

Abkürzungsverzeichnis

bp	base pairs
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
ccm	Kubikzentimeter
CD	Cytosindeaminase
CMV	Cytomegalievirus
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	Escherichia
EGF	epidermal growth factor
5-FC	5-Fluorcytosin
5-FU	5-Fluoruracil
GCV	Ganciclovir
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HSV	Herpes-Simplex-Virus
INF	Interferon
inlA	Internalin A
inlB	Internalin B
L.	Listeria

LLO	Listeriolysin O
M	Matrixprotein
min	Minute
ml	Milliliter
6-MPdR	6-Methylpurindesoxyribosid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoproteine
NS	Nichtstrukturprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platlet derived growth factor
PI-PLC	phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C
PNP	Purinnukleosidphosphorylase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
sec	Sekunde
spp.	species
TK	Thymidinkinase
ÜNK	Übernachtkultur
VEGF	vascular endothelial factor
vRNA	virale Ribonukleinsäure

WHO

World Health Organisation

z.B.

zum Beispiel

ZNS

Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. *Listeria monocytogenes*

1.1.1. Morphologie und Wachstum

Listeria monocytogenes ist ein grampositives, enteroinvasives und peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, das weder Sporen noch Kapseln bildet und wie *Salmonella enterica* spp., *Salmonella thymimurium*, *Mykobakterium* spp., *Chlamydia* spp. und *Coxiella burnetii* zu den fakultativ intrazellulären Keimen zählt. Die peritriche Begeißelung ermöglicht eine aktive Beweglichkeit, die bei Temperaturen unter 25°C besonders ausgeprägt ist (Jones und Seelinger, 1992). Listerien sind fakultativ-anaerob und vermehren sich auch noch bei extremen pH-Werten und hohen NaCl-Konzentrationen (Cole et al., 1990). Anhand der Agglutination mit 15 O-Antigenen und 5 H-Antigenen werden 16 Serovare von *Listeria* spp. unterschieden (Jones und Seeliger, 1992; Farber und Pterkin, 1991).

Tabelle 1: Übersicht Serovare *Listeria* spp.

Spezies	Serovare
<i>L.monocytogenes</i>	1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L.innocua</i>	3, 4ab, 6a, 6b, unbenannt
<i>L.ivanovii</i>	5
<i>L.seeligeri</i>	1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 4b, 4c, 4d, 6b
<i>L.welshimeri</i>	1/2 a, 4c, 6a, 6b, unbenannt
<i>L.grayi</i>	

1.1.2. Infektionsweg und Ausbreitung

Eine Infektion mit Listerien wird Listeriose genannt.

Der Mensch infiziert sich dabei überwiegend durch orale Aufnahme kontaminierter Milchprodukte (Bille, 1990). Da sich die Bakterien bis zu Temperaturen von 5-10 °C vermehren können, kann es in kontaminierten, gekühlten Lebensmitteln zur weiteren Keimanreicherung kommen. Nach oraler Zufuhr der Bakterien, gelangen diese über M-Zellen der Peyerschen-Plaques in das Intestinalepithel und in die Enterozyten (Marco et al., 1992). Nach primärer Vermehrung in Makrophagen erfolgt dann die Ausbreitung über das lymphatische System zu Milz und Leber (Conlan, 1999). Im immunologisch kompetenten Organismus wird der größte Anteil der Listerien durch die Kupfferschen Sternzellen eliminiert (Conlan et al., 1994). Ein Teil der Bakterien infiziert die Hepatozyten mit nachfolgender Apoptoseinduktion und Freisetzung chemotaktischer Stoffe, die neutrophile Granulozyten anlocken. Ob damit eine vollständige Listerienelimination erreicht wird, hängt vom Verhältnis zwischen Erregervirulenz und der überwiegend T-zellulären immunologischen Abwehrlage ab. Bleiben Listerien im Körper zurück, so können sie sich entweder frei oder intrazellulär vermehren und über Blut- und Lymphwege zu einer systemischen Infektion führen.

Nach dem Eintritt der Listerien in die Zellen, erfolgt die rasche Aufnahme in Phagosomen, die mit Lysosomen zu Phagolysosomen fusionieren. Dieser Weg der Fremdkörperelimination greift nicht bei Listerien, da es trotz der Ansäuerung im Phagolysosom nicht zum Absterben der Bakterien kommt, sondern zu einer Aktivierung des Listeriolysin O (LLO). Dadurch „befreien“ sich die Listerien aus dem Phagolysosom, gelangen ins Zytoplasma der Wirtszelle und beschreiten einen intrazellulären Replikationsweg. Hierbei erfolgt eine Polymerisation

1.1.4. Virulenzgene von *L. spp.*

inlA und inlB

Diese beiden Gene des inlAB-Operons codieren für die Internaline A und B, die an der Adhäsion und Invasion der Listerien in die Wirtszelle beteiligt sind (Lingnau et al., 1995; Gaillard et al., 1991). Dabei unterliegen sie einer schwachen Regulation durch PrfA und temperaturabhängigen Mechanismen (Lingnau et al., 1996). Der Wirtszellrezeptor epithelialer Zellen für Internalin A ist E-Cadherin, ein transmembranes Glykoprotein das an der calciumabhängigen Zell-Zell-Interaktion beteiligt ist und auch auf Enterozyten vorhanden ist (Lecuit et al., 1999). Es gehört in die Familie der Cadherine, die gewebsspezifisch gebildet werden, so z.B. E-Cadherin von epithelialen Zellen und N-Cadherin von neuronalen Zellen (Cossart, 1998). Die einzugehende Bindung ist so wirtsspezifisch, dass der Austausch einer Aminosäure die Wechselwirkung verhindert.

Internalin B, das sowohl zellwandassoziiert, als auch in sekretorischer Form vorkommt hat ebenfalls Bedeutung für die Listerieninvasivität in verschiedene Zellarten, wobei humane mikrovaskuläre Gehirnendothelien unabhängig von inlB invadiert werden (Greiffenberg et al., 2000). Der zelluläre Rezeptor für Internalin B ist eine Tyrosinkinase (Shen et al., 2000). Neben diesen beiden Internalinen sind noch weitere Formen (InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG und InlH) beschrieben worden (Engelbrecht et al., 1996). Listerien denen das InlGHE Cluster fehlt zeigen eine deutlich reduzierte Virulenz.

hly-Gen

Dieses Gen codiert für das sezernierte Listeriolysin O, das sowohl unter der Kontrolle des prfA-Promotors als auch ohne ihn transkribiert werden kann. Listeriolysin O ist ein Hämolyysin (Guillard et al., 1986), das der Familie der sulfhydrylaktivierten porenbildenden Zytolysine (wie z.B. Streptolysin) angehört (Smyth und Duncan, 1978). Durch diesen Faktor können Listerien nach Aufnahme in die Wirtszelle das Phago lysosom verlassen.

Die Transkription erfolgt temperatur- und pH-abhängig und ist bei 37°C und einem pH von 5,5 besonders effektiv (Leimeister-Wächter et al., 1992; Farber und Pterkin, 1991). Weitere Funktionen sind die Apoptoseinduktion (Guzman et al., 1996) und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in infizierten Endothelzellen (Drevets, 1997; Krull et al., 1997).

plcA

Das Produkt des plcA-Gens ist die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) die in der Lage ist, sowohl Phosphoinositol als auch Phosphoinositolglykane zu hydrolysieren und damit das Phago lysosom aufzulösen (Camilli et al., 1991; Ireton et al., 1996). Listerien ohne PI-PLC-Aktivität sind avirulent. Wortmannin, ein Inhibitor der PI-PLC kann Wirtszellen vor einer Listerieninfektion schützen.

plcB

Dieses Gen codiert für die phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (Lecithinase) und ist mit mpl und actA im Lecithinase-Operon zusammengefasst. Die Lecithinase löst die nach interzellulärer Listerienwanderung vorhandenen Doppelmembranen auf (Vazquez-Boland et al., 1992).

mpl

Das mpl-Gen ist das erste Gen des Lecithinase-Operons. Das codierte Protein ist eine Metalloprotease, die zur Aktivierung der Lecithinase führt (Coffey et al., 2000). Mutanten mit Veränderungen innerhalb dieses Gens zeigen geringere Virulenz und produzieren eine andere Form der Lecithinase.

actA

Nach Eindringen des Bakteriums in das Zytoplasma beginnt die Expression des actA-Gens und nachfolgend die Polymerisation zellulären G-Aktins, wodurch an einem Bakterienpol ein Aktinschweif entsteht. Dieser Aktinschweif ermöglicht die intrazytoplasmatische Bewegung und ist auch an der Invasion der Listerie in die Zelle beteiligt. Dabei hängt die Geschwindigkeit der intrazellulären Bewegung von der Aktivität der Aktinpolymerisation ab (Theriot et al., 1992). Mutanten mit Defekten innerhalb dieses Gens bilden keine Lecithinase und die Aktinpolymerisation bleibt aus (Kocks et al., 1992).

Durch Plasmidexpression von ActA in apathogenen *L. innocua* konnten diese zur Aktinpolymerisation und intrazellulären Beweglichkeit befähigt werden (Kocks et al., 1995). Auch die Inkubation von *Streptococcus pneumoniae* mit einem Hybridprotein das ActA enthielt, führte zu dieser Fähigkeit (Smith et al., 1995). Zur Bindung und Akkumulation von Aktin sind neben ActA weitere Zytoskelettproteine notwendig, wie z.B. α -Aktin, Tropomyosin, Profilin und VASP. Profilin und VASP befinden sich jeweils am proximalen Ende des Aktinschweifs. In vitro Studien zeigten, dass VASP eine Verbindung zwischen ActA und dem Zytoskelett herstellt (Chakraborty et al., 1995), wobei VASP zunächst Profilin bindet bevor es mit ActA eine Verbindung eingeht.

prfA

Das Produkt dieses Gens sorgt für die Transkriptionsaktivierung weiterer Gene wie z.B. hly, plcA, mpl und plcB (Mengaud et al., 1991; Chakraborty, 1992). Dabei unterliegt es selber der Kontrolle durch einen Promotor im Bereich zwischen plcA und prfA und durch den plcA-Promotor. Dies legt nahe, dass prfA seine eigene Bildung reguliert.

iap

Ein weiterer Faktor mit Bedeutung für die Invasivität der Listerien in Fibroblasten und Makrophagen ist das vom iap-Gen codierte P60-Protein, das PrfA-unabhängig exprimiert wird. Dieses Protein hat Murein-Hydrolaseaktivität und kommt sowohl zellwandassoziiert als auch in sekretorischer Form vor.

Tabelle 2: Übersicht der Virulenzgene und deren Funktion

Gen (Genprodukt)	Funktion	Folge des Funktionsverlust
actA (Aktin)	Aktinpolymerisation	Fehlende Beweglichkeit
iap (Hydrolase)	Invasion	Reduzierte Invasivität
inlA/inlB (Internalin)	Zytoadhäsion und Invasion	Reduzierte Invasivität
mpl (Metalloprotease)	Aktivierung Lecithinase	Apathogene Variante
hly (Listeriolysin O)	Auflösung Phagosom	Apathogene Varianten
plcA (PI-PLC)	Auflösung Phagosom	Apathogene Varianten
plcB (Lecithinase)	Interzelluläre Wanderung	Keine Infektionsausbreitung
prfA	Promotor	Keine Virulenzgenexpression

1.1.5. Listeriose

Die Inkubationszeit variiert zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen (Schuchat et al., 1991), wobei der klinische Verlauf wesentlich vom immunologischen Zustand des Organismus abhängt. Man unterscheidet:

a) Infektion bei Gesunden

Diese Art der Infektion verläuft entweder asymptomatisch oder mild in Form eines grippalen Infektes.

b) opportunistische Infektion bei Immungeschwächten

Risikogruppen sind ältere Menschen, Patienten mit AIDS, Diabetes mellitus, chronischen Herz-, Lungen-, oder Nierenerkrankungen, einer iatrogenen Immunsuppression oder einer Alkoholabhängigkeit (Schwartz et al., 1988). Der Verlauf ist schwerwiegend. Neben Fokalinfectionen wie z.B. Osteomyelitis, Pleuritis, Pneumonie, Peritonitis oder Cholezystitis kann es bei Patienten mit geschädigten Herzklappen zu einer Endokarditis kommen. Weiterhin droht bei hämatogener Streuung eine Sepsis oder ZNS-Listeriose.

c) Perinatale Listeriose

Diese Infektion ist möglich, wenn die Mutter während der Schwangerschaft an einer Listeriose erkrankt. In zeitlicher Abhängigkeit unterscheidet man „early-onset“ und „late-onset“-diseases.

Beim early-onset infizieren sich die Kinder entweder diaplazentar bei Bakteriämie der Schwangeren oder durch vaginal ascendierende Keime. Neben einer erhöhten Früh- bzw. Fehlgeburtsrate können schon wenige Tage nach der Geburt Krankheitssymptome wie z.B. Hautläsionen, Pneumonie oder Sepsis auftreten. Die Granulomatosis infantoseptica ist ein für diese Verlaufsform typisches Krankheitsbild.

Die Meningitis ist die Hauptverlaufsform des late-onset, der frühestens eine Woche postpartal auftritt. Ursächlich soll eine Infektion bei Passage des Geburtskanals bzw. eine nosokomiale Infektion vorliegen (McLauchlin, 1990).

Beide Verlaufsformen unterscheiden sich in der Letalität, die beim early-onset mit 15-50 % deutlich höher als beim late-onset liegt (Farber und Peterkin, 1991).

d) Reaktivierung von Listerien

Es gibt Beobachtungen, die auf die Möglichkeit der Persistenz und Reaktivierung der Listerien im Wirtsorganismus hinweisen (McLauchlin et al., 1991; Sauders et al., 2001). Die rekurrente humane Listeriose wird dabei fast immer durch den gleichen Listerienstamm wie bei der Primärinfektion ausgelöst.

1.1.6. ZNS-Listeriose

Die hämatogene Streuung der Bakterien in das ZNS kann zu verschiedenen Erscheinungsbildern führen. In 90% der Fälle bildet sich eine Meningitis bzw. Meningoenzephalitis aus (Nau et al., 1990; Niemann und Lorber, 1980). Weiterhin ist eine Hirnstammenzephalitis möglich, die einen zweiphasigen Verlauf zeigt. In der ersten Phase treten uncharakteristische Beschwerden wie Doppelbilder, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen auf. In der zweiten Phase kommt es zu Herdsymptomen wie z.B. Dysarthrie oder Fazialisparese.

Im Tierversuch zeigt sich, dass bevorzugt Axone und Nervenzellkörper der Spinalganglien invadiert werden, wobei sich die Listerien retrograd oder antegrad im Zellsoma bewegen (Dons et al., 1999). In Zellkultur konnte die Invasivität der Listerien durch Koinkubation von Neuronen mit listerieninfizierten Makrophagen erhöht werden, da die interzelluläre Ausbreitung der Bakterien über die actA abhängigen Aktinpolymerisation möglich wurde (Dramsi et al., 1998).

1.1.7. Therapie

Mittel der Wahl sind Ampicillin und Aminoglykosidantibiotika. Trotz antibiotischer Therapie liegt die Gesamtmortalität bei symptomatischer Listeriose um 20 % (Rouquette und Berche, 1996). Eine Möglichkeit zur Impfprophylaxe besteht zurzeit noch nicht.

1.2 Das Influenzavirus Typ A

Das Virus gehört mit den Influenzaviren Typ B und C in die Familie der Orthomyxoviridae, die ein einsträngiges, segmentiertes RNA-Genom mit Negativstrangpolarität besitzen. Sie haben einen Durchmesser von ca. 120nm und kommen im Gegensatz zu Typ B und C bei Mensch und Tier vor (Zambon, 1999).

1.2.1. Aufbau

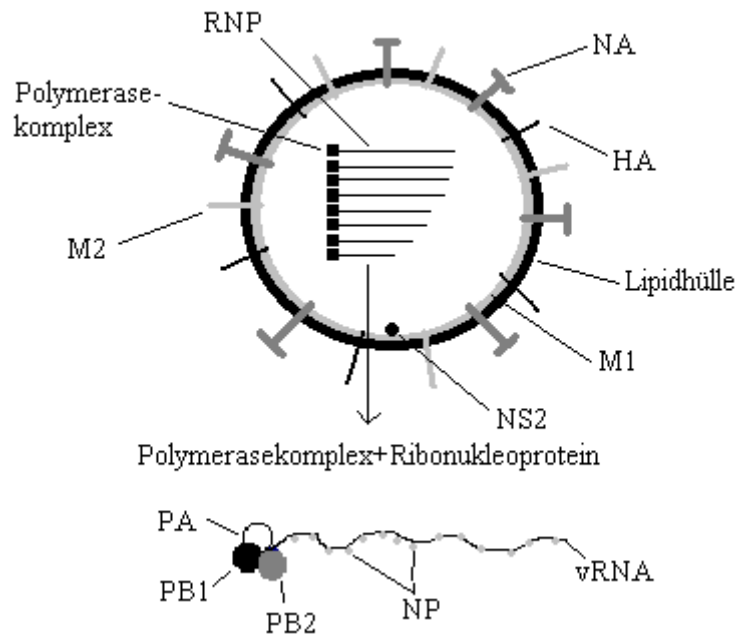


Abbildung 3 : Schematische Zeichnung des Influenza-A-Virus und des viralen RNA-Polymerasekomplexes

Das Genom des Influenzavirus Typ A umfasst 8 Segmente mit etwa 13600 Basen. Jedes Segment ist mit basischen, argininreichen Nukleoproteinen (NP) assoziiert und bildet damit eines der 8 Nukleokapside. Nachfolgend wird die Bedeutung der einzelnen Segmente bzw. deren Genprodukte dargestellt und in Tabelle 2 kurz zusammengefasst:

Polymeraseeinheiten PA, PB1, PB2 (Segment1-3)

Die Polymeraseeinheiten bilden den Komplex der viralen RNA-Polymerase. Sie synthetisieren aus viraler (-)RNA („vRNA“) komplementäre (+)RNA („cRNA“), die wiederum als Matrize zur Synthese neuer vRNA dient (Young und Content, 1971; Hay et al., 1982). Weiterhin entsteht aus der (-)vRNA die (+)mRNA, die von der Wirtszelle translatiert wird und damit zur Synthese der viralen Proteine in der Zelle führt (Hay et al., 1977; Plotch et al., 1981).

PB2 erkennt 5'cap-Strukturen zellulärer mRNAs und spaltet durch eine Endonukleaseaktivität 9-15 Nukleotide von diesem Ende ab. Die entstandene Oligonukleotidsequenz dient der viralen RNA-Polymerase als Primer für die Synthese viraler mRNA. Da dadurch der Zellstoffwechsel auf die Virusvermehrung umgestellt wird, erfolgt eine Hemmung der zelleigenen Transkription und Translation. Für die Replikation des viralen Genoms spielt PB2 eine untergeordnete Rolle (Nakagawa et al., 1995).

PB1 hat die eigentliche katalytische Funktion des Komplexes. Sie führt zu einer Elongation der über die Wirtsoligonukleotide geprimten mRNA und zur Synthese von (-)vRNA und (+)cRNA.

PA ist an der vRNA-Synthese und der Umschaltung von Replikation auf Transkription beteiligt (Honda und Ishihama, 1997).

Hämagglutinin (HA) (Segment 4)

Das Hämagglutinin ist ein heterotrimeres, glykosiliertes Oberflächenprotein, das mit endständigen Sialinsäuren von Wirtszellrezeptoren interagiert. Da Sialinsäuren ubiquitär vorkommen, kann das Hämagglutinin an fast alle Körperzellen binden und so auch unter anderem Erythrozyten zur Agglutination bringen. Jedes Hämagglutininmonomer besteht aus den Untereinheiten HA₁ und HA₂, die durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläufermolekül HA₀ hervorgehen. Diese Spaltung ist essentiell für die Anheftung an Wirtszelloberflächen und damit für die Pathogenität des Virus (Segal et al., 1992). Bei humanpathogenen Stämmen erfolgt diese Spaltung extrazellulär durch serinhaltige Wirts-Endoproteasen wie z.B. Trypsin, Plasmin oder Kallikrein (Klenk et al., 1975). Auch bakterielle Proteasen wie Streptokinase oder Staphylokinase spalten Hämagglutinin durch eine Aktivierung von Plasminogen (Scheiblauer et al., 1992), wodurch das Auftreten einer sekundären, bakteriellen Pneumonie im Verlauf einer Virusgrippe begünstigt wird.

Die Untereinheit HA₁ ist als Oberflächenprotein ein wesentliches B-Zellepitop und damit an der Auslösung der humoralen Immunantwort beteiligt.

Nukleoprotein (NP) (Segment 5)

Das Nukleoprotein bildet mit der vRNA die Ribonukleoproteine und schützt sie so vor zellulären Nukleasen. Pro Nukleoproteinuntereinheit werden ca. 20 Nukleotide der vRNA bzw. cRNA, jedoch nicht der viralen mRNA gebunden (Compans et al., 1972; Hay et al., 1977; Tchatalbachev et al., 2001). Weiterhin dient das Nukleoprotein der Umschaltung von mRNA- auf cRNA-Synthese, indem es die neugebildete RNA bindet und mit der viralen RNA-Polymerase interagiert (Biswas et al., 1998).

Durch eine Affinität des Nukleoproteins zum M-Protein kann während der Virusreifung eine Anheftung der Ribonukleoproteine an die Innenseite der Wirtszellmembran erfolgen. Dort kommt es dann zur Bildung der Virushülle unter Einlagerung viraler Oberflächenproteine. Die immunologische Bedeutung des Nukleoproteins liegt in der Auslösung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort des Wirtes (Yewdell et al., 1989) und der Hemmung von Chemotaxis und Superoxidproduktion polymorphkerniger Granulozyten (Cooper et al., 1996).

Neuraminidase (NA) (Segment 6)

Die Neuraminidase löst neuraminsäure- bzw. sialinsäurehaltige Wirtszellrezeptoren auf und verhindert so bei der Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel eine Interaktion des Hämagglutinins mit der Zelloberfläche. Es schaltet weiterhin sialinsäurehaltige Inhibitoren des viralen Transportes in Epithelzellen im Mukus der Atemwege aus und begünstigt so die Infektion (Brown, 2000).

Neben Hämagglutinin ist die Neuraminidase eines der wesentlichen Oberflächenantigene des Influenzavirus gegen das im Rahmen der immunologischen Antwort Antikörper gebildet werden.

Matrixproteine 1 und 2 (M1/2) (Segment 7)

M 1 ist das häufigste Strukturprotein im Viruspartikel. Es kann sich mit verschiedenen Bestandteilen des Virus wie z.B. Ribonukleoprotein, RNA, NS2 Proteinen und den viralen Lipidmembranen zusammenlagern (Brown, 2000). Durch die Interaktion mit Ribonukleo-

proteinen, die aus dem Phagosom freigesetzt werden (uncoating), vermittelt M1 deren Transport in den Wirtszellkern (Bui et al., 1996).

M2 ist ein tetramerer Ionenkanal, der als Protonenpumpe an der Ansäuerung der Zelle während des uncoating beteiligt ist.

Nichtstrukturproteine (NS1 und NS2) (Segment 8)

NS1 führt in den Wirtszellen zu einer Inhibition der interferonvermittelten Immunantwort auf virale Infektionen (Garcia-Sastre et al., 1998), indem es die Aktivierung einer durch Interferon (INF) induzierbaren dsRNA-abhängigen Proteinkinase verhindert. Weiterhin hemmt NS1 die Polyadenylierung und den nukleären Transport von mRNA der Wirtszelle als auch bestimmter viraler mRNA's durch Bindung des poly(A)-Endes der mRNA.

NS2 ist an M1 gebunden und spielt eine wichtige Rolle beim Export der Ribonukleoproteine aus dem Zellkern in das Zytoplasma (O'Neill et al., 1998).

Tabelle 3: Die RNA-Genomsegmente und die Proteine, für die sie codieren am Beispiel des Influenza-A-Stamms A/PR/8/34

Segment	Länge (bp)	Protein	Funktion
1	2341	basisches Protein 2 (PB2)	Komponente des Nukleokapsids und des Polymerasekomplexes
2	2341	basisches Protein 1 (PB1)	Komponente des Nukleokapsids und des Polymerasekomplexes
3	2233	saures Protein (PA)	Komponente des Nukleokapsids und des Polymerasekomplexes
4	1778	Hämagglutinin (HA)	Adsorption an die Wirtszelle
5	1565	Nukleoprotein (NP)	Hauptkomponente des Nukleokapsids, Kerntransportsignal
6	1413	Neuraminidase (NA)	Abspaltung endständiger Neuraminsäurereste; Freisetzung Viruspartikel
7	1027	Matrixprotein 1 (M1) Matrixprotein 2 (M2)	Morphogenese des Virus Ionenkanal, wichtig für die Freisetzung des Nukleokapsids aus dem Endosom
8	890	Nichtstrukturprotein 1 (NS1) Nichtstrukturprotein 2 (NS2)	reguliert Export gespleißter mRNA regulatorisches Protein

Aus Segment 7 und 8 ergeben sich je 2 Proteine durch partielles Spleißen.

1.2.2. Einteilung der Influenzaviren

Die Einteilung der Influenzaviren in Typ A, B und C erfolgt anhand molekularer Eigenschaften und serologischer Charakteristika der Nukleoproteine und der M-Proteine. Influenza A und B-Viren besitzen 8 Genomsegmente, der Typ C nur 7. Die terminalen Nukleotidsequenzen jedes RNA-Segments sind dabei gleich, was für einen gemeinsamen Ursprung der Virussubtypen spricht (Nakajima et al., 1997). Des Weiteren wird Influenza A durch Abweichungen in Hämagglutinin und Neuraminidase unterschieden (Webster et al., 1982). Für die Neuraminidase sind zurzeit 9 und für Hämagglutinin 15 Varianten bekannt (Ludwig et al., 1999), wobei bei Erkrankungen des Menschen bislang nur drei Hämagglutininsubtypen (H1, H2, H3) und zwei Neuraminidasesubtypen (N1 und N2) gefunden wurden (Zambon, 1999). Für eine vollständige Bezeichnung der Viren werden die Wirtsquelle, der geographische Isolationsort, die Stammnummer, das Jahr der ersten Isolation sowie die Subtypen von Hämagglutinin und Neuraminidase angegeben (z.B. A/swine/Iowa/15/30/ (H1N1)). Erfolgt die Isolation aus dem Menschen entfällt die Wirtsangabe. Akkumulierte Daten humaner Infektionen zeigen, dass seit 1977 vor allem die

Subtypen H1N1 und H3N2 immer wieder zu Infektionen jüngerer Menschen führten. Ältere Menschen sind durch eine Immunität nach vorausgegangenem Kontakt mit H1 seltener betroffen. Dieser Mechanismus des wiederholten Auftretens bekannter Subtypen wird als antigenetic recycling bezeichnet (Potter, 1998).

1.2.3. Replikation der Orthomyxoviridae (Abb.4)

a) frühe Phase

Das Virus bindet über Hämagglutinin an N-Acetylneuraminsäuren verschiedener Wirtszellrezeptoren und wird durch rezeptorvermittelter Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Das entstandene Endosom verschmilzt mit einem Lysosom zum Phagolysosom. Dadurch sinkt der pH-Wert ab und zusammen mit dem Protoneneinstrom durch M1 ändert sich die Konformation des Hämagglutinins und die Ribonukleoproteine lösen sich von M1. Durch die Aktivierung des HA₂-Fusionsproteins fusionieren Virushülle und Endosomenhülle, so dass die Ribonukleoproteine in das Zytoplasma freigesetzt werden (Brown, 2000). Von dort gelangen sie unter Beteiligung zweier Kerntransportsignale (K-736 PKR und MKRKRNS) (Jones et al., 1986; Mukaigawa und Nayak, 1991) in den Zellkern, wo sich Transkription und Replikation anschließen.

Für diese beiden Schritte im viralen Reproduktionszyklus ist die virale RNA-Polymerase das essentielle Enzym. Sie bildet auf der Basis der (-) Strang-vRNA eine komplementäre (+)Strang-cRNA, die als Matrize für neue vRNA und mRNA dient.

Zur Initiation der Transkription entfernt PB2 von 5'Cap-Strukturen zellulärer mRNAs eine kurze Nukleotidsequenz, die als Primer für die Synthese viraler mRNA genutzt wird. Durch PB1 erfolgt die mRNA-Synthese entlang der vRNA-Matrize bis zum poly-A-Ende. Das NS1-Protein und das Nukleoprotein gehören zu den viralen Proteinen, die in der frühen Infektionsphase gebildet werden und dann aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangen. Das Nukleoprotein bildet wiederum Ribonukleoproteine und sorgt für eine Umschaltung von mRNA auf vRNA-Synthese. Dadurch formieren sich in der Zelle schon virale Proteine während das virale Genom noch repliziert wird.

b) späte Phase

Typische Spätphaseproteine sind Hämagglutinin, Neuraminidase und M1. M1 verbindet sich mit neu gebildeten vRNAs und reguliert so die Transkription herab. Über NS2-Protein werden vRNA's gebunden und aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert.

Die Virusausschleusung erfolgt anschließend durch Knospung an der Wirtszellmembran. Dabei müssen alle 8 Segmente des viralen Genoms verpackt werden, damit das entstehende Virus seine replikativen und infektiösen Fähigkeiten erhält.

Die vollständige Replikation der Influenzaviren ist auf epitheliale Zellen beschränkt. Sie kann in Kultur auf Zelllinien renalen Ursprungs erfolgen, wie z.B. Madin Darby canine kidney (MDCK) (Brown, 2000).

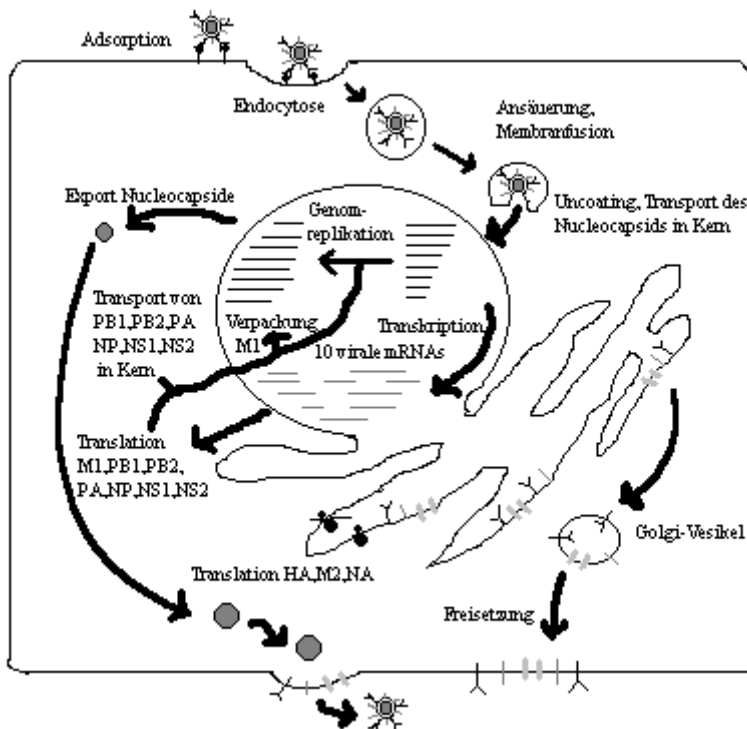


Abbildung 4 : Replikationszyklus des Influenzavirus

1.2.4. Genetische Variabilität der Influenzaviren

Influenza Typ A hat immer wieder zu Pandemien durch neue Virussubtypen geführt (Tab. 4). Die erste Virusisolation erfolgte durch Smith, Andrewes und Laidlaw 1933, die das Vorliegen unterschiedlicher Viruskapsidproteine erstmals zeigen konnten. Die wesentlichen Mechanismen, die diese Variabilität begünstigen, sind der antigenic shift und der antigenic drift.

Tabelle 4: Übersicht über die wichtigsten humanpathogenen Influenza-A-Subtypen

Jahr	Subtyp	Herkunft	
1890	H2N2	?	
1900	H2N8	?	
1918/1919	„spanische Grippe“	H1N1	Ente
1967	„asiatische Grippe“	H2N2	Ente
1968	„Hong-Kong-Grippe“	H3N2	Ente
1977		H1N1	?
1997		H5	Geflügel

a) Antigenic Shift (Reassortant) (Abb. 5)

Grundlage ist das segmentierte Genom des Influenzavirus Typ A. Da die einzelnen Segmente unabhängig voneinander replizieren, kann es bei einer Doppelinfection einer Wirtszelle mit zwei verschiedenen Influenza-Typ-A-Viren im Replikationszyklus zu einer neuen Kombination der Segmente kommen. Betrifft dieser Genaustausch das Hämagglutinin, die Neuraminidase oder beide Oberflächenproteine, so entstehen Virusnachkommen mit neuer, unbekannter Antigenstruktur, die vom Immunsystem des Wirtes nicht erkannt werden können. Dadurch breitet sich das Virus besonders schnell aus.

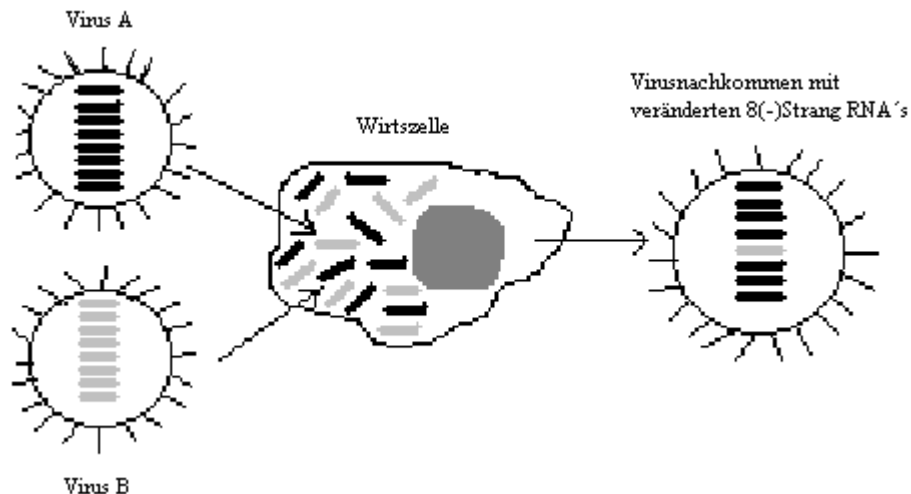


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Antigenic shift von Influenza A

b) Antigenic drift

Weitere Variationen des Hämagglutinin und der Neuraminidase beruhen auf Punktmutationen der RNA-Segmente 4 und/oder 5. Diese entstehen durch die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die aufgrund fehlender Regulationsmechanismen mit einer Häufigkeit von 10^{-5} „falsche Basen“ während der Replikation einbaut (Yewdell et al., 1979). Die Einzelmutationen in einem Gen addieren sich und führen zu Abänderungen der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins. Im Wirt erfolgt die Selektion derjenigen Varianten, die nicht vom Immunsystem „neutralisiert“ werden. Bedeutungslose Mutationen ohne Selektionsvorteil setzen sich nicht durch.

1.2.5. Neurovirulenz des Influenzavirus

Die Neurovirulenz des Influenzavirus wurde insbesondere in Tiermodellen untersucht. Eine Influenza-Enzephalopathie kann bei adulten Mäusen durch direkte intrazerebrale Virusinokulation induziert werden, bei neugeborenen Mäusen entsteht sie meist im Rahmen einer Infektgeneralisation (Wagner, 1955). Die neurovirulenten Varianten A/NWS/33 (NWS) (Stuart-Harris, 1939) und A/WSN/33 (WSN) (Francis und Moore, 1940) können in das Mäusegehirn eindringen, replizieren und eine schwere Enzephalopathie auslösen. Nach direkter intrazerebraler Inokulation von WSN in Mäusen konnten virale Antigene in der Substantia nigra und dem Hippocampus nachgewiesen werden. Diese Lokalisation kann mit dem Auftreten eines postenzephalitischen Parkinsonismus in Zusammenhang stehen (Takahashi et al., 1995). Der Virulenzfaktor für neurovirulentes Verhalten ist die Neuraminidase (Sugiura und Ueda, 1980). Sie versetzt vorher inerte Zellen in die Lage Hämagglutinin zu spalten und zu aktivieren (Nakajima und Sugiura, 1980). Weiterhin finden sich bei neurovirulenten Varianten Veränderungen im RNA-Segment 7, die als Folge einer erhöhten Expression von Nichtstrukturprotein (NS) interpretiert werden, das die Splicevorgänge der Segmente 7 und 8 herunterreguliert (Sugiura und Ueda, 1980; Bradshaw et al., 1990)

Die Bedeutung neurovirulenter Stämme des Influenzavirus für den Menschen ist nicht geklärt. In einem Teil der Fälle konnte eine zerebrale Manifestation im Rahmen der Infektion nachgewiesen werden (Kilbourne, 1987; Sugaya, 2000), nur selten wurde das Virus aus Hirngewebe (Murphy und Hawkes, 1970) oder Liquor (Thraenhart et al., 1975) isoliert.

1.2.6. Klinische Symptomatik einer Influenzainfektion

Nach erfolgter Tröpfcheninfektion beträgt die Inkubationszeit 1-5 Tage. In 80 % der Fälle verläuft die Infektion asymptomatisch bzw. unter dem Bild einer milden Erkältungskrankheit. Bei symptomatischem Verlauf kommt es zum plötzlichen Einsetzen von Fieber bis 41°C, Kältegefühl, Schüttelfrost, Laryngo-Tracheobronchitis mit trockenem Husten, Rhinitis, Pharyngitis, Konjunktivitis, Myalgien und allgemeinem Krankheitsgefühl.

Komplikationen stellen sich vor allem bei älteren Patienten (> 65 Jahre), Kindern, Immunsupprimierten sowie Patienten mit kardiopulmonalen oder renalen Vorerkrankungen ein. Es kann zur interstitiellen, oft hämorrhagischen Pneumonie, einer Myokarditis oder sekundären Pneumonie durch bakterielle Superinfektion kommen. Diese bakterielle Superinfektion erfolgt meist durch Staphylokokken bzw. Streptokokken, da diese Proteasen besitzen, die Hämagglutinin aktivieren und so die Infektion erleichtern. Auch *Hämophilus influenzae* wird oft als Begleitkeim nachgewiesen, so dass früher davon ausgegangen wurde, dass dieses Bakterium der eigentliche Auslöser der Influenza sei. In 20 % der Fälle treten im Rahmen der Influenza Enzephalopathien auf (Sugaya, 2000).

1.2.7. Immunabwehr

Das Eindringen des Virus in die Wirtszellen wird vor allem durch das sekretorische Immunglobulin A, das mit den Viren Antigen-Antikörperkomplexe bildet und Hämagglutinin bindet (Mazanec und Huang, 1996) sowie durch weitere Faktoren der unspezifischen Immunabwehr erschwert. Zusätzlich führen aktivierte Komplementfaktoren zu einer Lyse der Viren. Wird eine Zelle mit dem Influenzavirus infiziert, so bildet diese Interferon alpha und beta. Diese Glykoproteine schützen benachbarte Zellen vor einer Infektion und führen in befallenen Zellen zur Apoptose. Die wichtigste Rolle bei der Viruselimination haben jedoch zytotoxische T-Zellen, die diejenigen Zellen lysieren, in denen Influenza repliziert (Süss, 1979). Die im Rahmen einer B-zellulären Antwort gebildeten Antikörper persistieren lebenslang und schützen vor einer Reinfektion mit dem gleichen Virussubtyp.

1.2.8. Antivirale Therapie

Amantadin und Rimantadin (Hirsch et al., 1996) verhindern die pH-Senkung im Endosom über eine Inhibition des Protonenkanals (M2) und unterbinden so die Aktivierung des Hämagglutinins. Des Weiteren wird durch Bindung der Ribonukleoproteine deren Transport in den Nukleus verhindert.

Neuraminidasehemmstoffe wie Zanamivir und Oseltamavir (Calfee und Hayden, 1998; Dunn und Goa, 1999) verhindern die Freisetzung neuer Viren und reduzieren die Virusausbreitung.

1.2.9. Impfprophylaxe

Alle Impfstoffe (Ganzvirus-, Spaltvirus- und Subunit- (enthalten nur gereinigtes HA und NA) Impfstoffe) sind Totimpfstoffe, die die Antigene von 3 bzw. 4 verschiedenen Influenzastämmen enthalten. Die jeweils aktuelle Zusammensetzung wird von der WHO festgelegt. Die Schutzdauer beträgt ca. 1 Jahr, bedingt durch die hohe genetische Variabilität des Virus.

1.2.10. Reverse Genetik von Influenzaviren

Grundprinzip der reversen Genetik ist es, aus RNA rekombinante DNA zu erhalten, die der Transkription und anschließenden Translation dient. Bei Negativstrangviren ist dies

unerlässlich, da die unverpackte genomische RNA nicht transfiziert und damit auch nicht exprimiert werden kann.

Das erste für Influenzaviren beschriebene revers genetische System basierte auf einem T7-RNA-Polymerase Transkriptionssystem, das ein Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) in negativer Polarität unter der Kontrolle eines T7 Promotors und unter Anwendung eines Helfervirus (A/WSN/33) zur Expression bringt (Luytjes et al., 1989). Ausgehend von diesem System erfolgten verschiedene Weiterentwicklungen, die unter anderem auch zu einem nichtinfektiösen Transkriptionssystem basierend auf der zellulären RNA-Polymerase I (Pleschka et al., 1996) geführt haben. Dieses Transfektionssystem wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet und soll hier näher beschrieben:

Das Prinzip ist die Transfektion einer Wirtszelle mit 5 Plasmiden in Abwesenheit eines Helfervirus. Vier der verwendeten Plasmide (pHMG-NP, pHMG-PB1, pHMG-PB2 und pHMG-PA), die für das Nukleoprotein und den Polymerasekomplex codieren, stehen dabei unter der Kontrolle des Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A- Reduktase (HMG) Promotors der Maus (Gautier et al., 1989). Das fünfte Plasmid enthält das Fremdgen in Negativpolarität, flankiert von nichtkodierenden Regionen des Segments 5 und im Gegensatz zu den anderen Plasmiden unter der Kontrolle des humanen RNA pol I Promotors (Neumann et al., 1994; Neumann und Hobom, 1995). Dieser Promotor ist in menschlichen Zellen vor allem für die Synthese ribosomaler RNA zuständig und zeigt starke Speziesabhängigkeit.

Pleschka et al. beschrieb die Transfektion von 293 T-Zellen zur Expression von CAT bzw. GFP (Abb. 6) zu erzielen. Die Negativstrang-RNA des pPolI-CAT/GFP Plasmids wird intrazellulär in aktive Ribonukleoproteine eingebettet und anschließend durch die virale RNA-Polymerase in mRNA transkribiert. Gleichzeitig kommt es zur Bildung komplementärer cRNA die wiederum als Template der RNA-Polymerase für die Bildung neuer vRNAs dient, die in entstehende Virionen eingebaut werden können. Die Expression der Polymeraseproteine (PA, PB1, PB2) und des Nukleoproteins das als Kerntransportsignal für einen Transport der eingebrachten RNA in den Zellkern sorgt, sind essentiell für die stattfindende Fremdgenexpression. Mittels GFP, einem grün fluoreszierenden Reporterprotein der Quallenart *Aequorea victoria* kann in lebenden Zellen der Transfektionserfolg optisch dargestellt und so die Transfektionsrate bestimmen werden (Chalfie et al., 1994). GFP benötigt keine weiteren Kofaktoren oder Substrate und ist für die exprimierenden Zellen nicht toxisch (Misteli und Spector, 1997).

Im 5 Plasmid-System kommt es nicht zur Entstehung infektiöser Überstände oder infektiöser Virionen, da kein Helfervirus angewendet wird und damit wesentliche Virulenzfaktoren fehlen. Weiterhin werden durch den Verzicht auf die Superinfektion mit Helfervirus störende Einflüsse auf Transkription und Translation des Fremdgens vermindert.

Neben den nicht infektiösen Transfersystemen gibt es auch plasmidbasierende Transfektionssysteme, die zur Entstehung infektiöser influenzaähnlicher Partikel führen (Neumann et al., 2000; Hoffmann et al. 2000).

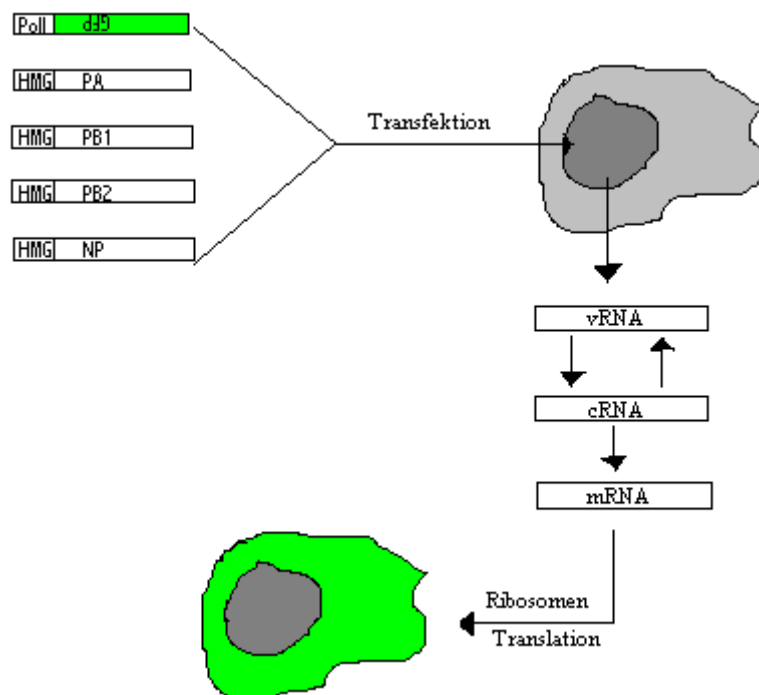


Abbildung 6: Plasmidbasiertes reverses Influenzamodelle zur Expression von GFP

1.3. Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom ist der häufigste Tumor des Zentralnervensystems und betrifft vor allem Menschen im Alter von 40-70 Jahren. In Deutschland erkranken jährlich ca. 4000 bis 5000 Menschen an diesem Tumor. Laut WHO-Klassifikation handelt es sich um einen IV^o-Tumor, der sich durch ein sehr rasches und invasives Wachstum sowie hohe Rezidivneigung auszeichnet. Das Glioblastom entsteht meist in frontalen oder parietalen Großhirnpartien, sowie in der Balkenregion. In 5% der Fälle ist auch ein multilokuläres Wachstum nachzuweisen.

Histopathologisch finden sich Zellpolymorphien, hohe Mitoseraten, Gefäßproliferationen und Nekrosezonen, wobei die Überrepräsentation pathologischer Gefäße dazu führen kann, dass sich manche Glioblastome unter dem Bild einer intrakraniellen Blutung manifestieren.

Zur Entstehung des Glioblastoms werden zwei Wege beschrieben, zum einem de novo (primäres Glioblastom) aus bis dahin unverändertem Hirngewebe, zum anderen über Malignisierung eines niedergradigen Astrozytoms oder Oligodendroglioms (sekundäres Glioblastom) (Müller et al., 1977; Recht et al., 1992). Morphologisch bestehen zwischen diesen beiden Typen keine Unterschiede. Eine Metastasierung über den Liquorweg tritt selten auf, noch seltener entstehen Fernmetastasen in Lunge oder Pleura.

Für die Genese des Glioblastoms wird angenommen, dass die Summe unterschiedlicher molekularer und zellulärer Veränderungen schließlich über eine Transformation von Vorläuferzellen zur Entstehung des Glioblastoms führt. Dazu gehören z.B.: Aktivierung von Onkogenen und deren Überexpression (gain of function Mutationen), Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (loss of function Mutationen), Veränderungen des Tumorsuppressorgens p53 bei sekundären Glioblastomen (Weber et al., 1996), Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 19 und dadurch Inaktivierung weiterer Tumorsuppressorgene (Nakamura et al., 2000), Amplifikation der Rezeptoren für epidermal growth factor (EGF)

sowie platelet derived growth factor (PDGF) (Bigner et al., 1990), Verlust der Homozygotie auf Chromosom 10 (Leon et al., 1994) oder auch homozygote Deletionen p16 (Nakamura et al., 2000).

Als Erklärung für die sehr starke Gefäßproliferation wird unter anderem eine Überexpression des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und seines Rezeptors diskutiert (Cheng et al., 1996). Die häufig im Tumor vorkommende Hypoxie begünstigt die Sekretion von VEGF und damit das Entstehen pathologischer Gefäße.

Die Fähigkeit zur massiven Invasion in benachbartes primär noch gesundes Gewebe erlangt das Glioblastom durch die Sekretion verschiedener Proteasen (Pilkington, 1994), deren Aktivität wesentliche Bedeutung für die Prognose besitzt.

Bei der klinischen Untersuchung finden sich Hirndruckzeichen wie Übelkeit, Erbrechen, Stauungspapille oder Kopfschmerz, zum Teil kommt es auch zu fokalen neurologischen Symptomen oder epileptischen Anfällen. Zur Diagnostik werden bildgebende Verfahren wie MRT und CT eingesetzt. Die endgültige Diagnose erfolgt durch die histopathologische Beurteilung von Biopsien bzw. operativen Resektaten.

Die chirurgische Tumorentfernung stellt die wichtigste Maßnahme zur Therapie dar. Ziel ist dabei die möglichst vollständige Tumorentfernung ohne Beeinträchtigung eloquenter Hirnareale, wobei die Radikalität des Eingriffs mit einer besseren Prognose korreliert (Lacroix et al., 2001).

Adjuvante Therapiemöglichkeiten sind die Strahlen- und Chemotherapie, wobei Chemotherapeutika wie z.B. BCNU, Vincristin oder Purinanaloga meist nach einer vorausgegangenen Bestrahlung verabreicht werden.

In den letzten Jahren wurden neue systemische Chemotherapie-Strategien z.B. mittels Temodal (Friedman et al., 2000) entwickelt, aber auch lokale Chemotherapeutika wie z.B. Gliadel-Wafer, die in die Tumorkavität eingebracht werden und sich dort langsam auflösen.

Die Prognose der Patienten mit Glioblastoma multiforme ist trotz dieser intensiven Bemühungen und der multimodalen adjuvanten Therapie weiterhin schlecht. Die mittlere Überlebensdauer beträgt 12 Monate. Günstige prognostische Faktoren sind: Patientenalter unter 40 Jahre, hoher Karnofsky-Index (70-100) und eine inhomogene Histologie mit Nachweis niedergradiger Areale.

Es lassen sich in seltenen Fällen so genannte „Langzeitüberlebende“ mit einer Überlebenszeit nach Diagnosestellung von mehr als 5 Jahren finden (Chandler et al., 1993). Allerdings haben sich in dieser Personengruppe bisher keine gemeinsamen histologischen Kriterien oder Chromosomenaberrationen finden lassen, die das Eingruppieren in „Langzeitüberleber“ schon bei der Erstoperation erlauben würde (Kraus et al., 2000).

Bedingt durch die schlechte Prognose wurden weitere, meist im experimentellen Stadium befindliche Therapieoptionen entwickelt, von denen bis heute noch keine einen Durchbruch in der Behandlung des Glioblastoms erzielen konnte. Zu diesen neueren Therapieansätzen zählen die Immuntherapie, die Therapie mit speziellen Antikörpern, Einflussnahme auf die Angiogenese des Tumors, Behandlung mit Boswelliasäuren (Winking et al., 2000) und die in der vorliegenden Studie näher untersuchte Suizidtherapie.

1.4. Suizidgenherapie

Die Suizidgenherapie beruht darauf, nichthumane Gene in Tumorzellen einzuschleusen, die für ein Enzym codieren. Nach Aufnahme des Gens in die Zielzelle und Expression des „fremden Enzyms“ wird in den Tumorzellen ein für den Menschen nichtgiftiges Prodrug in eine aktive, toxische Form umgewandelt, was in die Zerstörung, „den Suizid“, der Zelle mündet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Suizidgene.

Tabelle 5: Überblick über Suizidgene und ihre Genprodukte

Suizidgen + Quellorganismus	Suizidenzym	Prodrug	toxischer Metabolit	Beschreiber
HSV-TK Herpesvirus	Thymidinkinase	Ganciclovir	Ganciclovir-Triphosphat	Moolten et al. 1990
CD E.coli	Cytosindeaminase	5-Fluorcytosin	5-Fluoruracil	Ahmad und Pritchard, 1972
DeoD E.coli	Purinnukleosid-phosphorylase	Methylpurindesoxy-ribosid	6-Methylpurin	Sorscher et al. 1994

Die Suizidgene sollten so beschaffen sein, dass sie wenn möglich nicht humanen Ursprungs sind, oder die entstehenden Enzyme nur in geringer Quantität in gesunden, humanen Zellen enthalten sind, um eine systemische Nebenwirkung auf die Zellen des Wirtsorganismus zu vermeiden. Weiterhin sollten durch diese Therapie Tumorzellen selektiv abgetötet werden, während die gesunden, umgebenden Gehirnzellen unbeschadet bleiben. Hierzu bieten sich zwei Ansätze an:

- 1) Einsatz retroviraler Vektoren, die bevorzugt in sich rasch teilende Tumorzellen integrieren und zur Expression von Suizidgenen führen, während umgebende, postmitotische Gehirnzellen nicht tangiert werden.
- 2) Ausnutzung von Unterschieden in der Transkriptionsraten zwischen gesunden und tumorösen Zellen. Die Überexpression eines bestimmten Promotors innerhalb maligner Zellen kann z.B. die Umsetzung der Suizidgene bewirken.

Die Therapie mit Suizidgenen bietet theoretisch Vorteile gegenüber konventionellen Therapieformen. So muss beispielsweise nur ein Teil der Zellen das gewünschte Genprodukt exprimieren, um auch umliegende nicht transduzierte Zellen abzutöten. Diese Erscheinung wird Bystander-Effekt genannt.

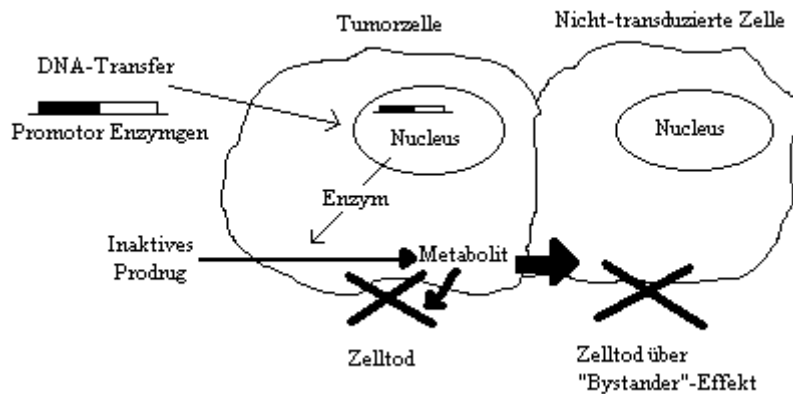


Abbildung 7 : Grundprinzip der Suizidgentherapie

1.4.1. Herpes simplex Thymidinkinase (HSV-TK) E.C. 2.7.1.21

Die Thymidinkinase stammt aus Herpes-Simplex-Virus Typ I (HSV), ist aber auch in humanen Zellen zu finden. Das Substrat (Prodrug) ist Ganciclovir (GCV), ein Derivat des Acyclovir, das in den 70er Jahren zur Therapie von HSV-Infektionen entwickelt wurde (Nishiyama und Rapp, 1979; Field et al., 1983). Haupteinsatzgebiet für die Verwendung des Ganciclovir ist heute die Infektion mit Cytomegalieviren (CMV), die vor allem bei immundefizienten Patienten und Immunsupprimierten auftreten kann. Die Thymidinkinase bewirkt eine Umwandlung des Ganciclovir in Ganciclovir-Monophosphat, das anschließend durch zelluläre Enzyme in die hochtoxische Triphosphatform überführt wird. Dieses Triphosphat kann die DNA-Polymerase inhibieren, die DNA-Kette unterbrechen und damit überwiegend Zellen in der S-Phase des Teilungszyklus töten (Mar et al., 1985). Die Spezifität für Ganciclovir ist bei der Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase sehr viel höher als bei der humanen Thymidinkinase (Roizman und Sears, 1996), so dass Ganciclovir gegenüber nichtsuizidgenexpressierenden Zellen in Dosen von 1-15 µg/ml nicht toxisch ist.

Die Thymidinkinase gehört bei der Gentherapie zu den Modellenzymen dieser Strategie und wurde bereits in zahlreichen Experimenten und sogar in klinischen Studien verwendet (Sturtz et al., 1997; Aghi et al., 1998; Klatzmann et al., 1998; Shand et al., 1999; Nestler et al., 2004).

1.4.1.1. Ganciclovir (Cymeven®)

Haupteinsatzgebiet ist eine schwere oder lebensbedrohliche CMV-Infektion. Ganciclovir hemmt als Nukleosidanalogen die virale DNA-Polymerase und damit die DNA-Synthese der Zytomegalieviren. Die Verabreichung sollte durch Injektion oder Infusion erfolgen, da die orale Bioverfügbarkeit gering ist.

Als Nebenwirkungen bei der Anwendung von GCV sind vorwiegend Neutropenien, Magen-Darm-Störungen, Krämpfe und Leberenzymveränderungen zu beachten. Wechselwirkungen können vor allem bei gleichzeitiger Gabe von Amphotericin B, Flucytosin, Vincristin und Vinblastin auftreten. GCV sollte nicht bei Schwangeren, Kindern oder Patienten mit bereits bestehender Neutropenie angewendet werden.

1.4.2. Cytosindeaminase (CD) E.C. 3.5.4.1.

Die Cytosindeaminase ist in einigen Bakterien und Pilzen zu finden. Die am häufigsten verwendete Cytosindeaminase stammt aus *E. coli* (Danielsen et al., 1992). Dieses Enzym wandelt das nicht toxische Prodrug 5-Fluorcytosin (5-FC) in das toxische 5-Fluoruracil (5-FU) um, das als Chemotherapeutikum bekannt ist und insbesondere bei Kolonkarzinomen

Verwendung findet. 5-Fluoruracil wird zu 5-Fluoruridin, seinem 5'-Triphosphat und 5-Fluoro-2'-deoxyuridin-5'-Monophosphat metabolisiert und führt zu Veränderungen in der DNA- und RNA-Synthese. Menschliche Zellen setzen das 5-FC nur langsam um, so dass keine nennenswerte systemische Toxizität besteht. 5-FC wird z.B. bei Candidainfektionen eingesetzt.

1.4.2.1. 5-Fluorcytosin (Ancotil®)

5-FC ist ein Fungistatikum, das bei generalisierten Candidainfektionen angewendet wird. Die Wirkung ist auf Pilze beschränkt, die das Enzym Cytosindeaminase bilden, und somit den toxischen Metaboliten bilden. Die Verabreichung erfolgt durch Infusion um ausreichende Wirkstoffspiegel zu erzielen.

Bei der Anwendung von 5-FC können Nebenwirkungen wie Magen-Darm-Störungen, allergische Reaktionen, Panzytopenien, Leberenzymveränderungen und Nephrotoxizität auftreten. Diese Nebenwirkungen können durch gleichzeitige Anwendung von Zytostatika verstärkt werden.

1.4.3. Purinnukleosidphosphorylase (PNP) E.C. 2.4.2.1

Die Purinnukleosidphosphorylase ist ein Produkt des DeoD-Gens aus *E. coli* (Sorscher et al., 1994). Das Enzym kommt nicht nur in Bakterien vor, sondern auch in humanen Zellen wie z.B. Erythrozyten und lymphatischem Gewebe. Ein genetischer Defekt der humanen Purinnukleosidphosphorylase führt zu Veränderungen sowohl der T- als auch der B-zellulären Abwehr, so dass Betroffene schon kurz nach der Geburt an schwersten Infektionen erkranken (Markert, 1991).

Die Purinnukleosidphosphorylase aus *E. coli* unterscheidet sich in ihrem Bindungsverhalten deutlich von der humanen Variante (Bzowska et al., 1990) und auch die bei der Suizidgentherapie eingesetzten Prodrugs besitzen nur eine geringe Affinität zur humanen Purinnukleosidphosphorylase (Mao et al., 1997), so dass die Prodrugumsetzung hauptsächlich in transduzierten Zellen erfolgt.

Das Enzym besitzt eine Reihe von Substraten, die sich in der Effektivität der Umsetzung und ihrer Aktivität unterscheiden (Secrist et al., 1999). Ein wesentliches Substrat ist das 6-Methylpurindesoxyribosid (6-MPdR), das durch die Purinnukleosidphosphorylase zu 6-Methylpurin (6-MP), einem Zytostatikum der Gruppe der Purinanaloga umgesetzt wird. Dies beeinflusst die zelluläre DNA- und RNA-Synthese und damit auch die Proteinsynthese (Parker et al., 1998). Da sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen die Proteinsynthese für ihr Überleben benötigen, werden beide Zellpopulationen geschädigt.

1.4.4. Bystander-Effekt

Dieser Effekt bezeichnet den Sachverhalt, dass auch Zellen zu Grunde gehen, die nicht transduziert wurden. Dies ist von wesentlicher Bedeutung, da die gentherapeutische Transduktionsrate und damit die Expressionsrate der Suizidgene oftmals auf einen geringen Prozentsatz (ca. 5%) der Zielzellen beschränkt ist.

Über die möglichen Ursachen für diesen Effekt existieren einige Hypothesen, die bisher nicht verifiziert werden konnten:

(1) Benachbarte Zellen können Moleküle mit geringem Molekulargewicht durch gap-junctions, die aus Connexinen gebildet werden, austauschen, wodurch das aktivierte Prodrug von der transduzierten Zelle auf eine benachbarte Zelle übergeht, und diese dann abtötet (Bi et al., 1993). Voraussetzung ist allerdings ein enger Zell-Zell-Kontakt.

Die wesentlichen Connexine sind das Connexin-26 und Connexin-43. Werden sie stark exprimiert, so kann der Bystander-Effekt vor allem in Systemen die auf Thymidinkinase/Ganciclovir basieren, verstärkt werden (Estin et al., 1999).

(2) Kommt es in der Zelle zu einer Umwandlung von Ganciclovir in seine Triphosphatform, so wird die Apoptose der Zelle induziert (Beltinger et al., 1999). Das Triphosphat kann dann in apoptotische Vesikel verpackt und von nicht transduzierten Zellen via Phagozytose aufgenommen werden. Damit sterben auch diese Zellen ab (Freeman et al., 1993).

(3) Der aktive Metabolit könnte frei von einer Zelle zur nächsten diffundieren und damit zum Absterben der Zellen führen. Dies ist sowohl für 5-Fluoruracil (Huber et al., 1994; Domin et al., 1993) als auch 6-Methylpurin beschrieben worden (Hughes et al., 1998).

Am genauesten untersucht ist der Bystander-Effekt für die Thymidinkinase (Chen et al., 1995; Nicholas et al., 2003). Lässt man Tumorzellen in hoher Dichte in vitro wachsen und transduziert HSV-TK, so werden nicht nur die Zellen, die Thymidinkinase exprimieren durch die Umsetzung des Ganciclovir abgetötet, sondern auch thymidinkinasenegative Zellen. Gleiches gilt für die Anwendung in vivo (Freeman et al., 1992). Dieser Effekt tritt bereits bei einer Transduktionsrate von 10 % auf (Freeman et al., 1993).

Für die Cytosindeaminase wird ebenfalls ein Bystander-Effekt beschrieben. Hier scheinen nur 2 % der Zellen effektiv transduziert sein zu müssen, damit auch die nicht erreichten Zellen abgetötet werden (Huber et al., 1994).

Den stärksten Bystander-Effekt zeigt das Purinnukleosidphosphorylase-System. Wird PNP in nur 1/100 bis 1/1000 der Zellen exprimiert, so können alle Zellen einer Population abgetötet werden (Gadi et al., 2000). Dabei wird das Prodrug von den transduzierten Zellen umgesetzt und das Produkt in das umgebende Medium abgegeben, ohne seine Aktivität zu verlieren (Hughes et al., 1998).

1.4.5. Vektoren für Suizidgentherapie

Die für gentherapeutische Zwecke derzeit eingesetzten Vektoren lassen sich in nichtinfektiöse und infektiöse untergliedern.

Nichtinfektiöse Vektoren:

- Direkte Injektion von DNA in Zellen

Dies ist die direkteste Form des Transfers von genetischem Material in eine Zelle. Dabei muss berücksichtigt werden, dass nicht alle Gewebstypen erreicht werden und keine Tumorselektivität besteht. Mit dieser Methode konnten z.B. Mäuse gegen Influenza Typ A immunisiert werden (Ulmer et al., 1993).

- "Gene gun"

Diese Methode wurde ursprünglich für Pflanzen entwickelt. Mit DNA-Vektor beschichtete Wolfram- oder Goldpartikel werden dabei mittels des „Gene gun“ in das gewünschte Gewebe eingebracht (Yang et al., 1990). Die Energie zum Einbringen der DNA stammt entweder aus explosiven Ladungen, komprimierten Gasen oder aus einem elektrischen Feld. Am einfachsten lässt sich diese Methode auf Körperoberflächen realisieren.

- Calciumphosphatvermittelte Transfektion

Bis zur Einführung des liposomalen Gentransfers war dies die Standardmethode, um DNA in Säugerzellen einzubringen. Dafür wird gereinigte DNA mit Calciumchlorid in Anwesenheit

von Phosphat gemischt und die so entstandenen Präzipitate werden dann von den Zielzellen durch Endocytose aufgenommen (Graham und Van der Eb, 1973). Die Transfektion ist sehr effizient, kann jedoch nicht in vivo angewandt werden.

- Liposomaler Gentransfer

Polykationische Lipide werden mit Plasmid-DNA gemischt und formen dabei liposomale Partikel (Mizellen), die sich an der Zellmembran der entsprechenden Zellen anlagern und aufgenommen werden. Wesentliche Vorteile sind die hohe Transfektionseffizienz in vitro, die Möglichkeit der in vivo Anwendung, leichte Herstellung, die Stabilität und die fehlende Beschränkung auf bestimmte Zellarten. Des Weiteren sind die geformten Komplexe nicht toxisch oder immunogen, was eine wiederholte Applikation erlaubt (Nabel et al., 1992; Stewart et al., 1992).

- Liganden/DNA-Konjugate

Hier bilden sich Komplexe aus Plasmid-DNA und Polylysinen. An die Polylysinteile können verschiedene Liganden gebunden werden, die mit Zellrezeptoren interagieren. Kommt es zu einer Rezeptorbindung des Liganden, so wird dieser und damit gleichzeitig der Fremdgen-Plasmidkomplex via Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch die Endozytose befindet sich der Komplex zunächst noch in einem Phagosom, so dass noch weitere Schritte und Veränderungen notwendig sind, bis das Fremdgen zur Expression kommen kann. Die Methode ist durch die Rezeptorbindung ein Weg hin zu einer gezielteren Therapie bestimmter Zellpopulationen.

Infektiöse Vektoren:

Die derzeit am häufigsten verwendeten Vektoren sind viralen Ursprungs. Dabei handelt es sich vor allem um Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierte Viren.

Der wesentliche Vorteil viraler Vektoren ist, dass in vitro und in vivo ein hoher Prozentsatz an Zielzellen erreicht werden kann (Culver et al., 1992; La Salle et al., 1993; Mitani et al., 1994). Nachteilig ist die mögliche Integration der genomischen Information des Vektors in die DNA der Wirtszelle. Hierdurch besteht die Möglichkeit der Vektorrekombination, was theoretisch in die Induktion eines Zweitmalignoms oder leukämischer/lymphatischer Aberrationen münden kann (Gunter et al., 1993). Des Weiteren können Rekombinationen entstehen, die dann z.B. zur Bildung von infektiösen Viren führen. Diese könnten sich in vivo weiter replizieren und eine Infektion des Wirtes hervorrufen. Ebenfalls nachteilig ist die Möglichkeit der Induktion einer Autoimmunkrankheit durch die ausgelöste T-zelluläre Immunantwort (Yang et al., 1994).

Für den Gentransfer in das ZNS werden vor allem die auf Herpes-Simplex-Viren basierenden und die adenoviralen Vektoren eingesetzt (Hermens und Verhaagen, 1998). Wesentliche Probleme bei deren Einsatz sind immunologische Hindernisse und das Problem der gezielten, tumorspezifischen Therapie.

- Retroviren

Es handelt sich um behüllte, einsträngige RNA-Viren, deren Genom eine Größe von ca. 7-10 kb hat. Wesentliche Proteine des Virus sind die reverse Transkriptase, die virale Protease und die Integrase. Unter der Wirkung der reversen Transkriptase wird in der infizierten Zelle auf der Basis der RNA eine doppelsträngige DNA gebildet, die dann wiederum als Template für die Synthese viraler RNA dient. Die Integrase sorgt für den nukleären Transport und ist wesentlich an der Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle beteiligt.

-Adenoviren

Diese Viren, die beim Menschen eine große Anzahl von Infektionen wie z.B. Keratokonjunktivitis, Gastroenteritis und respiratorische Infekte hervorrufen können sind unbehüllt und besitzen ein Doppelstrang DNA-Genom von 36 kb. Sie sind in der Lage, eine große Anzahl verschiedener Zellen zu infizieren und zwar sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen.

-Adenoassoziierte Vektoren

Sie gehören in die Familie der Parvoviren, haben ein lineares einsträngiges DNA-Genom (Rose et al., 1969) und führen beim Menschen zu keinen Erkrankungen. Ähnlich den Retroviren integrieren sie ihr Genom, dieses wird jedoch reproduzierbar auf dem menschlichen Chromosom 19 eingefügt (Kotin und Berns, 1989). Adenoassoziierte Viren werden als defekte Viren bezeichnet, da sie für eine produktive Infektion Funktionen von Helferviren, wie z.B. Adeno- oder Herpesviren, benötigen. Fehlen diese Helferfunktionen, so wird die Zelle zwar infiziert, doch das integrierte Genom ruht in der Zelle (latente Infektion).

-Herpes Simplex Virus Vektoren

Hierbei handelt es sich um ein umhülltes Virus mit Doppelstrang-DNA-Genom (152 kb), das in der Lage ist, viele verschiedene Zellarten zu infizieren, wobei die Infektion entweder lytisch mit Zelluntergang oder latent abläuft. Diese Latenz, die vor allem in Neuronen beobachtet wird, begünstigt eine stabile, längere Expression im ZNS (Carpenter und Stevens, 1996).

-weitere RNA-Viren

Einige Besonderheiten dieser Gruppe von Viren machen sie für die gentherapeutische Anwendung interessant. Sie haben ein relativ kleines Genom (7-19 kb), was die Bildung von cDNA-Klonen erleichtert, sie amplifizieren und transkribieren ihr Genom ausschließlich im Zytoplasma der Zelle, wobei keine DNA-Äquivalente entstehen und damit keine Integration in das Wirtszellgenom erfolgt. Des Weiteren ist die Genexpression im Zytoplasma nur vorübergehend, so dass diese Vektoren sich für eine Kurzzeittherapie, wie z.B. eine Suizidgentherapie eignen.

Man unterscheidet:

- Positivstrang RNA-Viren (z.B. Picornaviren)

Die „nackte“, unbehüllte RNA sorgt für eine suffiziente Infektion entsprechender Zellen, wobei das Genom intrazellulär nur als mRNA erkannt wird und deswegen direkt in virale Proteine translatiert wird.

- Negativstrang RNA-Viren (z.B. Influenzavirus)

Im Gegensatz zu den Positivstrang-Viren ist die „nackte“ RNA als solche, wenn sie in eine Zelle eingebracht wird, nicht infektiös. Um biologische Aktivität zu erlangen muss sie zusammen mit ihrer eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase Ribonukleoproteine bilden. Erst diese Ribonukleoproteine dienen als Template zur weiteren Synthese von cRNA und vRNA bzw. mRNA.

1.5. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen ein bakterieller Vektor, nämlich *Listeria monocytogenes* verwendet, zum anderen ein auf Influenza basierendes liposomales und damit nichtinfektiöses Vektorsystem.

Ziel der Arbeit war die experimentelle Charakterisierung und Beschreibung dieser zwei Gentherapie-Vektorsysteme.

1. *Listeria monocytogenes*
Etablierung und Optimierung eines Gentransferprotokolls mittels der apathogenen Variante *Listeria innocua* und des Plasmids pSOG3012 in Zellkulturen von primären Glioblastomzellen.
2. Influenza-ähnliches System
Klonierung dreier Suizidgenvektoren, Etablierung eines auf dem 5-Plasmid-System basierenden Transfektionsprotokolls und experimenteller Vergleich von Transduktionsraten und Therapieerfolg der drei Suizidenzymssysteme in Zellkultur.

2. Materialien

Geräte :

Zell- und Bakterienkultur:

- 37 °C CO₂-begasbarer Brutschrank (Heraeus, Hanau)
- 37 °C Bakterienbrutschrank (Heraeus, Hanau)
- Hera Safe Sterilbank (Heraeus, Hanau)
- Schüttelinkubator (37 °C)
- Pipettboy Hirschmann
- Absaugpumpe

Zentrifugen:

- Beckman J 21-B Kühlzentrifuge (Fullerton, CA, USA)
- Biofuge haemo (Heraeus, Hanau)
- Biofuge R15 (Heraeus, Hanau)
- Biofuge R15 B(Heraeus, Hanau)

optische Geräte:

- Inverses Zellkulturmikroskop Leica DMIL (Leitz, Wetzlar)
- Leica Mikroskop DMRB mit Fluoreszenz- und MPS 28 Fotoeinrichtung (Leitz, Wetzlar)
- ASA 400 Filme (Fa.Kodak)

Molekularbiologie:

- Uno-Thermoblock(PCR) (Biometra, Göttingen)
- TI 1 Transluminator (Biometra, Göttingen)
- Gelelektrophoresekammer (Biometra, Göttingen)
- Gene Pulser zur Elektroporation (BioRad, Richmond CA, USA)
- Gene Quant DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Waagen:

- 1R12 MP (Sartorius, Goettingen)
- AT201 (Mettler Toledo, Giessen)

Sonstiges:

- Microplate Autoreader EL310 Bio-Tec Instruments
- Vortexgerät (Heidolph, Nürnberg)
- Magnetrührer MR 3001 (Heidolph, Nürnberg)
- Kühlschranks +4 °C (Bosch)
- Kühltruhen -20° C (Liebherr und Siemens)
- Universalmikrowellengerät (Privileg)
- Eppendorfpipetten (0,5-10 µl ; 10 –100 µl ; 100 –1000 µl)
- Peacock-Computer Pentium I 200 MHz
- Drucker : HP Deskjet und Fujiitsu

- Chemikalien:

Chemikalie	Erläuterung	Bezug
Agarose		Gibco BRL (Karlsruhe)
Alamar blue	Zellproliferationsindikator	Serotec (Eching)
Alkalische Phosphatase	Enzym	Boehringer (Mannheim)
Ancotil	5-Fluorcytosin (10 µg/µl) Antimykotikum	ICN Pharmaceuticals (Frankfurt)
Aqua dest.		Baxter SA (Lessines, B)
Borsäure		Merck (Darmstadt)
Cymeven	Ganciclovir-Trockenpulver (5µg/µl)	Hoffmann-La Roche (Basel, CH)
Dimethylformamid		SIGMA (St. Louis MO, USA)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
DMSO	Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
dNTP's	Desoxyribonukleotide für PCR	SIGMA (St.Louis MO, USA)
EDTA	Dinatriumethyldiamintetra- acetat	SIGMA (St.Louis MO, USA)
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetraacetat	SIGMA (St.Louis MO, USA)
Ethanol		SIGMA (St.Louis MO, USA)
Ethidiumbromid (EtBr)		Roth (Karlsruhe)
FCS	Fötales Kälberserum für die Zellkultur	Gibco BRL (Karlsruhe)
Glutaraldehyd	Fixationslösung	SIGMA (St.Louis MO, USA)
Glyceringelatine	Zum Eindecken von Deckgläschen	Merck (Darmstadt)
HEPES	N-2 [Hydroxyethyl]piperazin-N'- 2-Ethansulfonsäure	SIGMA (St.Louis MO, USA)
Isopropanol	n-Propanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat		Merck (Darmstadt)
KOH pH 8,0	Kalilauge	Merck (Darmstadt)

Chemikalie	Erläuterung	Bezug
Lysozym	Enzym	SIGMA (St. Louis MO, USA)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Moviol 4-88	Zum Eindecken von Deckgläschen	Merck (Darmstadt)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat		Merck (Darmstadt)
NaOH	Natronlauge	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Fixationslösung	SIGMA (St. Louis MO, USA)
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2- ethansulfonsäure); Puffer	SIGMA (St. Louis MO, USA)
10 x Taq Polymerase Puffer		Perkin Elmer Norwalk, CT, USA
SMMP	Bakterienmedium	SIGMA (St. Louis MO, USA)
Taq Polymerase	DNA Polymerase	Perkin Elmer Norwalk, CT, USA
Tris	Pufferlösung	SIGMA (St. Louis MO, USA)
1 x Trypsin/EDTA	Für Zellkultur	PAA Laboratories (Linz, Austria)
x-Gal	Färbelösung für β -Galaktosidase	SIGMA (St. Louis MO, USA)

-Antibiotika:

- Ampicillin (50 μ g/ μ l) Gibco BRL (Karlsruhe)
- Erythromycin (5 μ g/ μ l) SIGMA (St. Louis MO, USA)
- Gentamycin (50 μ g/ μ l) Gibco BRL (Karlsruhe)
- Penicillin/Streptomycin (10 μ g/ μ l) ICN Pharmaceuticals (Frankfurt)
- Tetracyclin (10 μ g/ μ l) SIGMA (St. Louis MO, USA)

- Molekulargewichtsmarker (MGM):

(Bezug: Sigma St. Louis MO, USA)

- Lambda DNA BstE1 Digest : 8.454, 7.242, 6.369, 5.686, 4.822, 4.324, 3.675, 2.323
1.929, 1.371, 1.264, 702, 224, 117 bp
- 1kb DNA-Leiter : 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

- Restriktionsenzyme :

Mit Ausnahme von Mun I (Gibco BRL, Karlsruhe) Bezug von New England Biolabs
(Beverly, MA, USA)

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Puffer Inkubationstemperatur
Bsa I	...GGTCTC(N)1//... ...CCAGAG(N)5//...	NEB 3 oder NEB 4 50 °C
BsmB I	...CGTCTC(N)1//... ...GCAGAG(N)5//...	NEB 3 55°C
Eco R I	...G//AATTC... ...C TTAA//...	NEB 1-4 37 °C
Hind III	...A//AGCTT... ...T TCGAA//...	NEB 2 37 °C
Mun I	...C//AATT G... ...G TTAA//C...	React 1 Puffer 37 °C
Not I	...GC//GGCC GC... ...CG CCGG//CG...	NEB 3 37 °C
Pst I	...C TGCA//G... ...G//ACGT C...	NEB 3 37 °C
Sal I	...G//TCGA C... ...C AGCT//G...	NEB 1 37 °C
Xba I	...T//CTAG A... ...A GATC//T...	NEB 2 37 °C
Xho I	...C//TCGA G... ...G AGCT//C...	NEB 2 37 °C
Xmn I	...GAANN//NNTC... ...CTTNN//NNAG...	NEB 2 37 °C

- KITS :

- Agarose DNA Gel Extraction Kit (Boehringer, Mannheim)
- GFX Plasmid Mini PräpKit (Amersham Pharmacia)
- High Pure PCR-Purification Kit (Boehringer, Mannheim)
- Lipofektamin Plus Transfection Kit (Gibco BRL, Karlsruhe)
- Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer, Mannheim)
- Qiaprep Spin Mini Prepkits (Qiagen, Hilden)
- Qiaprep Midi Prepkits (Qiagen, Hilden)

- Medien/ Puffer und Lösungen :

- SOB-Medium : 2% Bactotrypton (Gibco BRL, Karlsruhe)
0,5 % Bacto Yeast Extract (Gibco BRL, Karlsruhe)
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂ (Hexahydrat)
10 mM MgSO₄ (Heptahydrat) (SIGMA, St. Louis MO, USA)
10 mM NaCl
ad 1000 ml Aqua dest.

Durch die Zugabe von 1 M KOH auf einen pH von 6,7-7,0 einstellen.

Will man SOC-Medium herstellen, so werden zusätzlich zu dem oben genannten Ansatz 20 mM Glucose hinzugefügt.

- LB-Medium (Luria-Bertani): 10,0 g Bactotrypton (Gibco BRL, Karlsruhe) 10,0 g NaCl 5,0 g Hefeextrakt ad 1000 ml Aqua dest.
- 2 YT-Medium : 16,0 g Select Pepton 140 (Gibco BRL, Karlsruhe) (Gibco BRL, Karlsruhe) 10,0 g Hefeextrakt (Gibco BRL, Karlsruhe) 5,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua.dest
- BHI-Medium : 37 g Brain-Heart-Infusion (Difco) ad 1000 ml Aqua.dest
- DM3 Regenerationsplatten (für Listerien):
200 ml 5 %-iger Agar, 500 ml 1 M Succinat, 100 ml Pepton 140, 60 ml 10 %-iges Hefe-Extrakt, 100 ml 3,5 %-iges K_2HPO_4 und 1,5 %-iges KH_2PO_4 , 10 ml 50 %-ige Glukose, 20 ml 1 M $MgCl_2$ und 5 %-iges BSA ; alle Lösungen in Aqua dest.
Alle Lösungen mit Ausnahme des BSA werden auf 50 °C erwärmt, gemischt und dann mit Erythromycin in einer Endkonzentration von 5 µg/ml versetzt.
- Zellkulturmedium: 500 ml DMEM 50 ml Fetales Kälberserum (FCS) (komplementinaktiviert durch 30 min Inkubation bei 56 °C) 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Puffer :
- TB: 15 mM $CaCl_2+2H_2O$ 250 mM KCl 15-20 ml 1M KOH 55 mM $MnCl_2 \times 4H_2O$ 10 mM PIPES Disodium salt ad 1000 ml Aqua dest. pH 6,9 einstellen und steril filtrieren
- 0,5M EDTA pH8,0 186,1 g Dinatriummethylen-diamintetraacetat in 800 ml Aqua.dest durch Zugabe von KOH auf pH8, 0 einstellen Aqua dest. ad 1000 ml Sterilfiltration
- 5 x TBE: 54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA 0,5M pH 8,0 ad 1000 ml Aqua dest.
- PBS : 7,1 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

1,3 g Kaliumhydrogenphosphat
36 g Natriumchlorid
in 500 ml Aqua dest. Auflösen

sonstige Lösungen:

0,125 % Glutaraldehyd : 125 ml Glutaraldehyd
ad 1000 ml 0,15M PBS
Lagerung bei +4°C

2 % Paraformaldehyd : 313µl 0,5M EGTA in Aqua bidest. (pH 8,0)
2ml 1M MgCl₂ in Aqua bidest.
1M NaOH (pH-Justierung)
20 g Paraformaldehyd
32,4 g PIPES Disodium salt
ad 1000 ml Aqua dest.
pH 6,9; bei +4°C lagern

Waschlösung: 1 ml 1M MgCl₂ in Aqua bidest. ad 500 ml PBS

Färbelösung: 50 mg X-Gal gelöst in 1,5 ml N,N-Dimethylformamid
Lagerung bei -20°C

Mixer-Lösung: 0,16 g K₃Fe(CN)₆
0,21 g K₄Fe(CN)₆
41 µl 1M MgCl₂ in Aqua bidest.
10 µl 0,01 % Natrium-Desoxycholat in Aqua bidest.
20 µl Triton X-100

- Bakterienstämme :

Escherichia coli DH10 β (Gibco BRL, Karlsruhe)

Genotyp: F',mcrAΔ-(mrr-hsdRMS-mcrBC),φ80dlacZΔM15,ΔlacX174,deoR,recA1,φaraD139(ara,leu)7697,
galU,galK,λ',rpsL,endA1,nupG

Escherichia coli XL-1 blue (Stratagene Europe, Amsterdam NL)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q Z ΔM15 Tn10(Tet^r)]

Listeria-Typ-Stämme

Listeria monocytogenes EGD Serotyp ½ a
Listeria innocua ATCC 330091 Serotyp 6b

Mutante die im Rahmen der Arbeit erstellt wurde: Listeria monocytogenes pCS1(LacZ)

- Zellen :

Die kommerziell erhältlichen Linien stammen aus der American Type Cell Culture(ATCC)-
Collection (Manasses, VA, USA)

- U87-MG, U373, A172 humane Glioblastomzelllinien
- 293 T: primäre humane embryonale Nierenepithelien, transformiert mit Adenovirus 5 DNA
- Glioblastomkulturen aus Op-Präparaten der neurochirurgischen Klinik

- Plasmide :

pcDNA3.1+ Invitrogen Europe CH Groningen, NL. Kontrolle durch CMV-Promotor und Ampicillinresistenz. Enthält SV40-Signal.

pCMV β Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA. Enthält das Gen für die β -Galaktosidase(LacZ) von E.coli unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und eine Ampicillinresistenz.

poll

(Mit freundlicher Genehmigung aus dem Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen ; Herr PD Dr. Stephan Pleschka)

pSOG3012

(Mit freundlicher Genehmigung aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen ; Frau Dr. Sonja Otten)

3. Methoden

3.1. Zellkultur kommerzieller Zelllinien (A172, U87, U373, 293T)

Die Zellen werden in 15 ccm Kulturfläschchen bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit Zusatz von 5% CO₂ kultiviert und in regelmäßigen zeitlichen Abständen bei Konfluenz des Zellrasens folgendermaßen geteilt:

1. Medium absaugen
2. 2 ml Trypsin hinzugeben und Fläschchen kurz schwenken
3. 1,5 ml des Trypsins entfernen
4. 10 min inkubieren
5. 4,5 ml Zellkulturmedium hinzugeben und resuspendieren
6. Je nach gewünschtem Teilungsverhältnis Zellsuspension entnehmen und diesen Anteil durch frisches Medium ersetzen

Bei fehlender Konfluenz des Zellrasens wird nur das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

3.2. Zellkultur von OP-Präparaten

Während der operativen Entfernung eines Glioblastoms können neben histologischen Präparaten Tumorbiopsien zur Anzucht von Zellkulturen entnommen werden.

Das Material wird in 10 ml Medium/Trypsin im Verhältnis 1:1 aufgenommen und wie folgt weiterbehandelt:

1. Zerkleinerung des Biopsates (z.B. durch Sieben)
2. Überführung in ein 15 ml Greiner-Röhrchen
3. Zentrifugation 1000 rpm 5 min
4. Überstand absaugen und durch frisches Medium ersetzen
5. Resuspendieren
6. weiter wie unter Punkt 3-5 beschrieben
7. erneute Zentrifugation 1000 rpm 5 min
8. Überstand absaugen und durch 5 ml Medium ersetzen
9. Resuspendieren und in ein 15 ccm Zellkulturfläschchen überführen

Nachdem diese Primärkultur angewachsen ist, kann in der Zellkultur wie unter 3.1 beschrieben verfahren werden.

3.3. Zählkammer

Um die Zellen in entsprechender Dichte z.B. in 24- oder 6- Lochplatten aussäen zu können muss zunächst deren Anzahl ermittelt werden. Dazu wird durch Trypsinisieren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Der je nach Teilungsverhältnis entnommene Anteil wird allerdings nicht verworfen sondern in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gefüllt. Daraus entnimmt man nach kurzer Resuspendierung 10 µl und befüllt damit eine vorbereitete Neubauer Zählkammer. Diese wird unter ein Zellkulturmikroskop gelegt und folgendermaßen ausgezählt: Es werden 4 Quadranten zu 16 Feldern ausgezählt woraus sich die Summe N ergibt.

$$\text{Zellzahl/ml} = N/4 \times 10^4$$

3.4. Zytotoxizitätsversuche

1. Die Einzellzellsuspension wird auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt und je ein ml in eine Vertiefung einer 24 well Platte pipettiert.
2. Inkubation bis zur Semikonfluenz bei 37 °C
3. Medium absaugen und durch frisches ersetzen
4. Testsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen hinzupipettieren
Je ein Well pro Reihe untherapiert (Kontrolle)
5. Inkubation bei 37 °C bis in den unbehandelten Kontrollwells vollständige Konfluenz vorhanden ist
6. Auswertung mit Alamar-Blue-Assay (3.5.)

3.5. Alamar-Blue-Assay

Funktionsprinzip des Alamar-Blue-Assays:

Alamar blue ist ein nicht toxischer Indikator für den Zellmetabolismus. Die während des Zellstoffwechsels freiwerdenden Protonen führen zu einer Reduktion des Alamar-Blue und damit sowohl zu einem Farbumschlag von blau nach rosa als auch zu einer Änderung des Fluoreszenzverhaltens. Die Zellen müssen den Indikator aktiv aufnehmen und umsetzen. Das bedeutet, dass tote, nicht proliferierende Zellen ihn nicht aufnehmen und der Indikator in seiner ursprünglichen blauen Farbe bestehen bleibt.

Die Absorption bei 630 nm kann als Maß der Stoffwechselaktivität herangezogen werden. (maximaler Absorptionswert, der 100 % stoffwechselinaktiven Zellen entsprechen würde: 0,265). Je höher die Absorption desto mehr Zellen sind abgestorben.

Vorgehen:

1. Medium von der 24 Wellplatte absaugen
2. 1 ml/Well frisches Medium hinzufügen
3. 100 µl/ Well Alamar-Blue
4. Inkubation bei 37 °C
Inkubationsdauer abhängig vom Zellmetabolismus ca. 16 – 24 h
5. 2 x 100 µl/Well in eine 96 well Platte unter Schonung des Zellrasens überführen
6. Messung der Absorption bei 635 nm

3.6. Molekularbiologie

3.6.1. PCR

Folgende Gene wurden mittels PCR amplifiziert:

Gen	Template
GFP	pEGFP-N1
PNP	E.coli DeoD
TK	HSV 108
CD	Chromosomale DNA E.coli K12

Die PCR-Primer (MWG Ebersberg) für eine Klonierung in das Plasmid pCMVβ (Listerien) enthalten Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease Not I. Durch diese Not I

Schnittstelle wird es möglich, nach einem Restiktionsverdau Sticky-Ends zu erhalten, die eine Ligation in das Plasmid ermöglichen.

PNP fw atttctcattgcgccgcatggctacccacacatt
PNP bw cccatcggtagcggccgcttactctttatcgcccage

CD fw gtttgcaactgcgccgcatgtcgaataacgcttta
CD bw ataagctgtagcggccgctcaacgtttgtaatcg

TK fw ccgattgactgcgccgcatggcttcgtaccctgc
TK bw tgcttcggtagcggccgctcaagttagcctccccatc

GFP fw gtttgcaaatgcgccgcatgtcgaataacgattta
GFP bw gatctagagtgcggccgcttacttgtaaagctcgtc

Für die Ligation in pcDNA3.1+ (Influenza) befindet sich im Vorwärtsstrang eine Schnittstelle für die Endonuklease Hind III und im Rückwärtsstrang eine für Xba I.

GFP fw catgttcatttgcggccgcatggtagcaagggcga
GFP bw gatctagagtgcggccgcttacttgtagcgtcgc

PNP fw ggcaaagcttcgtctcagccagcaaaagcagggtgacaaagacataatggctacccacacattaatgcag
PNP bw gacgtctagacgtctcctattagtagaacaagggtgtttttattactctttatcgcccagcagaacgg

CD fw ctcaagcttggtctcagccagcaaaagcagggtgacaaagacataatgtcgaataacgctttacaaac
CD bw caaatctagaggtctcctattagtagaacaagggtgtttttattatcaacgtttgtaatcgatggcttc

TK fw ctctaagcttcgtctcagccagcaaaagcagggtgacaaagacataatggcttcgtaccctgccatc
TK bw ctactctagacgtctcctattagtagaacaagggtgtttttattatcagttagcctccccatc

Dazu werden Reaktionsansätze von 50 µl Volumen wie folgt pipettiert:

- 1 µl Template
- 0,5 µl Primer forward
- 0,5 µl Primer backward
- 2 µl dNTP's
- 5 µl 10 x Puffer
- 0,25 µl Taq DNA-Polymerase
- 40,50 µl H₂O

Die DNA wird nach Erwärmung des Thermocyclers auf 95 °C (2 min) in Zyklen bestehend aus drei Schritten amplifiziert. Die Denaturierung der DNA erfolgt 45 Sekunden lang bei 95°C, die Anlagerung der Primer über 45 Sekunden bei 55°C und für die Vervielfältigung der DNA wurde die Temperatur des Reaktionsgemisches 1 Minute lang bei 72 °C gehalten. Diese Zyklen werden 30mal wiederholt, um eine entsprechende Menge DNA zu erhalten. Abschließend erfolgen eine Inkubation bei 72 °C für 15 Minuten und Kühlung auf 4°C.

3.6.2. Agarosegelelektrophorese

Dies ist ein Verfahren mit dem sich DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld auftrennen lassen. Die DNA ist durch die Phosphatgruppen in ihrem Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat

negativ geladen und wandert dadurch im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Faktoren wie z.B. der Molekülgröße, der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration im Gel bestimmt.

Durchführung:

1. Herstellung eines 1%-igen Agarosegels:
 - a) Zu 500 mg Agarose 50 ml TBE-Puffer geben
 - b) Unter ständigem Rühren aufkochen lassen
 - c) 5µl EtBr hinzugeben
 - d) Etwas Abkühlen lassen, in die Gelkammer füllen und abbinden lassen
2. Das Gel mit 1xTBE-Puffer bedecken
3. 5µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 2µl loading buffer vermischen
4. Geltaschen mit den PCR-Produkten bzw. kommerzieller „DNA-Leiter“ befüllen
5. Anlage der Spannung (40mA)

Die DNA im Gel wird mittels Fluoreszenz nachgewiesen, die durch das im Doppelstrang interkalierende EtBr hervorgerufen wird. Die Größe der Amplifikat-DNA im Gel wird durch Vergleich der Bande mit einer kommerziell erhältlichen „DNA-Leiter“ ermittelt.

3.6.3. Aufreinigung der Amplifikate

PCR-Produkte mit der dem Gen entsprechenden Bandenlänge werden mit dem High Pure PCR Purifikation Kit aufgereinigt. Dieses basiert darauf, dass sich Nukleinsäuren in Anwesenheit eines Salzes spezifisch an eine Glasfasermatrix binden. Nach einem Waschvorgang sind sie dann von Verunreinigungen (z.B. Salzen, Proteinen, Nukleotiden) befreit und könnten extrahiert werden. Da erst Fragmente ab einer Länge von 100 bp gebunden werden, entfernt die Methode auch Primer und deren Dimere.

3.6.4. Restriktionsverdau der Amplifikate und Plasmide

Vor einer Ligation erfolgt der Verdau des jeweiligen Amplifikates und des zugehörigen Plasmids mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen, so dass idealerweise Sticky-Ends entstehen. Restriktionsenzyme spalten Doppelstrang-DNA durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindung. Dies erfolgt innerhalb einer bestimmten palindromalen Erkennungssequenz und benötigt keine Energie in Form von ATP.

Der Verdau erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.6.5. Agarosegelelektrophorese des Restriktionsverdaus

1. Herstellung Agarosegel wie unter 3.6.2 beschrieben
2. Überführung in Gelkammer und Einfüllen von TBE-Puffer
3. kompletten Restriktionsverdau mit 10 µl 6x loadingsolution mischen und in Geltasche füllen
4. Anlegen der Spannung

Es folgt die Identifikation des gewünschten Fragmentes anhand der „DNA-Leiter“ im UV-Fluoreszenzlicht. Die entsprechende Bande wird mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (3.6.6.)

3.6.6. Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen

Diese erfolgt unter Verwendung des Agarose Gel DNA Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers.

3.6.7. Behandlung geöffneter Plasmid-, „Backbones“ mit Alkalischer Phosphatase

Unter Verwendung von alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP) werden Phosphatgruppen vom 5'-Ende der DNA abgetrennt und 5'-OH-Gruppen zurückgelassen. Dadurch wird verhindert, dass sich die geöffneten Plasmide bei der folgenden Ligation ohne Fremdgeninsertion über die sticky-ends schließen.

Durchführung:

1. 50 µl des geöffneten Plasmids mit 6 µl 10 x Puffer und 4 µl Alkalischer Phosphatase versetzen und mischen
2. 1 h bei 37 °C inkubieren
3. Reinigung mit High Pure PCR Kit nach Angaben des Herstellers zur Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase
4. Elution der Plasmid-DNA in 100 µl Elutionspuffer

3.6.8. Ligation

Die Ligation der Amplifikate in die jeweiligen geöffneten Plasmide erfolgt unter der Anwendung des Rapid DNA Ligation Kits entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.7. Klonierungsstrategie Listerien

a) Verdau pCMVβ-Produkte und pSOG3012:

Die Fremdgene werden mit den Restriktionsenzymen Sal I und EcoRI aus pCMVβ entfernt und über die gleichlautenden stickyends von MunI und XhoI in pSOG3012 inseriert

b) Gelelektrophorese (3.6.5.)

c) Behandlung des Plasmids mit Alkalischer Phosphatase (3.6.7.)

d) Ligation in pSOG3012 (3.6.8.)

e) Herstellung kompetenter E.coli für Hitzeschocktransformation

Dies erfolgt nach dem Protokoll von Inoue et al., (1990).

1. Zu 10 ml SOB-Medium 10 µl Bakterien aus Glycerinkonserve geben

2. Inkubation über Nacht bei 37 °C (ca. 14 h) im Rundrüttler

3. 5 ml der ÜNK in 245 ml SOB-Medium (1:50) geben

4. Inkubation im 18 °C Wasserbad bis OD600 von 0,6 erreicht wird

5. 10 min auf Eis stellen

6. Zentrifugation 2500 rpm 10 min und 4 °C

7. Überstand wird unter Schonung des Pellet entfernt

8. Pellet in 80 ml eisgekühltem TB resuspendieren und für 10 Minuten auf Eis stellen

9. Zentrifugation wie unter Punkt 6

10. Überstand entfernen, Pellet in 18,6 ml eisgekühltem TB resuspendieren und 1,4 ml DMSO hinzugeben

11. 10 min auf Eis inkubieren

12. Aliquotierung zu je 100 µl, in flüssigen Stickstoff geben und bei -80 °C lagern

f) Hitzeschocktransformation in E.coli DH10β

Sie stellt eine weitere Möglichkeit dar, DNA-Moleküle bzw. Plasmide in Bakterien zu etablieren und erfolgt nach dem Protokoll von Hannahan et al., (1991).

Durchführung:

1. Zum Ligationsansatz werden 100 µl kompetenter Bakterien gegeben
2. 30 min auf Eis inkubieren
3. 90 sec in ein 42 °C Wasserbad geben
4. 2 min auf Eis inkubieren
5. 400 µl SOC-Medium hinzugeben, resuspendieren
6. 1-3 h im 37 °C- Rührer inkubieren

Die durch Hitzeschock transformierten Bakterien werden nach der Rekultivierung auf LB Agarplatten (+ 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dadurch, dass die jeweiligen Plasmide eine Resistenz für Ampicillin besitzen, erfolgt eine Selektion plasmidtragender transformierter Bakterien gegenüber solchen, die das Plasmid nicht enthalten.

g) Plasmidisolierung aus transformierten E.coli (Mini-Prep)

Der Mini-Prep dient der Suche nach dem bzw. den Plasmiden die das gewünschte, inserierte Fremdgen enthalten.

Dazu pickt man von den über Nacht bewachsenen Agarplatten pro Plasmid 8-12 Klone mit sterilen Zahnstochern und gibt diese in je 3ml ampicillinhaltiges (1µg/ml) LB-Medium. Anschließend Inkubation über Nacht im Rührer bei 180 rpm und 37 °C.

Am nächsten Tag erfolgen die Plasmidextraktion und die Bestimmung der erhaltenen DNA-Menge.

h) Identifikation positiver Klone durch Restriktionsverdau

Die Identifikation der gesuchten Plasmide, die das richtige Insert in der richtigen Orientierung besitzen, erfolgt durch einen Kontrollverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen. Diese sind so ausgewählt, dass sie innerhalb des Plasmids asymmetrisch schneiden, also einmal im Insert selbst und dann noch mindestens ein weiteres Mal im „Restplasmid“. Dadurch wird es möglich eine Aussage über die Orientierung des Inserts innerhalb des Plasmids zu bekommen.

Folgender Ansatz wurde gewählt:

- 7 µl Plasmid
- 2 µl NEB Puffer
- 1 µl Restriktionsenzym
- 10 µl Aqua dest.

Inkubation 2 h bei 37 °C (bzw. der für das Enzym vom Hersteller empfohlenen Temperatur)

Zu den 20 µl Ansätzen werden jeweils 5 µl loading solution pipettiert und gut vermischt. Je 10 µl werden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Anhand der erhaltenen DNA-Banden ist der Rückschluss möglich, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthält oder nicht. Die endgültige Kontrolle erfolgt durch Sequenzierung des entsprechenden Plasmidabschnittes.

i) Glyzerinkulturen

Von den Klonen die im Restriktionsverdau die gewünschten DNA-Banden zeigten wurden Glycerindauerkulturen wie folgt angelegt:

1. Zu je 1 ml der Bakterienkultur 500 µl Glycerin geben
2. kurz vortexen
3. bei -20 °C einfrieren

j) Plasmidisolierung in höherer Quantität (Midi-Prep)

Der Midi-Prep dient der Herstellung der gewünschten Plasmide in höheren Konzentrationen. Nach Anlage einer Übernachtskultur mit 10 µl der Glycerinkonserven, die in 50 ml LB-Medium gegeben und anschließend bei 37 °C im Rundrüttler inkubiert werden erfolgt die Plasmidextraktion nach den Angaben des Herstellers.

k) Protoplastentransformation

Die Herstellung der Protoplasten sowie deren Transformation mit dem neuen Plasmid erfolgte nach dem Protokoll von Wünscher et al., (1991). Es wurden Protoplasten von *L. monocytogenes* und *L. innocua* angefertigt und beide Stämme transformiert.

1. ÜNK anlegen mit 20 ml BHI-Medium und 10 µl *L. monocytogenes* EGD
2. Inkubation bei 37 °C
3. 300 µl der ÜNK zu 29,7 ml BHI-Medium geben
4. Inkubation bei 37 °C im Rundrüttler bis OD 600 von 0,6-0,8
5. 25 ml des Ansatzes in ein weiteres Gefäß überführen und 10 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
6. Überstand verwerfen, Pellet mit 25 ml Aqua dest. resuspendieren und wie unter Punkt 5 zentrifugieren
7. Überstand verwerfen und Pellet mit 2,5 ml SMMP resuspendieren
8. 250 µl Lysozymbelösung (100 mg Lysozym/ml 2xSMM) hinzugeben
9. Inkubation bei 37 °C für 12-22 h
10. optische Kontrolle unter dem Mikroskop: Haben die Bakterien eine sphäroide Form so erfolgt eine Zentrifugation wie unter Punkt 5
11. Überstand entfernen, Pellet mit 10 ml SMMP resuspendieren und erneute Zentrifugation
12. Überstand entfernen, Pellet in 2,5 ml SMMP aufnehmen
13. Aliquots zu je 300 µl in flüssigen Stickstoff geben und bei -80 °C einfrieren

Transformation der Listerien:

1. Protoplasten-Aliquot auftauen
2. Plasmid und 2 ml Fusogen hinzugeben
3. 1 min schwenken und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 7 ml SMMP hinzugeben und 5 mal über Kopf invertieren
5. Zentrifugation 500 rpm, 20 min bei Raumtemperatur
6. Überstand entfernen, Pellet mit 1 ml SMMP resuspendieren
7. Inkubation im 30 °C Wasserbad für 3 h
8. Je 333 µl auf DM3 Regenerationsplatten ausplattieren
9. 4-8 Tage bei 30 °C inkubieren

Die Identifikation positiver Transformanten erfolgt nach Plasmidisolierung durch Kontrollverdau, PCR oder Sequenzierung. Die Klone, die das korrekte Plasmid enthalten

werden in BHI-Medium (+ 5 µg Erythromycin/ml) kultiviert und als Glycerinkonserven eingefroren.

1) Fremdgen-Expression durch transformierte Listerien

Die Zellkultur wird mit Fremdgen-Plasmid-tragenden Listerien infiziert. Die Infektion mit dem nicht plasmidtragenden Listerienwildtyp dient als Negativkontrolle der Versuchsreihe. Durch die Zugabe der Antibiotika wird eine Unterbrechung des Infektionszyklus erreicht. Die erste Gentamycingabe ca. 3-4 h nach der Infektion tötet die noch extrazellulär vorhandenen Listerien unter Schonung der für die Genexpression wichtigen intrazellulären Listerien ab. Nach zweitägiger Inkubation werden diese dann durch die Zugabe von Tetracyclin und Gentamycin abgetötet. Dadurch sistiert die intrazelluläre Vermehrung und die eingebrachten Plasmide werden freigesetzt. Die Information des darauf codierten Fremdgens kann nun fälschlicherweise von der Wirtszelle transkribiert werden, was in eine Fremdgenexpression mündet. Diese kann z.B. mittels β -Galaktosidasefärbung gezeigt werden, wenn lacZ eingeschleußt wurde.

1. Jeweilige Zellreihe (Anzahl je nach Proliferationsverhalten) in 24 Wellplatten (enthalten pro Well je ein Deckgläschen) ausplattieren und 24 h bei 37 °C inkubieren
2. Listerien-ÜNK anlegen: Zu 20 ml BHI-Medium 10 µl der jeweiligen Glycerindauerkulturen (plasmidtragende Listerien und Wildtyp-Listerien) geben
3. In das BHI-Medium der plasmidtragenden Listerien noch Erythromycin (5µg/ml) geben, da diese durch das Plasmid eine Resistenz besitzen.
4. ÜNK bei 37 °C im Rundrüttler inkubieren
5. Am Folgetag je 200 µl der ÜNK zu je 9,8 ml erythromycinhaltigem (Transfektanten) bzw. erythromycinfreien (Wildtyp) BHI-Medium geben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9-1,1, was einer Bakteriendichte von 1×10^6 /µl entspricht, im 37 °C Rundrüttler inkubieren
6. Je 1 ml von den Kulturen entfernen und dies bei 8000 rpm für 2 min zentrifugieren
7. Überstand entfernen und 1 ml antibiotikumfreies Zellkulturmedium zufügen
8. Kurz vortexen und wie unter Punkt 6 zentrifugieren
9. Überstand entfernen und Pellet mit 1ml antibiotikumfreiem Zellkulturmedium resuspendieren
10. Medium von den Zellen entfernen und durch 1ml/ Well antibiotikumfreies Medium ersetzen
11. In jedes Well werden 8 µl der unter Punkt 9 erhaltenen Bakteriensuspension gegeben
12. Platte kurz schwenken um eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten
13. Zellen bei 37 °C für 5 h inkubieren
14. bakterienhaltiges Medium absaugen und durch 1ml /Well Zellkulturmedium mit 50 µg/ml Gentamycin ersetzen
15. 2 Tage bei 37 °C inkubieren
16. Mediumwechsel, nun unter Zugabe von Gentamycin (50 µg/ml) und Tetracyclin (10µg/ml)
17. 24 h bei 37 °C inkubieren
18. β -Galaktosidase-Nachweisfärbung
 - Medium von den Zellen entfernen und je 1ml/Well 0,125 %-iges Glutaraldehyd dazugeben
 - 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
 - Absaugen und durch 1 ml/Well 2%-iges Paraformaldehyd ersetzen
 - 4 min inkubieren, absaugen und 1 ml/Well Waschlösung zugeben
 - 5 min inkubieren

- Färbelösung herstellen, indem pro Well 7,5 µl X-Gal-Lösung mit 292,5 µl Mixer-Lösung im Verhältnis 1:40 vermischt werden
- Waschlösung entfernen und je 300 µl/ Well der Färbelösung aufbringen
- über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Färbelösung absaugen und 1 ml PBS/Well hinzugeben
- Deckgläschen entnehmen und mit 5 µl Glyzeringelatine auf Objektträgern fixieren

19. Auswertung

- lichtmikroskopische Auszählung LacZ-positiver Zellen in 5 von 30 Gesichtsfeldern (Transfektionseffizienz)
- lichtmikroskopische Erfassung, der nach Infektion noch vorhandene Gesamtzellzahl (Rückschluss auf Zellverlust)

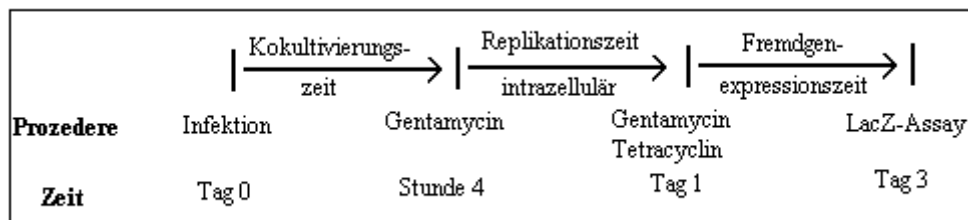


Abbildung 8 : Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Transfektionsversuchs

3.8. Klonierungsstrategie Influenza

a) PCR (GFP, CD, TK und PNP)

Die verwendeten Primer enthalten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI, um eine Ligation in das Plasmid pcDNA3.1+ zu ermöglichen. Weiter siehe 3.6.1.

b) Restriktionsverdau PCR-Produkte und pcDNA3.1+

30 µl PCR-Produkt bzw. Plasmid
 5 µl NEB
 1 µl HindIII
 1 µl XbaI
 13 µl Aqua dest.

50 µl Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubieren.

c) Gelelektrophorese (3.6.5.)

d) Behandlung des Plasmids mit Alkalischer Phosphatase (3.6.7.)

e) Ligation GFP, CD, TK und PNP in pcDNA3.1+ (3.6.8.)

f) Lipofektamintransfektion (pcDNA3.1 + Produkte)

Sie dient neben der Sequenzierung als Überprüfung der entsprechenden Genexpression und erfolgt unter Verwendung des Lipofektamin Plus Kits.

1. Zellen in 24-Wellplatte aussäen und über Nacht bei 37 °C inkubieren (1.4. und 3.8.1.)
2. In Reaktionsgefäß 1 wird zu 2,5 µg Plasmid-DNA 7,5 µg Plus-Reagenz und 300 µl Medium (DMEM ohne Antibiotika und FCS) gegeben
 In Reaktionsgefäß 2 gibt man zu 900 µl Medium (DMEM ohne Antibiotikum und FCS) 16,5 µl Lipofektamin

3. Reaktionsgefäß 1 und 2 für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 600 µl aus Gefäß 2 in Gefäß 1 geben und kurz mischen
5. Inkubation wie unter Punkt 3 beschrieben
6. Medium von den Zellen entfernen und durch 100 µl/Well DMEM ohne Antibiotikum und FCS ersetzen
7. Je 100 µl aus Gefäß 1 tropfenweise über den Zellrasen der entsprechenden Wells verteilen
8. Je 100 µl aus Gefäß 2 auf den Zellrasen der Kontrollreihe (ohne Plasmid) geben
9. Platte kurz schwenken und 1h bei 37 °C inkubieren
10. Pro Well 800 µl Zellkulturmedium hinzufügen
11. Inkubation bei 37 °C
12. Therapie

Nach 24stündiger Inkubation, schließt sich ein Mediumwechsel unter Zugabe der jeweiligen Prodrugs an, die in folgenden Konzentrationen verwendet wurden:

Prodrug	Konzentration in µg/ml							
	0	5	10	20	30	50	--	--
Ganciclovir	0	5	10	20	30	50	--	--
Ancotil	0	10	25	50	75	100	--	--
6-MPdR	0	5	10	20	25	30	35	40

13. Auswertung mittels Alamar-Blue-Assay (3.5).

g) Restriktionsverdau pcDNA3.1+(GFP, CD, TK oder PNP) und polI

Die Fremdgene werden mit dem Restriktionsenzym BsaI aus pcDNA3.1+ entfernt und über die gleichlautenden sticky-ends von BsmBI in polI inseriert.

- 30 µl Plasmid (pcDNA3.1+Produkte bzw. polI)
- 5 µl NEB III
- 1 µl Bsa I bzw. BsmBI
- 14 µl H₂O

Inkubation bei 55 °C für 2 h.

h) Gelelektrophorese (3.6.5.)

i) Behandlung des geöffneten polI mit Alkalischer Phosphatase (3.6.7.)

j) Ligation der Gene in polI (3.6.8.)

k) Herstellung elektrokompetenter E.coli

1. Übernachtskultur (ÜNK) anlegen: zu 10 ml 2YT-Medium ohne Ampicillin E.coli XL 1 geben
2. Inkubation über Nacht bei 37 °C
3. 1 Liter 2YT-Medium ohne Ampicillin mit ÜNK 1:100 animpfen
4. Inkubation bei 37 °C bis optische Dichte von 0,5-0,8 bei 595 nm erreicht ist
5. Inkubation auf Eis für 30 min
6. Zentrifugation 10000 rpm 10 min und 4°C
7. Überstand abgießen und Pellet mit der Hälfte des Volumens des Gesamtansatzes 1mM HEPES Puffer pH 7 resuspendieren

8. Zentrifugation 10000 rpm 10 min und 4 °C
9. Überstand abgießen und mit einem Viertel des Volumens des Gesamtansatzes an 1mM HEPES Puffer resuspendieren
10. Zentrifugation wie unter Punkt 6
11. Überstand entfernen und 50 ml 10% Glycerin (10 ml Glycerin + 90 ml Wasser) dazugeben, resuspendieren
12. Zentrifugation wie unter Punkt 6
13. 2,5-3 ml 10 % Glycerin dazugeben, resuspendieren und 100 µl Portionen aliquotieren
14. Aliquots in flüssigen Stickstoff geben und bei -80 °C einfrieren.

l) Transformation durch Elektroporation

Bei diesem Verfahren werden kompetente Bakterien einem elektrischen Feld mit hoher Spannung ausgesetzt, so dass sich in ihrer Zellmembran Poren ausbilden durch die dann Plasmide bzw. andere DNA-Moleküle passiv in das Innere der Bakterien gelangen können. Nach kurzer Zeit verschließen sich diese Poren und die eingedrungenen DNA-Moleküle verbleiben im Bakterium.

1. Zu 100 µl elektrokompenter Bakterien 10 µl des jeweiligen Plasmids geben und in eine Küvette überführen
2. In Elektroporationsgerät einsetzen
3. Impuls: 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm für 4,5msec auslösen
4. 1ml SOC-Medium dazugeben
5. 30-60 min im 37 °C Wasserbad inkubieren (dabei bildet sich die auf dem Plasmid kodierte Ampicillinresistenz aus)
6. Bakterien auf LB-Agarplatten (+ 100 µg/ml Ampicillin) ausstreichen
7. Inkubation über Nacht bei 37 °C

l) Plasmidisolierung mit Mini-Prep (siehe Klonierungsstrategie Listerien)

m) Kontrollverdau mit EcoRI und Pst I

n) Anlage von Glycerinkonserven

o) Plasmidisolierung mit Midi-Prep (siehe Klonierungsstrategie Listerien)

p) Transfektion

Die Methodik basiert auf der Veröffentlichung von Pleschka et al., 1996. Die Suizidgene TK, PNP, CD oder das Reportergen GFP liegen in Negativpolarität vor und stehen unter der Kontrolle eines humanen Promotors, der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase I (polI), die 4 „Helferplasmide“ (HP) HMG-NP/PA/PB1/PB2 haben dagegen Plusstrangpolarität. Die durchgeführte GFP-Transfektion dient der optischen Kontrolle des Transfektionserfolgs. Dazu wird in das nicht therapierte Well der GFP-Reihe ein Deckgläschen eingelegt, das nach erfolgter Transfektion entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wird. Eine weitere Kontrolle erhält man durch die Leertransfektion, die nur Lipofektamin und die Helferplasmide enthält. Damit können mögliche zytotoxische Effekte des Prodrugs aufgezeigt werden. Zunächst erfolgte eine Transfektion in 293T-Zellen. Diese exprimieren das T-Zell-Antigen des Simian Virus (SV40), wodurch einige Viren wie z.B. Influenza, effektiver replizieren und eine höhere Transfektionseffizienz möglich ist (Lewis und Manley, 1985). Auch für Plasmid-DNA ist dieser Effekt beschrieben worden (Dean et al., 1999).

1. Aussaat der Zellen (3.4.) auf 24-Well Platten und Inkubation für 24 h bei 37°C
2. Herstellung eines „Transfektionsmix“ aus den 4 Helferplasmiden, indem die Plasmide HMG-PA/PB1/PB2/ und NP im Verhältnis 1:1:1:2 in ein Reaktionsgefäß pipettiert, kurz gemischt und auf Eis inkubiert werden
3. Transfektionsansätze:

Gefäß	1	2	3	4
Medium (ohne FCS und Antibiotikum) in µl	400	400	400	1200
Transfektionsmix in µl	1,8	1,8	1,8	-----
Plasmid in µl	0,7 Aqua dest.	0,7 polI-GFP	0,7polITK/CD/PNP	-----
Plus-Reagenz in µl	10	10	10	-----
Lipofektamin	-----	-----	-----	22,5

Gefäß 1: Leertransfektion, Gefäß 2: Transfektionskontrolle GFP,
 Gefäß 3: Transfektionskontrolle Therapieerfolg, Gefäß 4: Lipofektamin

4. Alle Ansätze kurz mischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
5. Je 400 µl aus Gefäß 4 in Gefäße 1/2/3 geben, mischen und wieder für 15 min inkubiert
 - Während der Inkubation Medium von den Zellen entfernen und 100 µl/ Well FCS und antibiotikumfreies Medium vorlegen
6. je 100 µl des entsprechenden Ansatzes auf den Zellrasen pipettieren, Platte kurz schwenken und 1 h bei 37 °C inkubieren

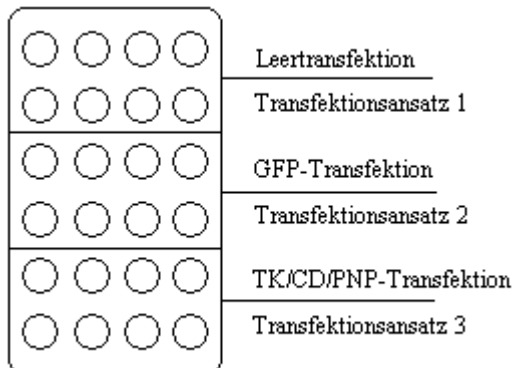


Abbildung 9: Schematische Darstellung der 24 Well-Platte mit Zuordnung der Transfektionsansätze

7. 800 µl Zellkulturmedium pro Well hinzufügen und bei 37 °C 24 h inkubieren
8. Therapie
 Nach 24stündiger Inkubation, schließt sich ein Mediumwechsel unter Zugabe der jeweiligen Prodrugs an, die in folgenden Konzentrationen verwendet wurden:

Prodrug	Konzentration in µg/ml							
	0	5	10	20	30	50	--	--
Ganciclovir	0	5	10	20	30	50	--	--
Ancotil	0	10	25	50	75	100	--	--
6-MPdR	0	5	10	20	25	30	35	40

9. Alamar-blue-Assay (3.5.)

4. Ergebnisse

4.1. Listeriensystem

Um zu zeigen, dass mit dem Vektor *Listeria monocytogenes* Fremdgenexpression in Glioblastomen möglich ist, haben wir in der vorliegenden Studie das Reporter-gen LacZ verwendet (Everest et al., 1995; Go et al., 1996). Dieses Gen stammt aus *E.coli*-Bakterien und kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Zellen, die LacZ exprimieren erscheinen nach X-Gal-Färbung intensiv blau (Abb.10), zeigen so den Transfektionserfolg an und erlauben z.B. die Bestimmung der Transfektionsrate. Kommt es nur zu einer schwach-bläulichen Färbung, die nicht das gesamte Zytoplasma betrifft oder bleiben die Zellen farblos, so gilt das Ergebnis als negativ.

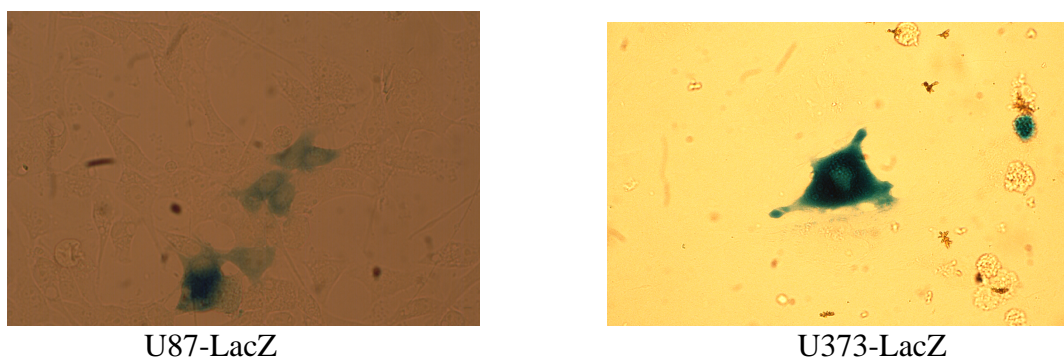


Abbildung 10 : LacZ-Expression in zwei unterschiedlichen Glioblastomlinien

In einem Vorversuch wurde das System zunächst an 293 T-Zellen untersucht, um Aufschluss über die Expressionskinetik zu erhalten (Diagramm 1 und 2).

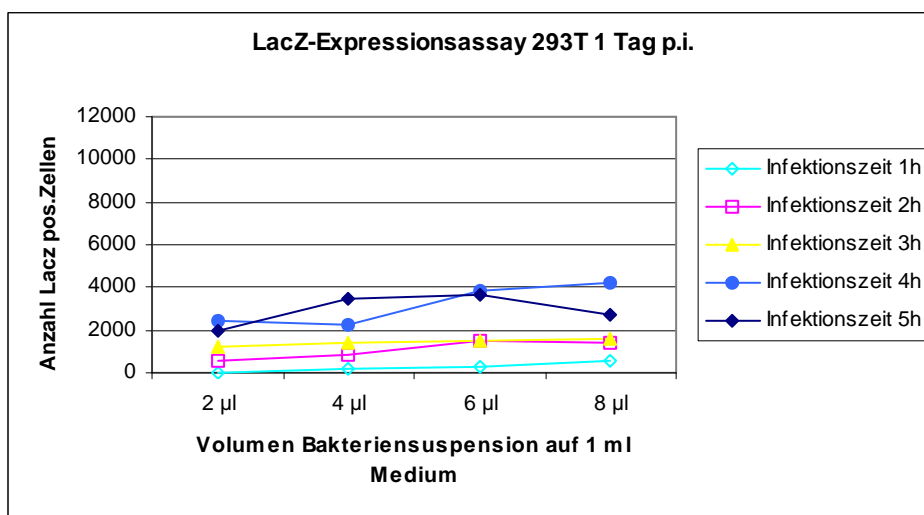


Diagramm 1: Expression des LacZ-Gens in 293 T-Zellen in Abhängigkeit von Bakterienkonzentration und Kokultivierungszeit bei 1-tägiger Antibiotikatherapie (Gentamycin+Tetracyclin)

Wie Diagramm 1 zeigt, erhält man unter zunehmender Bakterienkonzentration und auch Kokultivierungszeit eine ansteigende Zahl LacZ-positiver Zellen. Die höchste Anzahl wird nach einer Infektionszeit von 4 h und bei einer Bakteriendosis von 8 µl erzielt. Der

Ausgangswert der Gesamtzellzahl pro Well betrug 50.000, so dass ein Ergebnis mit ca. 5000 LacZ-positiven Zellen für eine Transfektionseffizienz von ca. 10% spricht.

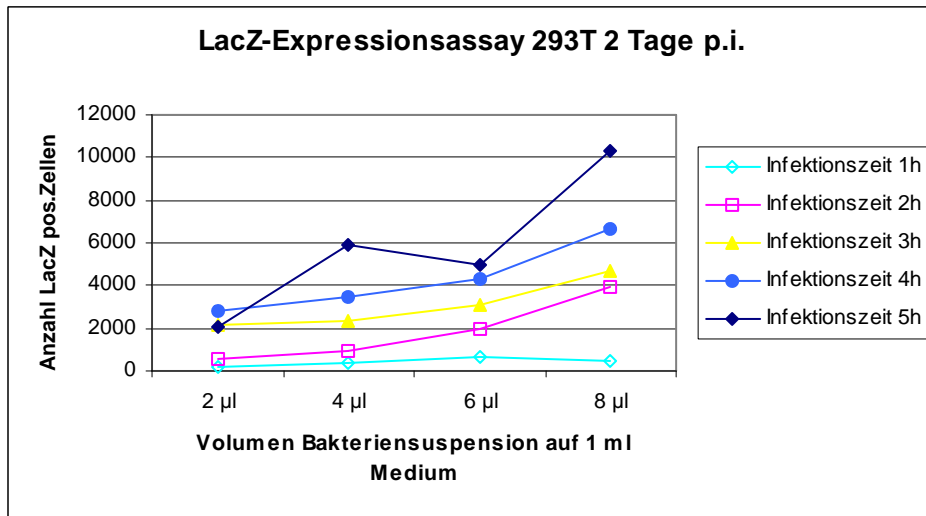


Diagramm 2: Expression des LacZ-Gens in 293T-Zellen in Abhängigkeit von Bakterienkonzentration und Kokultivierungszeit bei 2-tägiger Antibiotikatherapie (Gentamycin-Tetracyclin)

Unter Verdopplung der Fremdgenexpressionszeit von einem auf zwei Tage, zeigt sich eine höhere Transfektionsrate. Bei allen Versuchsreihen kommt es mit zunehmender Bakterienkonzentration und verlängerten Kokultivierungszeiten zu einer Zunahme LacZ positiver Zellen und damit der Transfektionseffizienz. Bei einer Infektionszeit von 5 h und Verwendung von 8 µl Bakteriensuspension erhält man mit ca. 20 % die höchste Transfektionseffizienz.

Nun wurden 10 intraoperativ gewonnene Glioblastom-Zelllinien untersucht, daneben auch 2 Meningeome, 2 niedriggradige Gliome und Zellen einer Meningomyelozele. Es wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, nämlich Wildtyp-Listerien (ohne Plasmid) und der apathogene Stamm *L. innocua* mit pSOG3012-LacZ. Dabei wurde ein Bakteriensuspensionsvolumen von 8 µl, eine Kokultivierungszeit von 5 h und eine Fremdgenexpressionszeit von 2 Tagen p.i. eingesetzt.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dargestellt. Dabei wurde nicht nur die LacZ-positiven Zellen ausgezählt, sondern auch die Zahl unspezifisch blauer Zellen ermittelt. Ebenso wurde der prozentuale Zellverlust jeder Zellreihe unter Verwendung der verschiedenen Listeriensubtypen festgestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die aufgetretenen Zellverluste und Anzahl an spezifischen und unspezifischen LacZ-positiven Zellen nach Listerieninfektion

Nr.	Glioblastome												Gliome		Meningeome		Meningo myelozyte
	#5	#15	#33	#54	#62	#70	#72	#76	#89	U87	#101	#116	#78	#82	#113		
1.	95,6	88,9	96,1	94,1	97,4	89,3	87,5	88,4	92,2	67,1	80	99	86,4	97,6	93		
2.	14	3	350	0	5	300	200	0	0	0	0	0	0	0	0		
3.	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1.	95,6	89,6	96,4	96,1	97,1	90,3	80	90	91,8	40	81,1	98,3	90	98	89,8		
2.	7	10	450	8	23	300	200	0	5	55	1	0	3	0	0		
3.	5	0	15	9	19	30	15	0	6	70	2	2	1	0	9		
4.	3,5	0	8,3	4,6	33	1	0,25	0	1,5	2,3	0,21	2,3	0,22	0	1,7		
1.	77		88,9	74,6	91				80	20	70				40		
2.	44		270	5	4				0	0	0				0		
3.	0		0	0	0				0	0	0				0		
4.	0		0	0	0				0	0	0				0		

1. Zellverlust in %
2. Anzahl unspezifischer LacZ positiver Zellen
3. Anzahl LacZ-positiver Zellen
4. Expressionsrate Restzellen in ‰: LacZ positive Zellen/ Ausgangszellzahl x (100-Zellverlust)%

Es zeigt sich, dass eindeutig LacZ-positive Zellen nur nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* EGD vorkommen, die das Plasmid pCS1 enthalten. In den Negativkontrollen finden sich nur unspezifisch gefärbte Zellen.

Es treten sehr hohe Zellverluste auf, mit bis zu 99 %. Dies erfolgt unabhängig vom verwendeten Listeriensubtyp. Nur bei einigen wenigen Zellreihen (U87, #101 und #113) zeigt sich eine reduzierte Verlustrate unter der Anwendung von *L.innocua*.

Beim ersten Mediumwechsel vor der Listerieninfektion trat noch kein Zellverlust auf. Dies konnte durch Zentrifugation des Überstandes und mikroskopische Kontrolle bestätigt werden. Erst nach Überführung in FCS-freies und antibiotikumfreies Medium sowie folgender Listerieninfektion konnte mikroskopisch eine Ablösung der Zellen beobachtet werden.

Durch die Verwendung von 24 Wellplatten bei allen untersuchten Zelllinien wurde sichergestellt, dass die gleichen Wachstumsbedingungen (gleiches Verteilungs- und Mediumvolumen sowie gleiche Anheftungsfläche) gegeben sind. Unterschiede bestanden nur in der jeweiligen Ausgangszellzahl.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass auch andere Zellen als Glioblastome durch Listerien infiziert und damit LacZ exprimieren können.

Es folgt eine detaillierte Aufstellung der Ergebnisse bei der Untersuchung der Glioblastom-Zellkulturen.

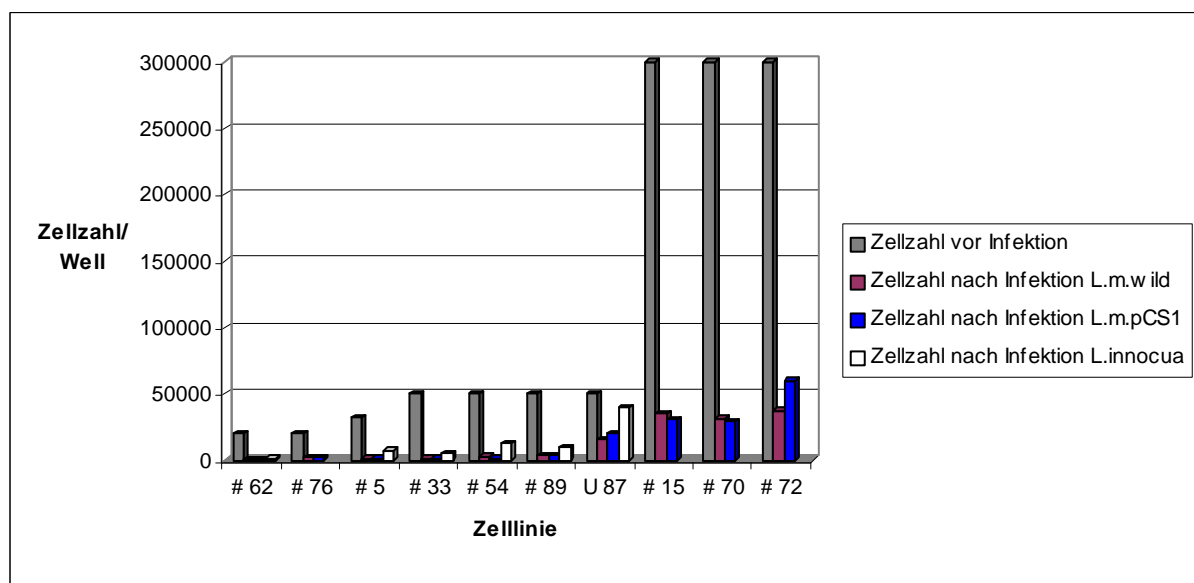


Diagramm 3: Zellverluste nach Listerieninfektion von 10 Glioblastomen in Abhängigkeit von verschiedenen Listerienvarianten

Die Ausgangszellzahl variiert in Abhängigkeit von der Einzelzellgröße und der verwendeten Plattenart für die Kultur (6-Well bzw. 24-Well). Alle Ergebnisse beziehen sich auf die jeweilige Ausgangszellzahl, um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können. Es zeigt sich, dass die Verwendung der Variante *L. innocua* weniger Zellverluste mit sich bringt, selbst wenn diese für eine apathogene Listerienvariante noch sehr hoch sind. Bei *Listeria monocytogenes* EGD gibt es keine großen Differenzen im Vergleich des Wildtyps zur plasmidtragenden Variante. Die kommerziell erhältlichen U87-Zellen erleiden mit ca. 60 % den geringsten Zellverlust.

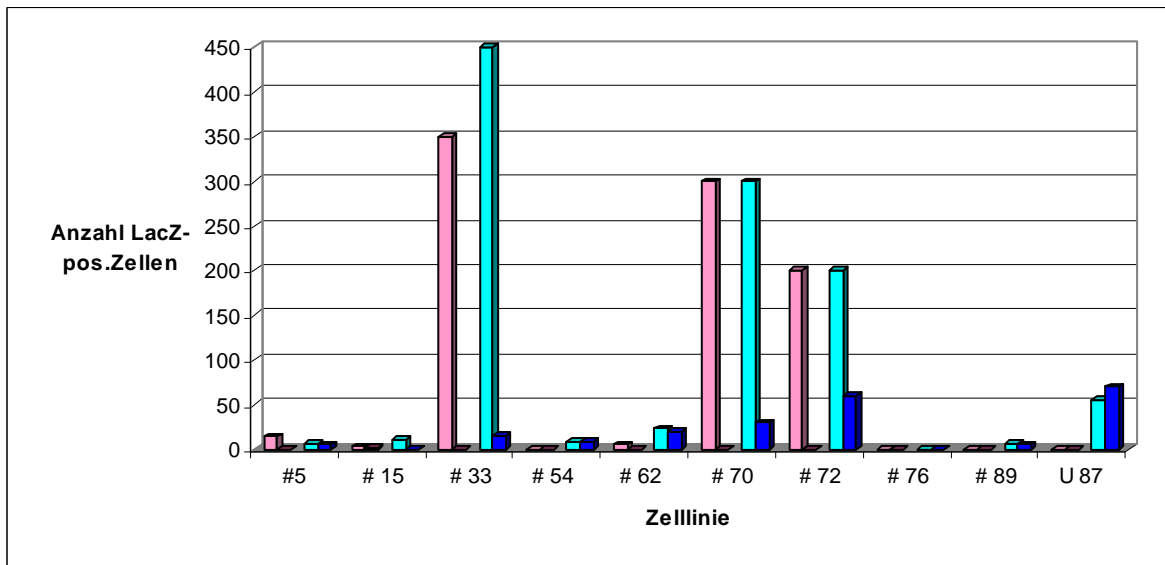


Diagramm 4: LacZ-Expression in 10 Glioblastomen nach Listerieninfektion

Im Diagramm 4 stellen die rosa bzw. hellblauen Säulen die unspezifisch LacZ positiven Zellen dar und die roten bzw. dunkelblauen die eindeutig LacZ positiven. Das linke Balkenpaar (rosa/rot) je Zellreihe entspricht der Infektion mit Wildtyp-Listerien und das rechte (hellblau/blau) der Infektion mit plasmidtragenden Listerien.

Es zeigt sich, dass zweifelsfrei LacZ-positive Zellen nur nach Infektion mit plasmidtragenden Listerien nachzuweisen sind. Auffällig ist jedoch die bei den intraoperativ gewonnenen Primärkulturen vorhandene hohe Anzahl an unspezifisch LacZ positiven Zellen.

Die Transfektionseffizienz ist bei allen untersuchten GBM's sehr niedrig (0-33 ‰). Die besten Resultate bezogen auf die Restzellzahl finden sich bei den Primärkulturen #62, #33 und #54.

4.2. Ergebnisse der PCR der Suizidgene

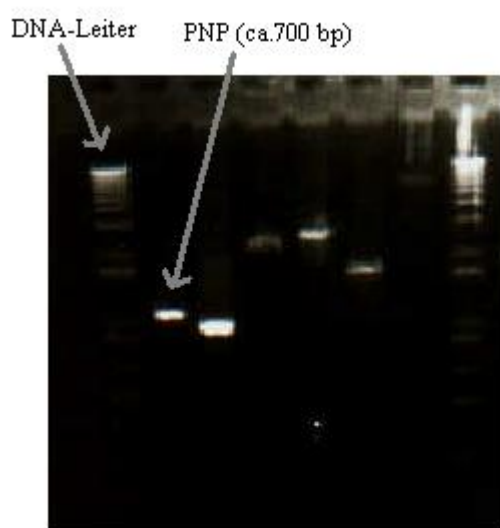


Abbildung 11: PNP in der Gelelektrophorese

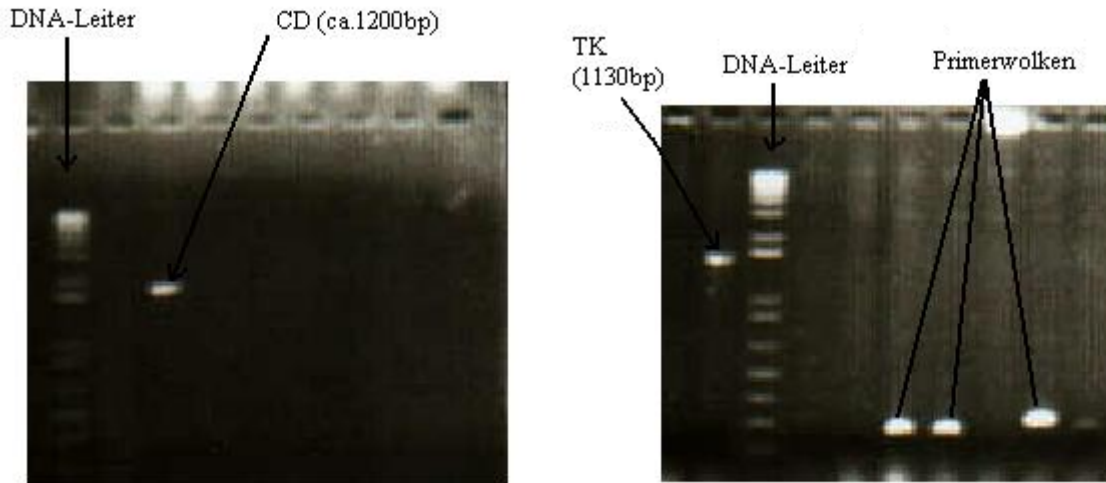


Abbildung 12: links: CD in der Gelelektrophorese; rechts: TK in der Gelelektrophorese

Die aus der PCR gewonnenen Amplifikate wurden anschließend aufgereinigt und sequenziert. Nach sicherer Identifikation des gewünschten Gens erfolgten die weiteren Klonierungsschritte.

4.3. Ergebnisse der GFP-Transfektion in Glioblastomen mit dem reversen Influenzamodelle

Die Expression von GFP in Glioblastomen, die mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden kann, zeigt die Funktionsfähigkeit und damit den Transfektionserfolg des reversen Influenzamodelle auf. Die Zellen gelten als GFP-positiv, wenn sie im Fluoreszenzlicht intensiv grün aufleuchten (siehe Abbildungen 13 und 14). Kommt es nur zu einer schwachen Grünfärbung oder fehlt sie, gelten die Zellen als GFP-negativ und zeigen damit, dass keine Fremdgenexpression stattfindet. Eine Negativkontrolle, die zur Transfektion alle Plasmide mit Ausnahme des Reportergens enthält schließt aus, dass irgendein Bestandteil des „Transfektionsmixes“ das Ergebnis verfälscht.

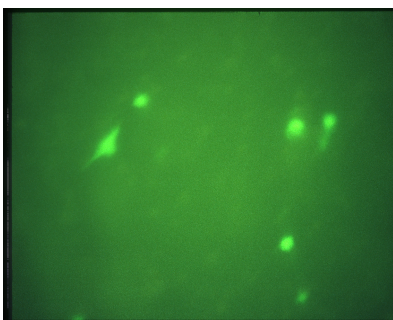


Abbildung 13: GFP-Expression in U87-Zellen

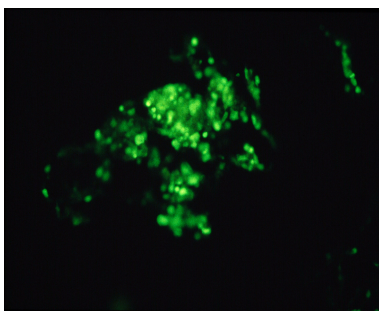


Abbildung 14: GFP-Expression in 293T-Zellen

4.3.1. Optimierung des Transfektionsprotokolls

Zunächst wurde die optimale Inkubationszeit nach Transfektion bestimmt. Dafür wurde ein Transfektionsversuch mit polI-GFP unter Verwendung zweier Glioblastomlinien (U87 und #33) durchgeführt (Diagramm 7)

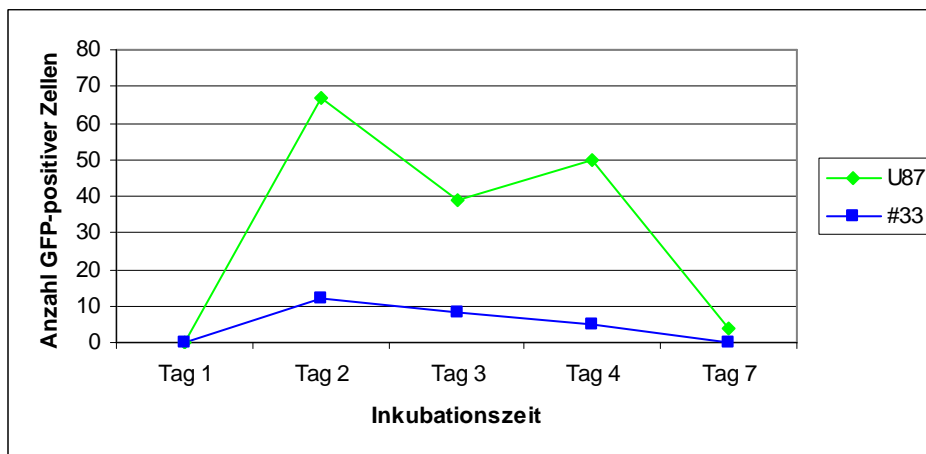


Diagramm 5: GFP-Expression in U87 und #33 nach Transfektion mit polI-GFP und 4 Helferplasmiden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Am 1.Tag nach der Transfektion kann in keiner der Zelllinien eine GFP-Expression nachgewiesen werden. Dies ändert sich am 2.Tag an dem in der Zelllinie U87 67 GFP-positive Zellen nachzuweisen sind und in #33 11 positive Zellen. Nach längerer Inkubationszeit kommt es wieder zu einer Abnahme der positiven Zellen bis zum 7. Tag. Für die folgenden Versuche wurde dementsprechend eine Inkubationszeit von 48 h gewählt.

4.4. Ergebnisse Suizidtherapie pcDNA3.1-TK

Diese Transfektion in die Zelllinien 293T, U373 und A172 mit nachfolgender GCV-Behandlung dient der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Plasmids und damit des enthaltenen Fremdgens. Eine Negativkontrolle wurde mittels des Transfektionsreagens Lipofektamin durchgeführt.

a) 293T

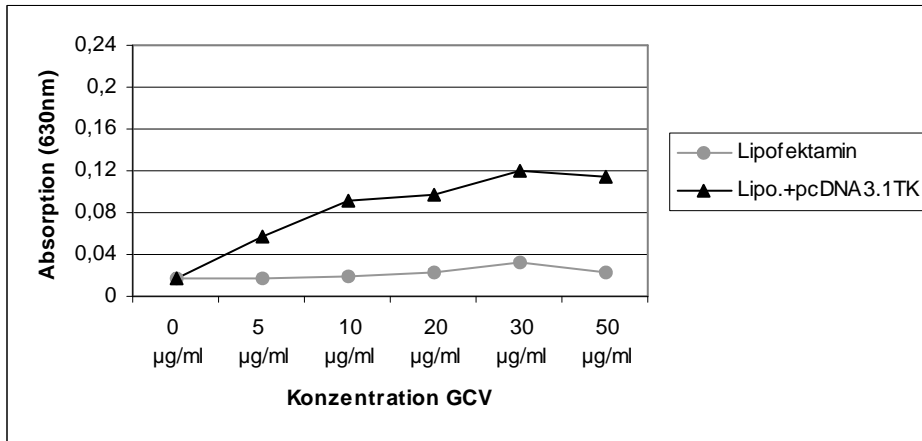


Diagramm 6: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA3.1-TK in 293T und Therapie mit GCV

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigt sich ein Ansprechen auf die Therapie mit GCV ab einer Konzentration von 5 µg/ml. Mit steigender Dosis kommt es zu einem Anstieg der gemessenen Absorption.

b) A172

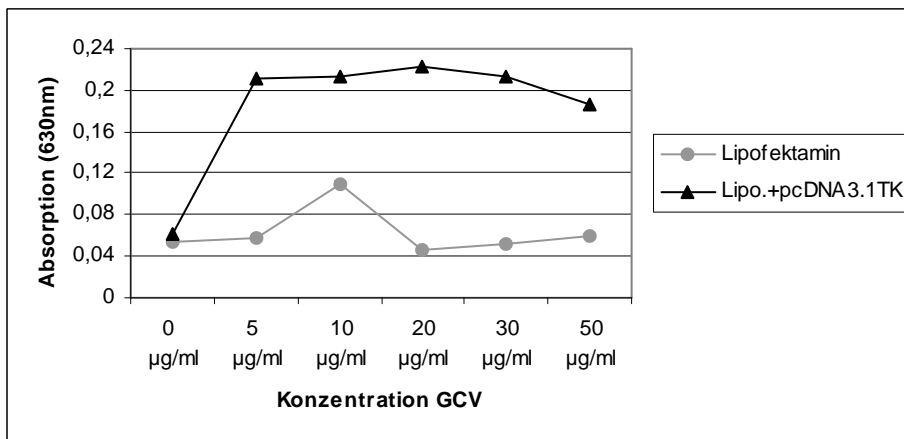


Diagramm 7: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA3.1-TK in A172 und Therapie mit GCV

Mit einer Gabe von 5µg/ml GCV kann hier ein maximaler Effekt erzielt werden.

c) U373

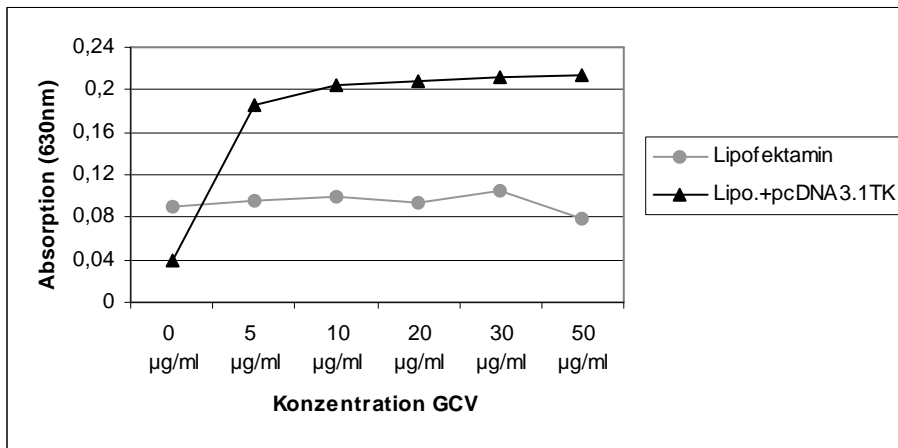


Diagramm 8: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA3.1-TK in U373 und Therapie mit GCV

Die Therapie mit GCV führt bei Dosen von 5 µg/ml zum deutlichen Anstieg der Absorptionskurve.

Zusammenfassend zeigen die Kontrollen nur geringe Veränderungen der Absorptionswerte nach Zugabe des GCV an. Das spricht für eine geringe zytotoxische Nebenwirkung in dem von uns angewandten Dosisbereich.

4.5. Ergebnisse Suizidtherapie pcDNA3.1-CD

Dies dient der Verifikation der Funktionsfähigkeit des Plasmids und des enthaltenen Gens für das Suizidensym.

a) 293T

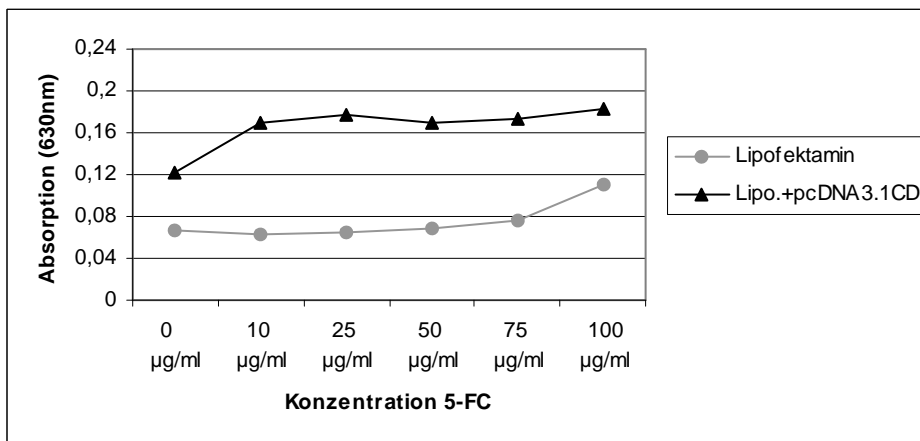


Diagramm 9: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA-CD in 293T und 5-FC-Therapie für 4 Tage

Ab 10 µg/ml 5-FC kommt es zum Anstieg der Absorptionswerte nach Transfektion mit CD. Allerdings wird dies auch in der Kontrollreihe beobachtet, wobei der Anstieg im Bereich von 10-75 µg/ml gering ist und bei der verwendeten Maximalkonzentration von 100 µg/ml deutliche Progredienz zeigt.

Ab 10 µg/ml 5-FC deutliche Zunahme der Absorptionswerte bei konstant niedrigen Werten der Kontrollreihe.

b) U373

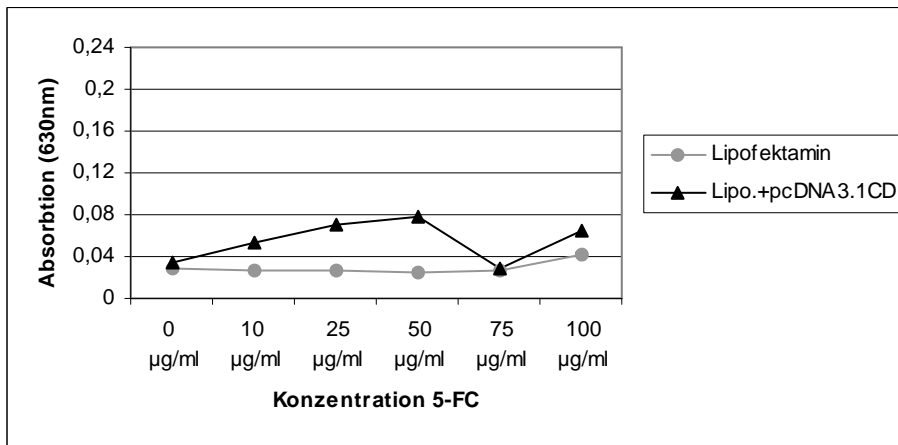


Diagramm 10: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA-CD in U373 und 5-FC-Therapie für 5 Tage

Geringer Effekt ab einer Konzentration von 10 µg/ml.

c) A172

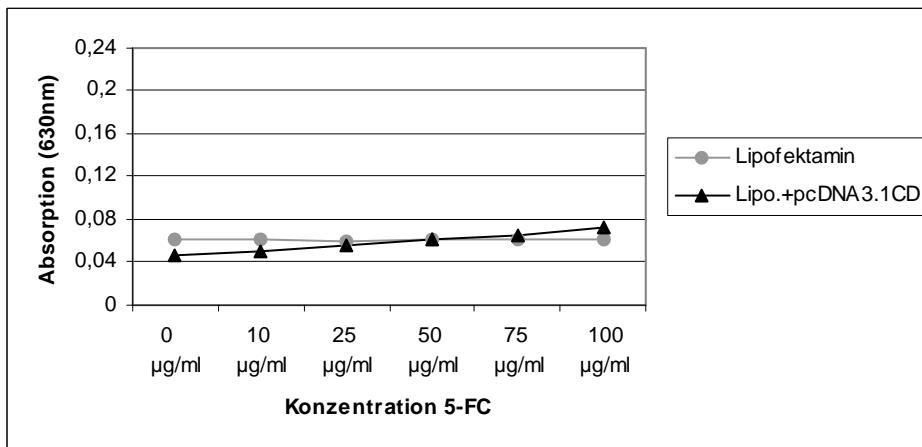


Diagramm 11: Alamar-blue Absorption nach Transfektion pcDNA-CD in A172 und 5-FC-Therapie für 5 Tage

Hier zeigen sich keine Unterschiede im gemessenen Absorptionsverhalten unter Dosissteigerung des 5-FC. Dies spricht für einen fehlenden Effekt.

4.6. Ergebnisse Suizidgentherapie mit poli-PNP/TK und CD

In der nachfolgenden Übersichtstabelle sind die Zelllinien, die Transfektionsrate und der erzielte therapeutische Effekt gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass unter Anwendung von poli-PNP/6-MPdR in 5 von 11 Zelllinien ein sehr guter Effekt erzielt wird, während dies bei poli-TK/GCV und poli-CD/5-FC nur in 1 Zelllinien (293T) von 7 der Fall ist.

293 T-Zellen haben dabei die höchste Transfektionsrate und sind die einzige Zelllinie bei der durch alle 3 Plasmid/Prodrug-Kombinationen ein sehr guter Effekt festzustellen ist.

Zelllinie	Transfektionsrate in %	Therapeutischer Effekt (PNP)	Therapeutischer Effekt (TK)	Therapeutischer Effekt (CD)
293 T	10	++	++	++
A172	0,5	++	+	+
U87	0,5	++	-	+
U373	0,5	/	+	-
#5	<0,1	-	/	/
#15	0,1	+	/	/
#33	0,5	++	-	+
#54	<0,1	/	-	-
#89	1	++	/	/
#137	0,15	+	/	/
#138	<0,1	-	/	/
#141	<0,1	-	/	/
#147	<0,1	-	/	/
#211	<0,1	/	-	-
#215	<0,1	/	-	-

Tabelle 7 : Überblick über die Ergebnisse der Transfektion mit poli-PNP/TK/CD

++ = sehr guter therapeutischer Effekt

+ = mäßiger therapeutischer Effekt

- = kein therapeutischer Effekt

/ = nicht getestet

In den folgenden Diagrammen werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Zellreihen noch mal detailliert graphisch dargestellt und erläutert. Dabei wird bei einigen Bezug auf die Auswirkung der Inkubationszeit bis zur Ergebnisermittlung, also der Inkubation post infectionem (p.i.) genommen.

a) Ergebnisse Suizidtherapie polI-PNP/6-MPdR

1. guter Effekt der Therapie (293T, A172, U87, #33, #89)

Die 293T-Zellen dienen als Propagierungszelllinie der Influenzaviren. Um die grundsätzliche Möglichkeit der geplanten Versuche zu zeigen, wurden zunächst die Experimente mit diesen Zellen durchgeführt.

HP: nur Helferplasmide transfiziert

HP-polIGFP: Transfektionskontrolle und Negativkontrolle

HP-polIPNP: Positivkontrolle

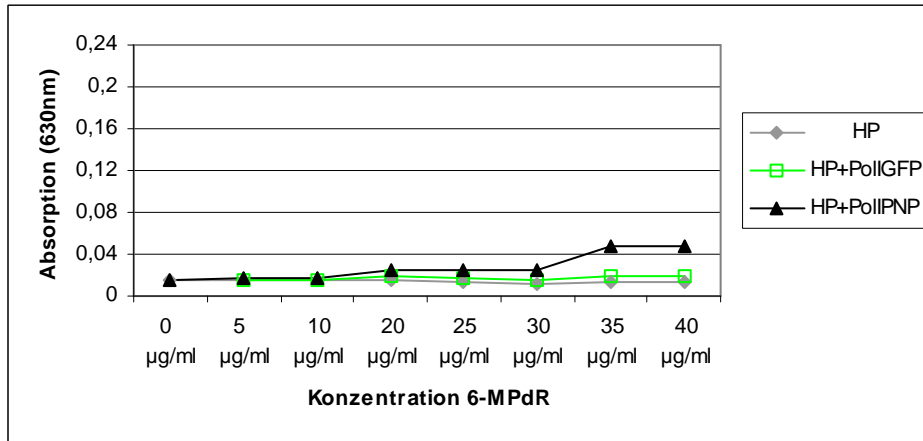


Diagramm 8: Alamar-blue Absorption nach 3-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion von polI-PNP in 293T-Zellen

Das Ausgangsniveau liegt ohne Therapie um den Wert von 0,02, das heißt dass keine Zelle abstirbt. Dieser Wert bleibt auch bei den beiden Kontrollreihen auf diesem konstant niedrigen Niveau. Nur in der Reihe der mit PNP transfizierten Zellen zeigen sich mit steigender Konzentration des Prodrugs Veränderungen der Absorptionswerte. Ab einer Konzentration von 10 µg/ml beginnt sich ein diskreter zytotoxischer Effekt abzubilden. Die Transfektionsrate lag bei ca. 10 %.

Im nächsten Versuch (Diagramm 9) wurde die Inkubationszeit p.i. unter Zugabe von 6-MPdR von 3 auf 6 Tage verlängert.

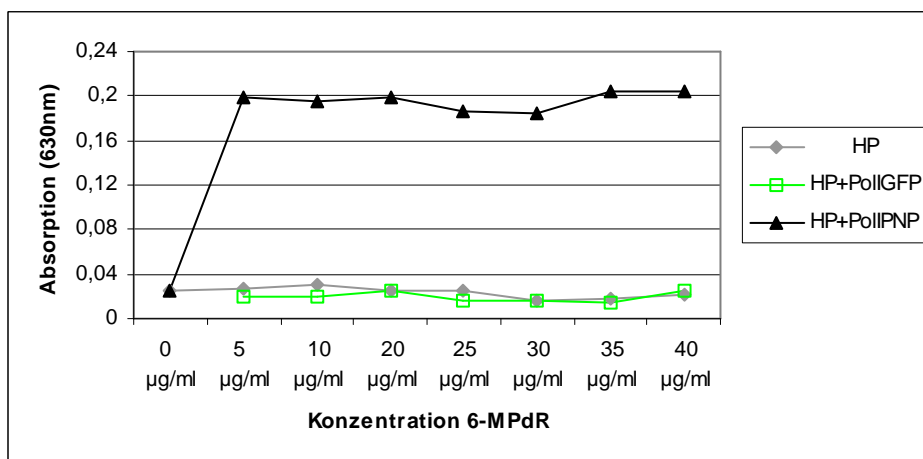


Diagramm 9: Alamar-blue Absorption nach 6-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion von polI-PNP in 293T-Zellen

Durch eine Verlängerung der Behandlungszeit mit 6-MPdR kann bei 293 T-Zellen schon ab einer Konzentration von 5 µg/ml ein deutlicher zytotoxischer Effekt erreicht werden. Die weitere Dosissteigerung führt nur zu geringfügigen Veränderungen der Absorption. Die beiden Kontrollreihen bleiben von der Therapie mit 6-MPdR unberührt.

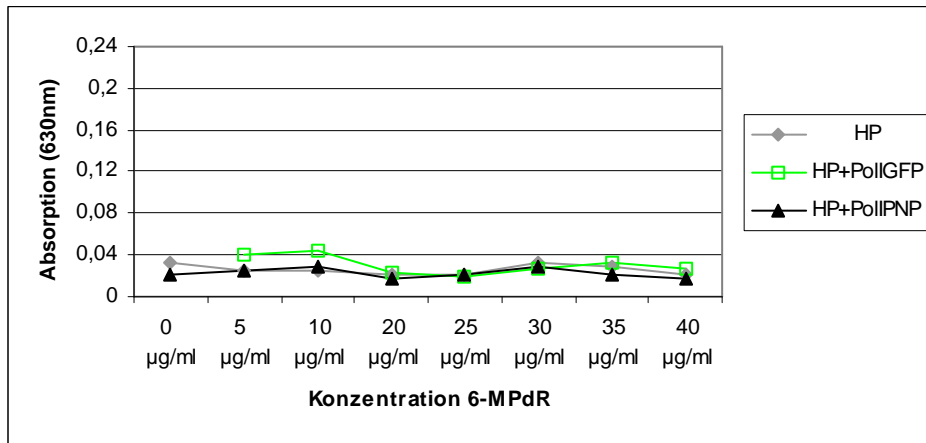


Diagramm 10: Alamar-blue Absorption nach 3-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion von polI-PNP in #33

Nach 3-tägiger Behandlung lässt sich zwar durch die Expression von GFP ein Transfektionserfolg zeigen, ein therapeutischer Effekt findet sich aber nicht.

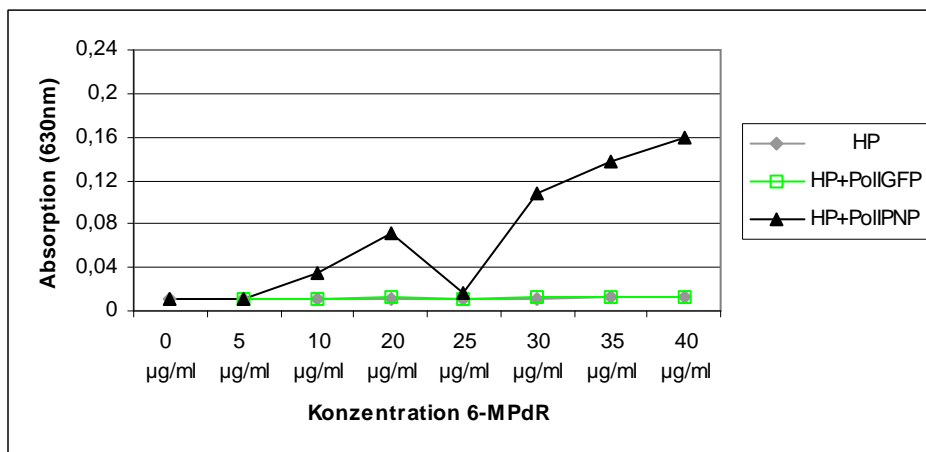


Diagramm 11: Alamar-blue Absorption nach 8-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion polI-PNP in #33

#33 zeigt nach 8 Tagen Therapie mit 6MPdR ab einer Konzentration von 10 µg/ml ein Ansprechen auf die Behandlung. Mit steigender Dosis kommt es zu einer Zunahme der Absorption. Die Kontrollreihen bleiben bei Werten um 0,02 negativ, und entsprechen dem Ausgangswert ohne Therapie. Transfektionsrate ca. 0,5 %.

Nachdem sich gezeigt hat, dass in Abhängigkeit vom Duplikationsintervall der jeweiligen Zelllinie verschiedene Inkubationszeiten notwendig sind, wurden die weiteren Versuche mit einer Inkubationszeit p.i. zwischen 5 und 8 Tagen durchgeführt.

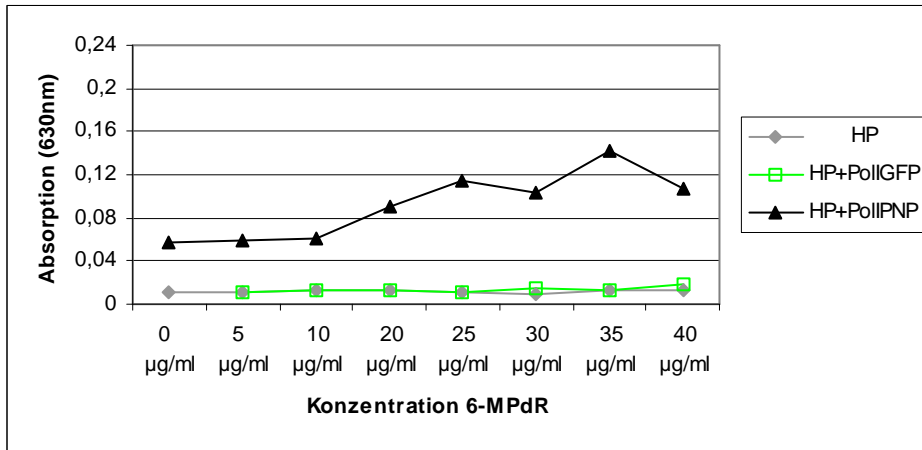


Diagramm 12: Alamar-blue Absorption nach 5-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion poII-PNP in A172

Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen unter Wirkung des 6MPdR stellt sich ein zytotoxischer Effekt ein, der in diesem Fall ab einer Konzentration von 10µg/ml beginnt und mit steigender Dosis zunimmt. Transfektionsrate ca. 0,5 %.

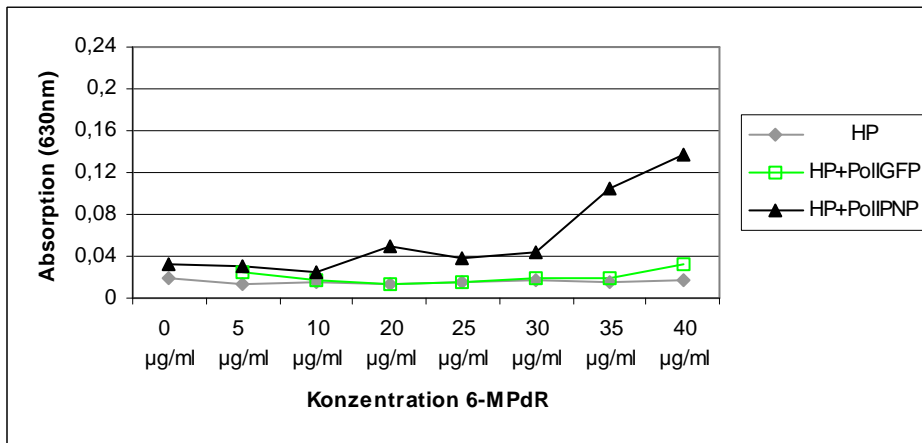


Diagramm 13: Alamar-blue Absorption nach 5-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion poII-PNP in U87

Beginn des therapeutischen Effekts ab einer Prodrugkonzentration von 20 µg/ml, bei niedrigem Verlauf der Kontrollreihen. Die Wirkung ist zunächst schwach und nimmt ab einer Konzentration von 30 µg/ml deutlich zu. Transfektionsrate ca. 0,5 %.

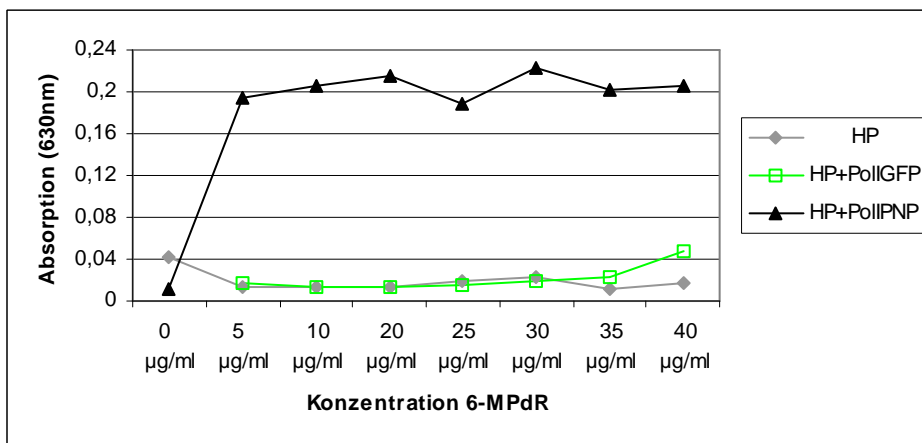


Diagramm 14: Alamar-blue Absorption nach 8-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion poII-PNP in #89

Maximaler zytotoxischer Effekt mit Absorptionwerten um 0,2 ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. Die Kontrollen bleiben auf niedrigem Niveau mit Ausnahme der mit GFP transfizierten Zellen, bei denen es bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ zu einer leichten Nebenwirkung des Prodrugs kommt. Diese Zellreihe gehört in die Gruppe der rasch proliferativen Kulturen. Transfektionsrate ca. 1%.

2. marginaler Effekt der Therapie (#15, #137)

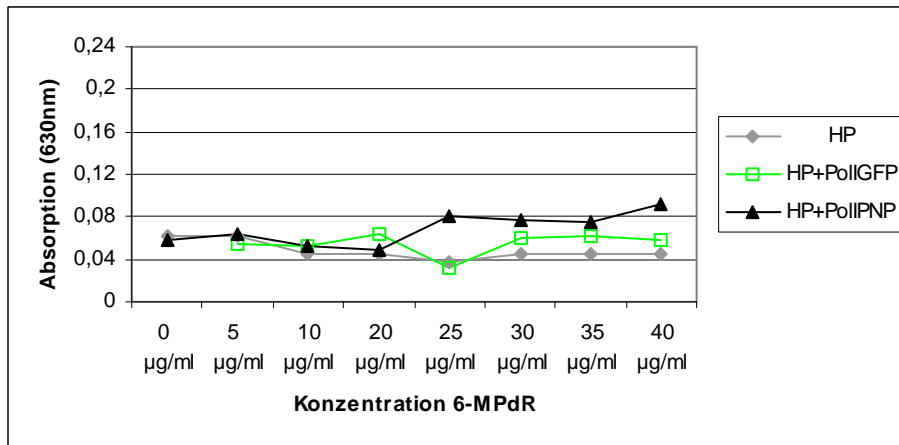


Diagramm 15: Alamar-blue Absorption nach 7-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion polI-PNP in #15

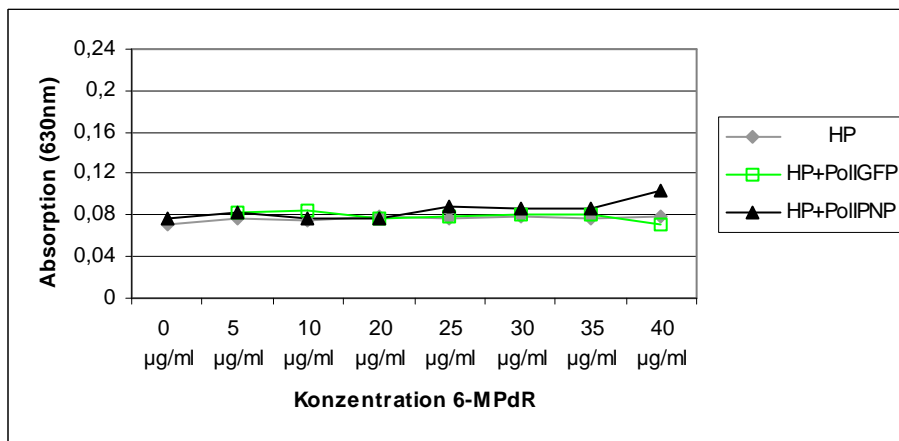


Diagramm 16: Alamar-blue Absorption nach 7-tägiger Prodrugtherapie und Transfektion polI-PNP in #137

Sowohl bei #15 als auch bei #137 zeigt sich ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ ein im Verhältnis zu den Kontrollreihen sichtbarer Effekt, der nicht sehr ausgeprägt ist. Transfektionsrate ca. 0,1 bzw. 0,15 %.

3. kein therapeutischer Effekt

Bei den Zelllinien #5, #138, #141 und #147 zeichnet sich unter Prodruggabe bei einer Transfektionsrate von $< 0,1$ % kein therapeutischer Effekt ab.

b) Ergebnisse Suizidgenetherapie polI-TK/GCV

1. guter Effekt der Therapie (293T)

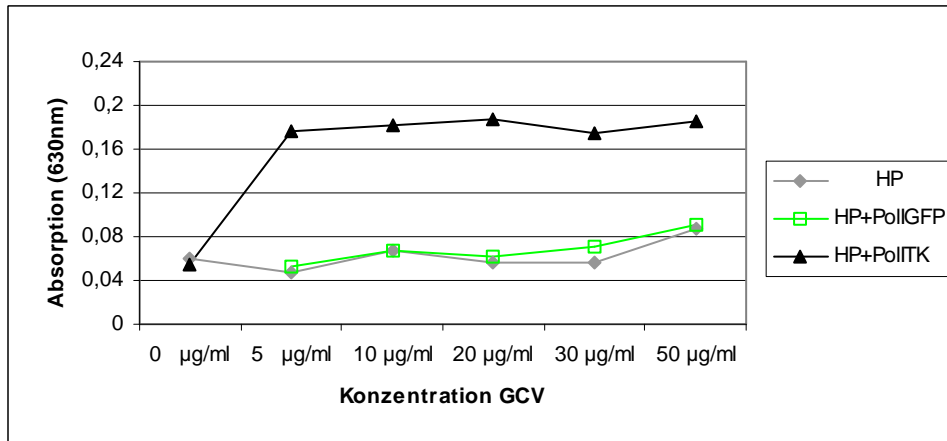


Diagramm 17: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-TK in 293T und 4-tägiger GCV-Therapie

Deutlicher Effekt bei einer GCV-Konzentration von 5 µg/ml. In beiden Kontrollreihen Zunahme der Absorptionswerte bei 50 µg/ml, als Ausdruck der GCV-Nebenwirkung. Die Transfektionsrate liegt bei 10 %.

2. marginaler Effekt der Therapie (A172, U373 und #89)

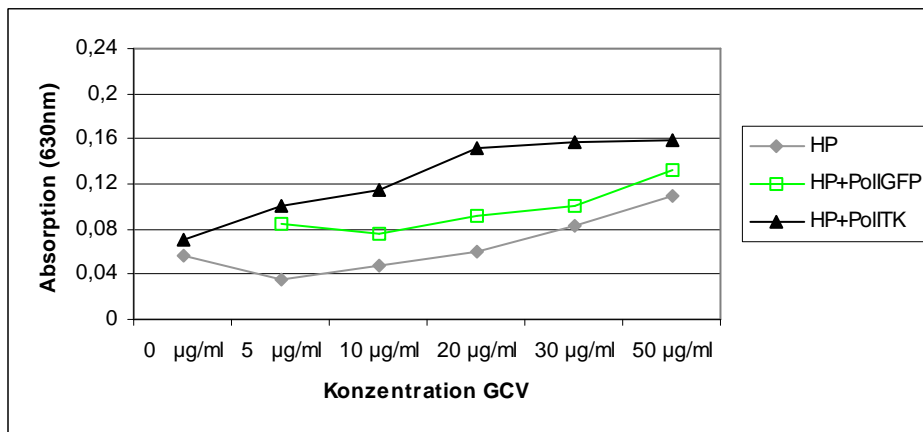


Diagramm 18: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-TK in A172 und 7-tägiger GCV-Therapie

Ab einer GCV-Konzentration von 5 µg/ml kommt es zu einem Anstieg der Absorptionswerte, allerdings nicht nur in den TK-transfizierten Zellen, sondern auch in beiden Kontrollreihen, wenn auch diese Werte hinter denjenigen der TK-transfizierten zurückbleiben. Transfektionsrate ca. 0,5%.

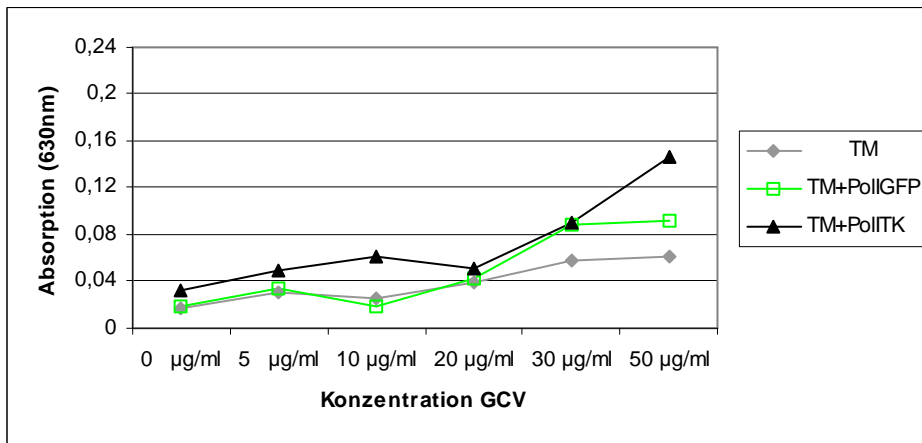


Diagramm 19: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-TK in U373 und 8-tägiger GCV-Therapie

Ab einer GCV-Konzentration von 30 µg/ml Zunahme der Absorptionswerte allerdings auch bei beiden Kontrollreihen. Transfektionsrate ca. 0,5%.

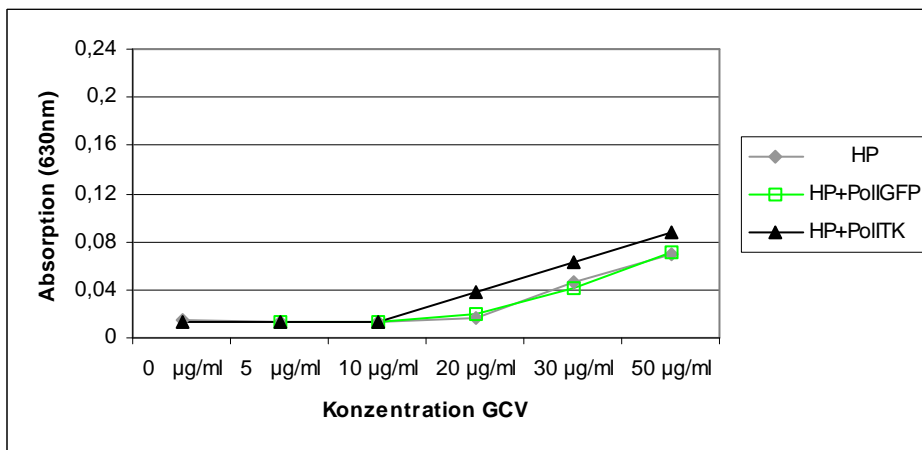


Diagramm 20: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-TK in #89 und 7-tägiger GCV-Therapie

Ab 20 µg/ml GCV Anstieg der Absorptionswerte sowohl bei den TK-transfizierten Zellen als auch in den Kontrollreihen. Transfektionsrate ca. 1%.

3. kein Effekt der Therapie

In den 4 Zelllinien U87, #54, #211 und #215 bleibt ein therapeutischer Effekt aus, wobei die Transfektionsrate bei U87 0,5 % und bei #54, #211 sowie # 215 bei <0,1 % beträgt.

4. Versuche mit Steigerung der Prodrugdosis bei #33

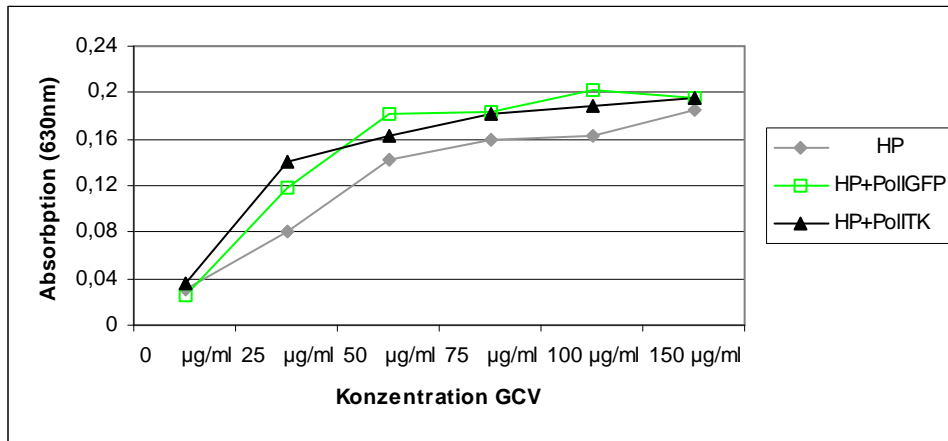


Diagramm 21: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-TK in #33 und 5-tägiger GCV-Therapie in doppelter Dosierung

Auch unter Dosissteigerung zeigt sich ab einer Konzentration von 25 µg/ml ein Anstieg der Absorptionswerte auch in den Kontrollreihen. Transfektionsrate 0,5%.

c) Ergebnisse Suizidgentherapie polI-CD/5-FC

1. guter Effekt der Therapie (293T)

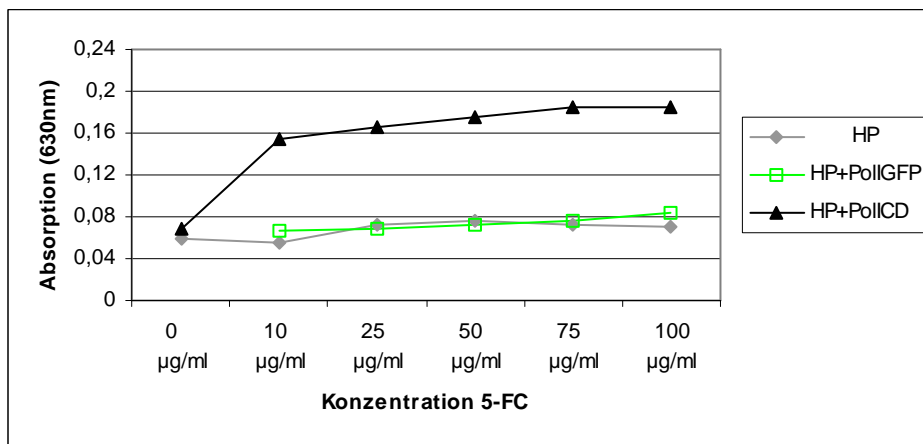


Diagramm 22: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-CD in 293T und 4-tägiger 5-FC-Therapie

Ab einer Konzentration von 10 µg/ml deutlicher Anstieg der Absorptionswerte bei den CD-transfizierten Zellen. In den Kontrollreihen kaum Veränderungen. Transfektionsrate 10%.

2. marginaler Effekt der Therapie (U87, A172)

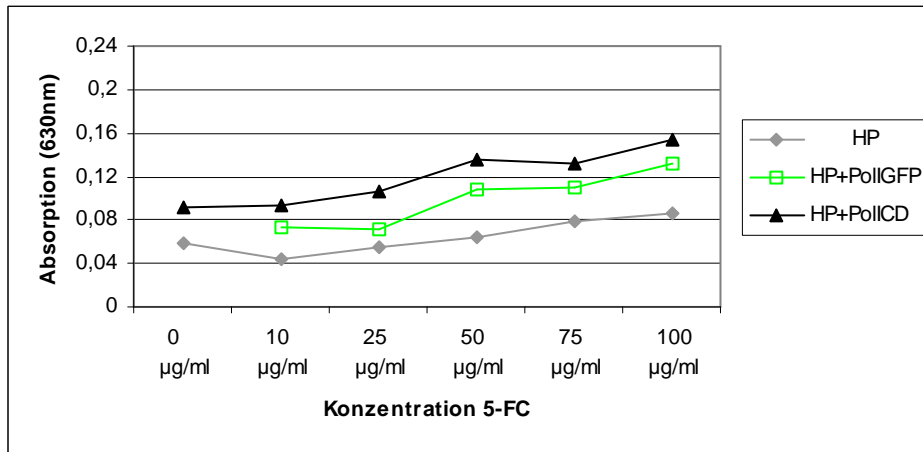


Diagramm 23: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-CD in U87 und 7-tägiger 5-FC-Therapie

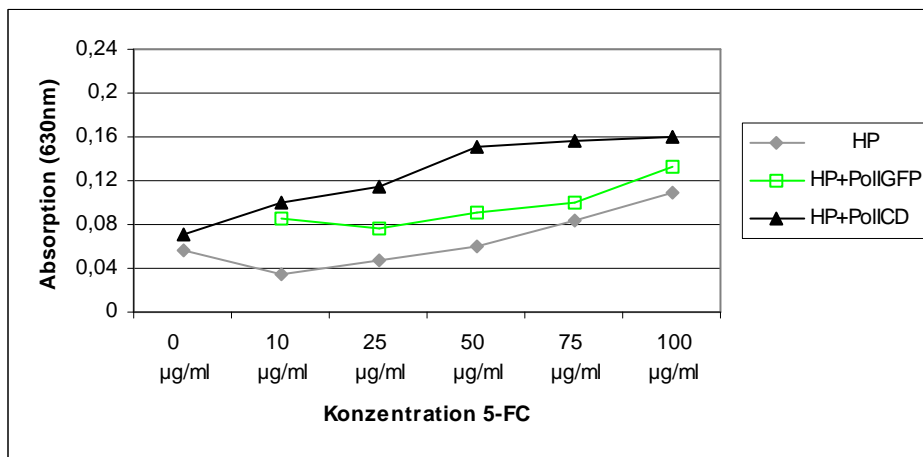


Diagramm 24 : Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-CD in A172 und 7-tägiger 5-FC-Therapie

Kein deutlicher Effekt erzielt in U87 und A172. Anstieg der Absorptionswerte bei allen Zellreihen in Abhängigkeit von der Prodrugkonzentration. Transfektionsrate 0,5%.

3. kein Effekt der Therapie

Auch hier zeigen wieder 4 Zelllinien und zwar U373, #54, #211 und #215 keinen therapeutischen Effekt. Die Transfektionsrate lag dabei bei U373 bei 0,5 % und bei den Zelllinien #54, #211 und #215 <0,1%.

4. Dosissteigerung 5-FC nach Transfektion von polI-CD in #33

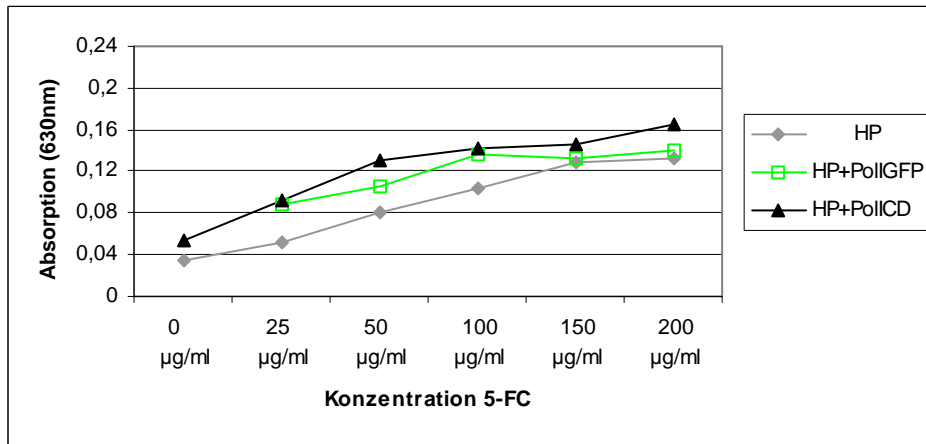


Diagramm 25: Alamar-blue Absorption nach Transfektion polI-CD in #33 und 5-tägiger 5-FC-Therapie in erhöhter Dosierung

Geringer marginaler Effekt im Dosisbereich zwischen 25 und 100 µg/ml.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Listerienmethodik

In der vorliegenden Studie wurde *Listeria monocytogenes* als Genvektor eingesetzt. Das Bakterium trägt das Plasmid pSOG3012, das als Reportergen das LacZ-Gen enthält. Das Plasmid besitzt zwecks Selektion eine Resistenz gegen Erythromycin und eine Multiple-Cloning-Site, in die Fremdgene über entsprechende Restriktionsenzyme inkloniert werden können. Mit dem LacZ-Gen ist es möglich, den Transfektionserfolg der Zielzellen durch Anfärbung im LacZ-Assay nachzuweisen.

Bisher existieren nur wenige Veröffentlichungen über die Verwendung von Listerien oder anderen intrazellulären Bakterien als Fremdgenvektor für humane Zellen (z.B. Caco2-, HeLa- und COS1-Zellen) (Grillot-Courvalin et al., 2002; Hense et al., 2001).

Nachfolgend werden einige Probleme der Methodik vorgestellt und die in dieser Studie verwendeten Lösungsansätze diskutiert.

5.1.1. Zellkultur:

a) Zellzahl: Da die verschiedenen Zelllinien ein unterschiedliches Proliferationsverhalten aufweisen, ist es wichtig dies bei der Zellaussaat zu berücksichtigen. Die Ausgangszellzahl wie auch die Kokultivierungszeit p.i. wurden daher an die jeweilige Zelllinie angepasst.

b) Zellgröße: Bei jeder Zelllinie zeigen sich Unterschiede in der Größe der Einzelzellen. Da zum Infektionszeitpunkt eine Semikonfluenz angestrebt wird, wirken Zellkulturen mit großen Einzelzellen sehr viel dichter, wodurch auch der Eindruck eines deutlicheren Zell-Zell-Kontakts erweckt wird. Da sich Listerien von Zelle zu Zelle fortbewegen ist dies ein weiterer möglicher Grund für unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Zelllinien.

c) Bakterienkonzentration: Die Listerien wurden so kultiviert, dass bei einer OD₆₀₀ von 1,0 eine Bakteriendichte von $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ erreicht wird, was im Verhältnis zu der verwendeten Zellzahl bedeutete, dass jede Zelle von ca. 160 Listerien infiziert werden kann. Dadurch wurde eine konstante Infektionsdosis sichergestellt. Die Entscheidung für die Verwendung dieser Infektionsdosis resultiert aus den Vorversuchen mit 293 T-Zellen (siehe Diagramm 1 und 2).

Francis und Thomas beschreiben, dass eine geringere Anzahl Listerien pro Zelle effektiver sei, da geringere zytotoxische Effekte auftreten (Francis and Thomas, 1996). Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für eine Effizienzsteigerung in zukünftigen Untersuchungen.

d) Kokultivierungszeit nach Infektion: Mit zunehmender Kokultivierungszeit steigt die Transfektionsrate, wie in 293T-Zellen gezeigt. Aus diesem Vorversuch heraus wurde die Kokultivierungszeit auf 5 h festgelegt, wie auch von Moors et al. (1999) beschrieben. Die Bakterien befinden sich nach 5 h in der logarithmischen Wachstumsphase, was zu einer optimierten Invasion führen soll.

e) Zellverluste: Ein wesentliches Problem der Methodik ist der massive Zellverlust, der fast unabhängig von Listerienstyp und Zelllinie auftritt (siehe Tabelle 5). Selbst unter Anwendung der apathogenen Variante *L. innocua* treten mit wenigen Ausnahmen Zellverluste von über 70 % auf. Eine Ausnahme stellt die kommerzielle Zelllinie U87 dar, bei deren Anwendung ein deutlich geringerer Zellverlust, bei akzeptabler Transfektionsrate zu sehen ist. Als mögliche Ursachen für den immensen Zellverlust können postuliert werden:

- die Infektion mit Listerien (Francis and Thomas, 1996 ; Gaillard et al., 1987, Guzman et al., 1995)

- die Antibiotikatherapie: Die Anwendung der Antibiotika macht zum einen viele Medienwechsel notwendig, die das Milieu, in dem sich die Zellen befinden verändern zum anderen ist es möglich, dass die Antibiotika Eigeneffekte auf die Zellen ausüben. Wesentlich ist auch der Zeitpunkt der Antibiotikungabe. Wird es zu früh gegeben, so tötet man sehr viele Listerien ab und reduziert damit die gewünschte Infektionsdosis. Wartet man zu lange, so kann die Infektion nicht mehr wirkungsvoll unterbrochen werden und die Listerieninvasion/-replikation schädigt die Zelle.
- häufige Medienwechseln mit Waschvorgängen und mechanisch bedingtem Zellverlust
- Fixation und Waschvorgänge der LacZ-Nachweisfärbung: Die zur Auswertung verwendete LacZ-Färbung bewirkt durch zahlreiche Spülvorgänge und Fixationen weitere Zellverluste. Bislang wird diesbezüglich allerdings die LacZ-Expression bzw. Färbung als unproblematisch beschrieben (Garcia-Cabrera et al., 1996).

Den oben genannten Problemen wurde in dieser Arbeit durch auf die einzelne Zelllinie abgestimmte Transfektionsprotokolle begegnet. Eine zukünftige Optimierung des Protokolls beinhaltet das Auffangen der nach den jeweiligen methodischen Schritten abgelösten Zellen mit anschließender Zählung bzw. Färbung.

5.2. Diskussion der Ergebnisse der Transfektionsversuche mit dem Vektor *Listeria monocytogenes*

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Transfektionsrate in verschiedenen Zelllinien variiert. So zeigen 293T-Zellen in 10-20 % der Zellen eine LacZ-Expression, während 8 von 10 Glioblastomlinien eine Transfektionseffizienz von weniger als 3 ‰ aufweisen. Dieser Unterschied scheint nicht nur durch das Proliferationsverhalten der Zellen und den Zell-Zell-Kontakt bedingt zu sein, da in diesen Punkten einige Glioblastome den 293T-Zellen sehr ähnlich sind. Eine große Bedeutung könnte die Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche haben, da auch innerhalb dieser Zellgruppe Unterschiede in der Listerieninvasion und damit der Transfektionseffizienz bestehen (Grillot-Courvalin et al., 2002). 293T-Zellen exprimieren darüber hinaus das SV40-T-Zell-Onkogen, das die Listerieninvasion verbessert (Velge et al., 1994).

Andere Studien zeigen Transfektionsraten zwischen 0,3 und 10 % (Hense et al., 2001; Grillot-Courvalin et al., 2002), allerdings bei Anwendung diverser epithelialer Zellen. Vergleicht man Transfektionsverfahren wie Kalziumpräzipitation (Hense et al., 2001) oder liposomale Vektoren (Zerrougi et al., 1996) mit der Listerieninfektion, so liegt die Transfektionsrate bei der Listerieninfektion jeweils unter derjenigen der genannten Alternativen. Zerrougi et al. beschreibt sogar eine Transfektion liposomaler Vektoren mit einer Effizienz von 33-36 % in kommerziellen Glioblastomlinien (C6, U118-MG).

Die LacZ-Expression findet ausschließlich in Zellen statt, die mit L.m.pCS1(LacZ) infiziert wurden. Dies zeigt zum einen, dass keine eigenen zellulären oder bakteriellen Faktoren zur positiven Färbung führen, zum anderen dass Listerien bestimmte Pathogenitätsmechanismen besitzen müssen, um eukaryote Zelle zu invadieren (Gaillard et al., 1996) und eine Fremdgenexpression zu bewirken.

Weiterhin zeigen die Versuche eine Zeitabhängigkeit der Transfektionseffizienz. Wird die Gabe von Tetrazyklin einen Tag verzögert (2 Tage Fremdgenexpressionszeit), so steigt die Transfektionseffizienz um den Faktor 2. Dies könnte dafür sprechen, dass die intrazellulären Listerien eine gewisse Zeit benötigen, um zu replizieren, das Fremdgen zu exprimieren und benachbarte, primär nicht infizierte Zellen durch Zell-Zellwanderung zu erreichen. Diese Beobachtung deckt sich mit Aussagen der Autoren Grillot-Courvalin et al. sowie Hense et al., die zeigen konnten, dass zu geringe Inkubationszeiten keine LacZ-Expression ermöglichen.

Die aufgezeigten Unterschiede in der Transfektionseffizienz legen nahe, dass das biologische Verhalten der Glioblastome untereinander nicht gleich ist. So zeigen Glioblastome mit hoher Proliferation und guter Zelladhäsion eine deutlich höhere Transfektionsrate als Zellkulturen die nur sehr langsam wachsen und seltener passagiert werden müssen. Gliome von geringerem Malignitätsgrad und damit verbundener geringerer Wachstumsrate zeigen ebenfalls eine deutlich geringere Transfektionseffizienz.

5.3. Diskussion der Listerienstrategie

Listerien bieten als Genvektor einige Vorteile, da das Plasmidgenom nicht in das Wirtszellgenom integriert wird und die Zellen nur transient verändert werden. Hingegen führen einige virale Vektoren, insbesondere retrovirale Vektoren zu einer Integration der Fremd-DNA in das Wirtszellgenom mit bleibenden Folgen für diese Zelle (Hermens et al., 1998).

Weiterhin haben Listerien ein äußerst großes Wirtszellspektrum, das sich nicht nur auf epitheliale Zellen, die E-Cadherin exprimieren beschränkt, sondern z.B. auch auf gliale Zellen ausdehnt (Peters und Hewicker-Trautwein, 1994).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Vektor *Listeria monocytogenes* in verschiedenen ZNS-Tumorlinien eine Fremdgenexpression möglich ist und dass gerade in hochgradig malignen Geweben wie den Glioblastomen die Möglichkeiten zur effektiven Expression besser sind als in niedriggradig veränderten Geweben. Neben LacZ könnten somit z.B. Suizidgene in Hirntumore eingeschleust werden und eine Gentherapie ermöglicht werden.

Die Transfektionseffizienz ist auch unter Berücksichtigung der aufgetretenen Zellverluste noch sehr gering. So gibt es einige virale Transfektionsmodelle, die z.B. Transfektionsraten von 45 bzw. 35 % (Rainova et al., 1996; Ram et al., 1993) aufweisen. Dies zeigt, dass im Rahmen weiterer Experimente eine Optimierung angestrebt werden muss.

5.4. Diskussion der Methodik des reversen Influenzamodells

In dieser Arbeit wurde mittels reverser Influenzagenetik eine Fremdgenexpression durch influenzaähnliche Partikel erzielt. Dies wurde erstmals von Luytjes et al., 1989 gezeigt und konnte bisher in verschiedensten Modellen reproduziert werden (Zhang und Air, 1994; Hwang JS et al., 2000).

Die bislang am weitesten verbreiteten, und zum Teil in klinischen Studien verwendeten Vektoren sind retrovirale und adenovirale Vektoren (Stone et al., 2000). Auf RNA basierende virale Vektoren (Hewson, 2000), fanden bislang selten Verwendung, um eine Fremdgenexpression in humanen Zellen zu erzielen. Dabei besitzen sie wesentliche Vorteile in der Anwendung wie zum Beispiel die fehlende Integration des Genoms in das Wirtszellgenom, das gerade bei Retroviren ein erhebliches Problem darstellen kann.

In der vorliegenden Studie wurde ein auf 5 Plasmiden basierendes reverses Influenzasystem (Pleschka et al., 1999) verwendet, mit dem das Reporter-gen GFP und die Suizidgene PNP, TK und CD in 293 T-Zellen und mehreren Glioblastomlinien untersucht wurde.

Nachfolgend sollen einige Probleme bei der Etablierung der Methodik diskutiert werden:

a) Inkubationszeit: Da die verschiedenen Glioblastomlinien ein unterschiedliches Wachstum aufzeigen, ist es sehr schwer eine gemeinsame Inkubationszeit nach erfolgter Transfektion festzulegen. Wird zu lange inkubiert, so können die Zellen durch Nährstoffmangel absterben oder überlebende Zellen überwuchern die transfizierte Zellpopulation, was zur Verfälschung der Ergebnisse führt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Betz et al. bei der

Untersuchung von Gen-Transfektion in Keratinozyten (Betz et al., 1992) und Nguyen et al. bei der Transfektion von Hepatozyten (Nguyen et al., 2003)

b) Medienwechsel: Nach erfolgter Transfektion und Prodruggabe sollten Medienwechsel unterbleiben (Secrist et al., 1999), da durch diesen Wechsel entstandene toxische Metaboliten der Prodrugs, die für den Bystander Effekt zuständig sind, entfernt werden. Dies ist jedoch bei rasch proliferierenden Zellen zum Teil nur schwer einzuhalten, da durch den schnellen Zellmetabolismus sehr viele Nährstoffe benötigt werden, gleichzeitig aber die Fremdgenexpression auch eine gewisse Inkubationszeit beansprucht.

5.5. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion von pcDNA3.1+ (TK/CD)

Die Ergebnisse der pcDNA-Vorversuche belegen die Funktionsfähigkeit der Suizidgenstrategie und helfen die Nebenwirkungsrate der Prodrugs im angewendeten Konzentrationsbereich abzuschätzen.

Eine Transfektion mit pcDNA3.1+TK hat im direkten Vergleich der untersuchten Zelllinien einen besseren therapeutischen Effekt wie pcDNA3.1+CD. Da die Transfektionsraten in beiden Systemen ähnlich sind, können die festgestellten Unterschiede durch das Suizidgen selbst bzw. durch sein Prodrug bedingt sein. Diese Beobachtung wird auch von anderen Autoren (Trinh et al., 1995 und Zhang et al., 1998) beschreiben. Sie konnten aufzeigen, dass bei CD/5-FC höhere Prodrugkonzentrationen notwendig sind, um den gleichen therapeutischen Effekt wie bei TK/GCV zu erhalten und das obwohl der Bystander-Effekt für TK geringer ist als der von CD. Mögliche Gründe dafür könnten zum einen Unterschiede in der Aufnahme des Prodrugs in die Zelle sein oder zum anderen zeitliche Differenzen beim Umsatz des Prodrugs. Bislang existiert keine Literatur die sich mit diesen möglichen Ursachen näher auseinandersetzt.

In dem von uns verwendeten Dosisbereich der Prodrugs traten keine wesentlichen Nebenwirkungen im Sinne von Zytotoxizität auf.

In einem anderen lipofektaminabhängigen Transfektionsmodell (Sturtz et al, 1997) konnte ebenfalls in 5 von 7 Glioblastomen ein therapeutischer Effekt erreicht werden, wobei jedoch nur 2 einen guten Bystander-Effekt aufwiesen. Wie in unserer Arbeit zeigte sich eine Abhängigkeit der Ergebnisse von Replikationszeit und Transfektionsrate, die in diesem Modell bei <1 % lag.

5.6. Diskussion der Ergebnisse der Suizidgentherapie mit dem reversen Influenzamodell

Die Kontrolle mittels GFP-Expression ermöglicht Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz des Systems, und auf den Bystander-Effekt. In der vorliegenden Studie wurden Transfektionsraten von <0,1 - 10 % erzielt. 293 T-Zellen haben dabei mit 10 % der Zellen die höchste Transfektionsrate, vermutlich aufgrund der Expression des SV40-Antigens und der raschen Proliferation. Möglich wäre auch, dass bereits die epitheliale Herkunft der 293 T-Zellen wesentlichen Einfluss auf das Transfektionsergebnis in einem reversen Influenzamodell hat. In den Glioblastomen werden deutlich geringere Transfektionraten (0,1 bis 1 %) in Abhängigkeit vom jeweiligen Wachstumsverhalten erzielt. Je höher die Proliferationsrate, desto höher ist die Transfektionseffizienz. Wie auch von anderen Autoren beschrieben (Kofler et al., 1998) ist die Transfektionsrate bei primären, intraoperativ gewonnenen Glioblastomlinien im Vergleich zu den an die Zellkultur adaptierten kommerziellen Linien geringer.

5.6.1. polI-PNP/6-MPdR

Unter der Anwendung von polI-PNP als Transfektionsvektor akzentuiert sich die Zeitabhängigkeit des Therapieerfolgs von der Inkubationszeit nach Transfektion. So lassen sich bei den humanen Nierenepithelien 293T, den Glioblastomen #33 und A172 Unterschiede im therapeutischen Effekt nach verschiedenen langen Inkubationszeiten nachweisen. Auch die Proliferationszeit der jeweiligen Zelllinie beeinflusst das Therapieergebnis. Zellen mit rascher Proliferation werden besser transfiziert und erlauben damit einen besseren therapeutischen Effekt als langsam wachsende Zellen.

Die meisten Glioblastomlinien wurden für eine Dauer von 5-8 Tagen dem Prodrug 6-MPdR ausgesetzt. Mit Hilfe der beiden Kontrollreihen, konnte nachgewiesen werden, dass 6-MPdR keine zytotoxischen Effekte in dem von uns verwendeten Dosierungsbereich bis 40 µg/ml besitzt. Dies beschreiben auch andere Autoren (Lockett et al., 1997; Secrist et al., 1999). Im Vergleich des Prodrugs zu seiner umgewandelten Form, 6-Methylpurin verhält sich die zytotoxische Dosis wie 160:1 (Secrist et al., 1999), gleichbedeutend mit einer großen therapeutischen Breite des 6-MPdR. Dies macht es zu einem günstigen Stoff für die Anwendung sowohl in vitro als auch in vivo. Erst ab einer Konzentration von >80 µg/ml kann mit zunehmender Inkubationsdauer der behandelten Zellen eine Zunahme der Zytotoxizität festgestellt werden (Puhlmann et al., 1999).

Die Zelllinien, die im 6-MPdR-System therapiert werden können, sprechen ab einer Prodrugkonzentration von 5-10 µg/ml an. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus einem Foamy-viralen Vektorsystem, bei dem es bereits ab einer Prodrugkonzentration von deutlich unter 5 µg/ml und einer Inkubation von 5 Tagen zum Zelltod kommt (Nestler et al., 1997). Weitere Autoren (Puhlmann et al., 1999) beschreiben eine wenigstens 3-tägige Inkubation nach Transfektion bis zur Auswertung. Grundsätzlich geben die Mehrzahl der Autoren individuelle Inkubationszeiten an, die sich auch in der vorliegenden Studie bewährt haben.

Trotz der doch geringen Transfektionseffizienz in den meisten Glioblastomlinien kann in einigen ein therapeutischer Effekt beobachtet werden. Dies spricht für das Vorhandensein, des für PNP beschriebenen Bystander-Effekts (Gadi et al., 2000). Dabei genügen offensichtlich weniger als 1% transfizierter Zellen, um zum Tod der umliegenden Zellen zu führen (Sorscher et al., 1994) und ein direkter Zellkontakt untereinander ist nicht notwendig (Hughes et al., 1998). Dies konnte nicht nur für die Anwendung von PNP in vitro sondern auch in vivo gezeigt werden (Gadi et al., 2000). Der Effekt ist umso höher, je mehr Zellen transfiziert sind und PNP exprimieren (Parker et al., 1997).

5.6.2. polI-TK/GCV

Wie auch von anderen Autoren (Beck et al., 1995) beschrieben kann bei einer Verdopplung der Inkubationszeit bereits ab einer GCV-Dosis von 5 µg/ml ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Neben der Zeitabhängigkeit beschreiben diese auch noch eine Abhängigkeit der Transfektionsrate von der jeweiligen Zellart, die in mesenchymalen bzw. epithelialen Zellen höher ist. Auch in unseren Untersuchungen zeigten sich deutliche Unterschiede der Transfektionsrate bei verschiedenen Zelllinien.

Der Unterschied zwischen den epithelialen Zellen 293T und den Glioblastomlinien kann durch ein unterschiedliches Expressionsverhalten von Connexin 43, das über die Bildung von gap-junctions wesentlich am Bystander-Effekt des TK/GCV-Systems beteiligt ist, bedingt sein (Sorocenu et al., 2001). Je höher die Malignität eines glialen Tumors, desto geringer die Expression von Connexin-43 und damit auch der Bystander-Effekt (Sorocenu et al., 2001 und Zhang et al., 2003). Werden mehr gap-junctions ausgebildet, so haben die Zellen einen intensiveren Kontakt untereinander und die aus dem GCV gebildete aktive Triphosphatform kann von einer Zelle zur nächsten gelangen (Grignet-Debus et al., 2000).

Gerade gliale Zellen exprimieren TK nur kurz, was bei zu später Prodruggabe zu einem geringeren Therapieeffekt führen kann (Hadaczek et al., 2005). Die in unseren Untersuchungen beibehaltene Zeit zwischen Transfektion und Beginn der Behandlung könnte daher mit 24 h bereits zu lange gewesen sein.

Ab einer GCV-Konzentration von 20 µg/ml kommt es auch in den Kontrollreihen zu zytotoxischen Nebenwirkungen des GCV. Ähnliche Schwellendosen für das Auftreten der zytotoxischen Nebenwirkungen wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Sturtz et al., 1997; Aghi et al., 1998). Möglicherweise trägt das Influenzavektormodell zu solchen Effekten mit bei, da bei Transfektion mit pcDNA3.1 diese weniger ausgeprägt sind.

Im Rahmen weiterer Versuche ist es notwendig diese möglichen Einflußfaktoren zu präzisieren und Rückschlüsse für eine erfolgreiche Transfektion zu gewinnen.

Es gibt verschiedene Methoden, die die Effektivität eines TK/GCV-Systems erhöhen sollen, so z.B. die gleichzeitig stattfindende Behandlung mit einem Topoisomerase-Inhibitor Topotecan (Wildner et al., 1999), eine vorausgehende Behandlung der zu transfizierenden Zellen mit einer Protease (Kuriyama et al., 2001) oder die gleichzeitige Expression von TNF-alpha und nachfolgende Bestrahlung (Niranjan et al., 2000). Aber auch diesbezüglich besteht noch weiterer Forschungsbedarf um ein effizientes System zu etablieren und eine Anwendung in vivo zu ermöglichen.

5.6.3. polI-CD/5-FC

Mit dem in dieser Studie verwendeten Transfektionssystem lässt sich nur in wenigen Zelllinien ein therapeutischer Effekt erzielen. Andere Transfektionsmodelle zeigen deutlichere therapeutische Effekte (Sheng-Qing et al., 2003). Eine mögliche Ursache ist die zu geringe Transfektionsrate, die selbst unter der Annahme des Bystander-Effekts zu gering ist, um einen Effekt zu bewirken. Darüberhinaus konnte gerade für Gliome eine von Linie zu Linie stark schwankende Empfindlichkeit gegenüber 5-FU festgestellt werden (Miller et al., 2002). Vergleicht man die Sensitivität von Gliomen zu derjenigen epithelialer Zellen, so werden in der Literatur gleiche Ansprechraten beschrieben (Miller et al., 2002). Dies ließ sich in unseren Untersuchungen nicht bestätigen, vielmehr zeigte sich ein dominanter Effekt in epithelialen 293 T Zellen. Hier könnten Einflüsse seitens des verwendeten Transfektionssystems eine Rolle spielen.

Im CD/5-FC-System spielt der Zellkontakt im Gegensatz zum TK/GCV-System eine untergeordnete Rolle, da dass umgesetzte 5-FU frei über Zellmembranen diffundieren kann (Huber et al., 1994 und Trinh et al., 1995). Dafür muss genügend 5-FC durch die Cytosinpermease in die Zellen aufgenommen und durch die Cytosindeaminase zu 5-FU umgesetzt werden, wobei ein schneller Efflux des 5-FC zu einem limitierenden Faktor werden kann (Haberkorn et al., 1996). Von Nestler et al. wurde auch postuliert, dass CD zu einem relativ langsamen Zelltod führt, so dass eine zu kurze Inkubationszeit nach Therapie den Effekt verringern kann. In den vorliegenden Versuchen ergab eine längere Inkubationszeit jedoch nicht zwingend eine erhöhte Therapieeffizienz.

Ab einer Prodrugkonzentration von 50 µg/ml zeigen sich in den Kontrollreihen der Glioblastome zytotoxische Nebenwirkungen, was sich mit den Ergebnissen von Aghi et al., 1998 deckt. Andere Autoren (Rogulski et al., 1997) beschreiben selbst bei Konzentrationen von 80 µg/ml keine Reduktion der Zellvitalität. Damit ist die Datenlage im Gegensatz zu TK und PNP deutlich inkonstanter.

Es existieren einige Protokolle die auf gentechnischem Weg die Effizienz des CD/5FC-Systems steigern können (Aghi et al., 1998; Uckert et al., 1998; Chang et al., 2000 und Adachi et al., 2000). Unter anderem ist die Doppeltransfektion von CD und TK vielversprechend, da die Zellen sensitiver auf die Prodrugs reagieren und Konzentrationen von 1 µg/ml (5-FC) bzw. 0,1 µg/ml (GCV) ausreichen um z.B. in 9L-Glioblastomen

therapeutische Effekte zu erzielen (Aghi et al., 1998). Es wird postuliert, dass durch die Anwesenheit von 5-FU eine verstärkte Phosphorylierung des GCV erfolgt und damit eine erhöhte Wirksamkeit entsteht. Auch *in vivo* konnte der Nutzen eines solchen Doppeltransfektionsmodells nachgewiesen werden (Uckert et al., 1998).

5.7. Ausblick

a) Listerien

Eine Anwendung im Menschen, die nach den vorgelegten Ergebnissen denkbar scheint, erfordert aus medizinischer und ethischer Sicht weitere Vorarbeiten. Es müssten apathogene Listerienvarianten ohne Verlust der Invasionsfähigkeit und Transfektionseffizienz eingesetzt werden, um eine systemische Infektion des Wirtes zu verhindern. Listerien müssen spezifisch die hochproliferativen Zellen eines Tumors erreichen, ohne benachbarte, gesunde Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen.

Die Anwendung von Listerien im Rahmen der Suizidgentherapie wäre von deutlichem Vorteil, da sich Listerien durch die Zell-Zell-Wanderung aktiv im Tumor ausbreiten können und damit mehr Zellen erreichen als bisher bekannte Vektorsysteme, die meist nur die Zellen beeinflussen können die sie auch transfizieren. Eine erhöhte Transfektionsrate würde sich mit dem auftretenden Bystander-Effekt in seiner Wirkung summieren und theoretisch eine suffiziente Therapie ermöglichen.

Im Hinblick auf eine angestrebte Anwendung im Bereich der Glioblastom-Gentherapie sollte weiterhin eine Neuroselektivität der Listerien angestrebt werden, um systemische Infektionen des Wirtes zu vermeiden.

b) Influenza

Für Influenza sind ausgehend von der reversen Genetik weitere Schritte notwendig, um eine Anwendung zur Tumorthherapie *in vivo*, z.B. im Tiermodell, zu ermöglichen. Basierend auf den Erkenntnissen wäre es sinnvoll ein replikationsinkompetentes Influenzavirus zu konstruieren, das genau einmal infiziert und repliziert. In einer geeigneten Zellkultur können damit Viren gewonnen werden, die dann in den Tumor eingebracht werden und nach einmaliger Replikation des Virus unter Fremdgenexpression kann mit der Prodrugtherapie begonnen werden. Problematisch wäre wiederum der Applikationsweg unter Vermeidung systemischer Wirkungen oder immunologischer Inaktivierungen. Weiterhin müsste eine Spezifität für hochproliferatives Tumorgewebe oder Zellrezeptoren vorliegen, um eine gezielte Therapie zu ermöglichen. Auch die jeweilige Gabe der Prodrugs kann sich problematisch gestalten, da diese in ausreichend hoher Konzentration über die Blut-Hirn-Schranke gelangen müssen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *Listeria monocytogenes* als Vektor für den Gentransfer in Glioblastome einsetzbar ist. Eine Fremdgenexpression von Indikatorgenen wie z.B. *lacZ* ist möglich und der Transfer von Suizidgenen denkbar. Stark proliferierende Zellen wie 293 T zeigen eine deutlich höhere Transfektionsrate wie langsam wachsende Zellen. Apathogenen Listerien wie *Listeria innocua* können keine Fremdgenexpression in Glioblastomen hervorrufen.

Gegenstand weiterer Untersuchungen sind die Optimierung der Transfektionsrate, die Verringerung des Zellverlustes im Modellsystem und die Suizidgentherapie im Zellkulturmodell.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es mit einem reversen influenzaähnlichen Transfektionsmodell möglich ist, in Glioblastomen Fremdgenexpression zu induzieren. Die Transfektionsrate hängt stark vom Proliferationsverhalten der jeweiligen Zelllinie ab.

PNP zeigte bei den getesteten Glioblastomen den deutlichsten therapeutischen Effekt. Daran beteiligt ist ein stark ausgeprägter Bystander-Effekt. Die Suizidenzyme TK und CD konnten bei gleicher Transfektionsrate seltener einen therapeutischen Effekt hervorrufen. Auch in diesem Modell sind Optimierungen und die Untersuchung einer großen Zahl von Glioblastomen Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Ausgehend von unseren Ergebnissen ist die Entwicklung eines apathogenen Influenzavirus zur einmaligen Infektion denkbar, darüber hinaus eignen sich die untersuchten Suizidgene zur Verwendung im Listerien-System.

Wir folgern daher, dass:

- 1) *Listeria monocytogene* als Vektor für die Fremdgenexpression (lacZ) in Glioblastomen und Gliomen verwendet werden kann.
- 2) Die Infektion mit apathogenen Listerien wie *Listeria innocua* zu keiner Fremdgenexpression in Glioblastomen führt.
- 3) Schnell wachsende Zellen wie 293T-Zellen eine höhere Transfektionsrate nach Listerieninfektion zeigen
- 4) Ein auf die Verwendung von 5 Plasmiden basierendes reverses genetisches System ebenfalls zur Expression von Fremdgenen wie Suizidgenen führen kann.
- 5) Im Vergleich zu CD und TK, das PNP/6-MPdR-System den besten therapeutischen Effekt in Zellkultur zeigt, basierend auf einen deutlich besseren Bystander-Effekt.
- 6) Transfektionsraten in Glioblastomen deutlich geringer sind als in epithelialen Zellen wie 293T

Conclusion:

In this study we demonstrated that *Listeria monocytogenes* can be a vector for gene transfer in glioblastoma. Thus it is possible to express foreign genes like indicator-gens (lacZ) or suicide genes. In high proliferating cells (293T) the rate of transfection is significant higher than in slow growing cells. Apathogen *Listeria*s like *Listeria innocua* are not able to cause such an expression.

In further studies we have to optimize the efficacy of transfection, to reduce the loss of cells and to try suicide gene therapy in cultured cells.

Further more we showed that foreign gene expression in glioblastoma can also be achieved by a reverse genetic influenza system. The efficacy of transfection depends on the proliferation of the cells.

PNP showed the best therapeutical effect in the tested glioblastomas based on a very good bystander effect. The suicide genes TK and CD showed significant lower effects.

In further studies we have to modify the transfection modell to optimize the results and we have to test a higher amount of different glioblastomas.

Based on our results its possible to develop a apathogen influenza virus for single infection and to use the described suicide genes in a listeria based transfection system.

Overall we conclude:

- 1) *Listeria monocytogenes* can be used as a vector for foreign gene expression (lacZ) in glioblastoma and glioma
- 2) Apathogen *Listeria innocua*-infection can't cause gene expression in glioblastoma
- 3) *Listeria* mediated gene expression is more effective in high proliferating cells like 293 T-cells
- 4) A reverse genetic system based on the use of 5 plasmids can also cause expression of foreign genes like suicide genes.
- 5) In comparison to CD and TK, the expression of PNP followed by the application of 6-MPdR showed the best therapeutical effect in cell culture based on a good bystander effect.
- 6) Efficacy of transfection in glioblastoma is poor compared to epithelial cells like 293T

7. Literaturverzeichnis

Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H, Ohmoto T. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 2000 ; 11(1) : 77-89

Aghi M, Kramm CM, Chou TC, Breakefield XO, Chiocca EA. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Nat Cancer Inst* 1998 ; 90(5): 370-80

Ahmad SI, Pritchard RH. Location of gene specifying cytosine Deaminase in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1972 ; 118(4) : 323-25

Beck C, Cayeux S, Lupton SD, Dorken B, Blankenstein T. The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Hum Gene Ther* 1995 ; 6(12) : 1525-30

Beltinger C, Fulda S, Kammertöns T, Meyer E, Uckert W, Debatin KM. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96(15) : 8699-704

Betz NA, Woltermann KJ, Reiners JJ, Pelling JC. DNA-mediated gene transfection into primary cultures of adult mouse keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992 ; 28A (3 Pt 1) : 188-92

Bi LB, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993 ; 4 : 725-31

Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS, Bigner DD. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 8017-22

Bille J. Epidemiology of humane listeriosis in Europe, with special reference to the swiss outbreak. In Foodborne listeriosis 1990. Society of industrial Microbiology. Miller AJ, Smith JL, Somkuti GA, editors. Elsevier Science Publishing, Inc, New York, 71-74

Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol* 1998 ; 72(7) : 5493-5501

Bradshaw GL, Schwartz CD, Schlesinger RW. Replication of H1N1 influenza viruses in cultured mouse embryo brain cells: virus strain and cell differentiation affect synthesis of proteins encoded in RNA segments 7 and 8 and efficiency of mRNA splicing. *Virology* 1990; 176 : 390-402

Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 2000 ; 54(4) : 196-209

Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 1996 ; 70 (12) : 8391-8401

Bzowska A, Kulikowska E, Shugar D. Properties of purine nucleoside Phosphorylase (PNP) of mamillian and bacterial origin. *Z Naturforsch* 1990 ; 45 (1-2) : 59-70

Calfee DP, Hayden FG. New approaches to influenza chemotherapy. Neuraminidase inhibitors. *Drugs* 1998 , 56 : 537-53

Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidyl-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 1991 ;173 : 751-54

Carpenter DE, Stevens JG. Long-term expression of a foreign gene from a unique position in the latent herpes simplex virus genome. *Hum Gene Ther.* 1996 ; 7 : 1447-54

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for foreign gene expression.

Chandler KL, Prados MD, Malec M, Wilson CB. Long-Term Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme. *J Neurosurg* 1993 ; 32(5) : 716-20

Chang JW, Lee H, Kim E, Lee Y, Chung SS, Kim JH. Combined antitumor effects of an adenoviral cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene in rat C6 glioma. *Neurosurg* 2000 ; 47(4) : 931-38

Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, Ji XD, Shih CC, Arap W, Huang CM, Cavenee WK. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 3(16) : 8502-07

Chakraborty T. Molecular and cell biological aspects of infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 1999 ; 201(2) : 155-63

Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel P, Pistor S, Temm-Grove CJ, Jockusch BM, Reinhard M, Walter U. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria inanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 1995 ; 14 : 1314-21

- Chakraborty T, Hain T, Domann E.** Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* 2000 ; 290(2) : 167-74
- Chakraborty T, Leimeister-Wächter M, Domann E, Hartel M, Goebel W, Nichterlein T, Notermans S.** Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 1992 ; 174 : 568-74
- Chandler KL, Prados MD, Malec M, Wilson CB.** Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 1993 ; 32(5) : 716-20
- 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* 1995 ; 6(11) : 1467-76
- Cole MB, Jones MV, Holyoak C.** The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 1990 ; 69(1) : 63-72
- Compans RW, Choppin PW.** Reproduction of myxoviruses. In: Fränkel-Conrat, H. ; Wagnet, RR, eds. *Comprehensive Virology IV* 1975. New York: Plenum: 179-252
- Compans RW, Content J, Duesburg PH.** Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virology* 1972 ; 10 : 795-800
- Conlan WJ.** Early Host-Pathogen Interactions in the Liver and Spleen during Systemic Murine Listeriosis: an Overview. *Immunobiol* 1999 ; 201 : 178-87
- Conlan WJ, North RJ.** Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994 ; 179 (1) : 259-68
- Cooper JA Jr, Carcelen R, Culbreth R.** Effects of influenza A nucleoprotein on polymorphonuclear neutrophil function. *J Infect Dis* 1996 ; 173(2) : 279-84
- Cooper MJ.** Noninfectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. *Sem Oncol.* 1996 ; 23(1) : 172-87
- Cossart P, Lecuit M.** Interactions of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* with mammalian cells : bacterial factors, cellular ligands, and signaling. *EMBO* 1998 ; 17 : 3797-3806
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S.** In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992 ; 256 : 1550-52
- Danielsen M, Kilstrup M, Barilla K, Jochimsen B, Neuhaard J.** Characterization of the *Escherichia coli* *codBA* operon encoding cytosine permease and cytosine desaminase. *Mol Microbiol* 1992 ; 6: 1335-44
- Dean DA.** Import of Plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* 1997 ; 230 (2) : 293-302

Dold FG, Sanger JM, Sanger JW. Intact alpha-actinin molecules are needed for both the assembly of actin into tails and the locomotion of *Listeria monocytogenes* inside infected cells. *Cell Mot Cytoskel* 1994 ; 28 : 915-28

Domann E, Leimeister-Wachter M, Goebel W, Chakraborty T. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immunol* 1991 ; 59 : 65-72

Domin BA, Mahony WB, Zimmerman TP. Transport of 5-fluoruracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 1993 ; 46 : 503-07

Dons L, Weclawicz K, Jin Y, Bindseil E, Olsen JE, Kristensson K. Rat dorsal root ganglia neurons as a model for *Listeria monocytogenes* infections in culture. *Med Microbiol Immunol* 1999 ; 188(1) : 15-21

Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P. Entry of *L.monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB ,a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 1995 ; 16 : 251-61

Dramsi S, Levi S, Triller A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* 1998 ; 66(9) : 4461-68

Drevets D. *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol* 1997 ; 158 : 5305-13

Dunn CJ, Goa KL. Zanamivir: a review of its use in influenza. *Drugs* 1999 ; 58 : 761-84

Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, Hess J, Lottspeich F, Goebel W, Sokolovic Z. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* 1996 ; 21(4) : 823-37

Estin D, Li M, Spray D, Wu JK. Connexins are expressed in primari brain tumors and enhanced the bystander effect in gene therapy. *J Neurosurg* 1999 ; 44(2) : 361

Everest P, Frankel G, Li J, Lund P, Chatfield S, Dougan G. Expression of lac-Z from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 1995 , 126 (1) : 97-101

Farber JM, Pterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991 ; 55 : 476-511

Field AK, Davies ME, De Witt C, Perry HD, Liou R, Germershausen J, Karkay JD, Ashton WT, Johnston DBR, Tolman RL. 9-(2-hydroxy-1-hydroxymethylethoxymethyl) guanine : a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 4139-43

Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownee GG, Garcia-Sastre A. Rescue of Influenza A Virus from recombinant DNA. *J Virol* 1999 ; 73(11) : 9679-82

Francis MS, Thomas CJ. Effect of multiplicity of infection on *Listeria monocytogenes* pathogenicity for HeLa and Caco-2 cell lines. *J Med Microbiol* 1996 ; 45(5) : 323-30

Francis T, Moore AE. A study on the neurotropic tendency in strain of the virus of epidemic influenza. *J Exp Med* 1940 ; 72 : 717-28

Freeman SM. Tumor regression when a fraction of the tumor mass contains the HSV-TK gene. *J Cell Biochem* 1992 16 (Suppl) : 47

Freeman SM. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993 ; 5274-83

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomid and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* ; 2000 6(7) : 2585-97

Gadi VK, Alexander SD, Kudlow JE, Allan P, Parker WB, Sorscher EJ. In vivo sensitisation of ovarian tumors to chemotherapy by expression of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase in a small fraction of cells. *Gene Ther* 2000 ; 7(20) : 1738-43

Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1986 ; 52 : 50-55

Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte cell line Caco-2 *Infect and Immun* 1987 ; 55(11) : 2822-29

Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by Internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram positiv cocci. *Cell* 1991 ; 65(7) : 1127-41

Garcia-Cabrera I, Edvardsen K, Tysnes BB, Read T, Bjerkvig R. The lac-Z reporter gene: a tool for in vitro studies of malignant glioma cell invasion. *Invasion Metastasis* 1996 ; 16(3) : 107-15

Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 1998; 252: 324-30

Gautier C, Mehtali M, Lathe R. A ubiquitous mammalian expression vector, pHMG, based on a housekeeping gene promotor. *Nucleic Acids Res.* 1989 ; 17 : 8389

Go Y, Chintala SK, Oka K, Gokaslan Z, Sawaya R, Rao JS. Invasive pattern of lac-Z-transfected human glioblastoma cells in nude mice brain. *Cancer Lett* 1996 ; 110(1-2) : 225-31

Graham FL, Van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus-5 DNA. *Virology* 1973 ; 52 : 456-67

Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Daniels J, Kuhn M. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* 2000 ; 68(6) : 3275-79

- Grignet-Debus C, Cool V, Baudson N, Velu T, Calberg-Bacq CM.** The role of cellular- and prodrug associated factors in the bystander effect induced by the varicella zoster and herpes simplex viral thymidine kinase in suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2000 ; 7(11) : 1456-68
- Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P.** Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microb* 2002 ; 4(3) : 177-186
- Guillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P.** Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991 ; 65 : 1127-41
- Gunter KC, Khan AS, Noguchi PD.** The safety of retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 1993 ; 4 : 643-45
- Guzman CA, Rohde M, Chakraborty T, Domann E, Hudel M, Wehland J, Timmid KN.** Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect and Immun* 1995 ; 63(9) : 3665-3673
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN.** Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant. *Mol Microbiol* 1996 ; 20 : 119-26
- Haberkorn U, Oberdorfer F, Gebert J, Morr I, Haack K, Weber K, Lindauer M, van Kaick G, Schackert HK.** Monitoring gene therapy with cytosine deaminase: in vitro studies using tritiated 5- fluorocytosine. *J Nucl Med* 1996; 37(1) : 87-94
- Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K.** Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidinekinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg.* 2005 ; 102(2) : 328-35
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR.** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 1991 ; 204 : 63-113
- Hay AJ, Abraham G, Skehel JJ, Smith JC, Fellner P.** Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. *Nucleic Acid Res* 1977 ; 4 : 4197-4209
- Hay AJ, Skehel JJ, Mc Cauley J.** Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* 1982 ; 116 : 517-22
- Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KEJ, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S.** Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microb* 2001 ; 3(9) : 599
- Hermens WT, Verhaagen J.** Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998 ; 55(4) : 399-432
- Hewson R.** RNA viruses: emerging vectors for vaccination and gene therapy. *Mol Med Today* 2000 ; 6 : 28-35

Hirsch MS, Kaplan JC, Dáquila RT. Antiviral agents. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Vol.1.3rd ed. Philadelphia :Lippincott-Raven; 1996.p. 431-66

Hoffmann E, Naumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97(11) : 6108-13

Honda A, Ishihima A. Transcription and replication of influenza virus genom. *Nippon Rinsho* 1997 ; 55(10) : 2555-61

Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good S. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase. A significant antitumor effect when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 8302-06

Hughes BW, King SA, Allan PW, Parker WB, Sorcher EJ. Cell to cell contact is not required for bystander cell killing by *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem.* 1998 ; 273(4) : 2322-28

Hwang JS, Yamada K, Honda A, Nakade K, Ishihama A. Expression of functional influenza virus RNA polymerase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Virol* 2000 ; 74(9) : 4074-84

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990 ; 96 : 23-28

Iretton K, Payrastre B, Chap H, Ogawa W, Sakaue H, Kasuga M, Cossart P. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 1996 ; 274 : 780-82

Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Yoshida Y, Hamada H, Ohmoto T. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine(cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Canc Gene Ther* 2000 ; 7(1) : 74-82

Jones D, Seeliger H. The genus *Listeria*. In: *The Prokaryotes*, 2nd ed.1992. Heidelberg. Springer Verlag : 1595-1616

Kilbourne ED. *Influenza*. Plenum Press : New York ;1987

Kim JH, Kolozsvary A, Rogulski K, Khil MS, Brown SL, Freytag SO. Selective radiosensitization of 9L glioma in the brain transduces with double suicide fusion gene. *Cancer J Sci Am* 1998 ; 4(6) : 364-69

Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, Marro B, Boyer O, Mokhtari K, Diquet B, Salzmann JL, Philippon J. A phase 1-2 Study of herpes simplex virus Type 1 Thymidine kinase Suicide gene therapy for recurrent glioblastoma. *Hum Gene Ther* 1998 ; 9 : 2595-2604

Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 1975 ; 68 : 426-39

Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Ohayon H, Berche P, Cossart P. Listeria monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. Cell 1992 ; 68 : 521-31

Kocks C, Marchand JB, Gouin E, d'Hauteville H, Sansonetti PJ, Carlier MF, Cossart P. The unrelated surface proteins ActA of Listeria monocytogenes and IcsA of Shigella flexneri are sufficient to confer actin-based motility to L. innocua and E. coli respectively. Mol Microbiol 1995 ; 18 : 413-23

Kofler P, Wiesenhofer B, Rehrl C, Baier G, Stockhammer G, Humpel C. Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo. Cell Transplant 1998 ; 7(2) : 175-85

Kotin RM, Berns KI. Organization of adeno-associated virus DNA in latency infected Detroit 6 cells. Virology 1989 ; 170 : 460-67

Kraus JA, Wenghoefer M, Schmidt MC, von Deumling A, Berweiler U, Roggendorf W, Dietsch S, Dietzmann K, Muller B, Heuser K, Reifenberger G, Schlegel U. Long-term survival of glioblastoma multiforme: importance of histopathological reevaluation. J Neurol 2000 ; 247(6) : 455-60

Krull M, Nost R, Hippenstiel S, Domann E, Chakraborty T and Suttorp N. Listeria monocytogenes potently induces upregulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. J Immunol 1997 ; 159 : 1970-76

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, De Monte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival. J Neurosurg 2001 ; 95(2) : 190-98

Lamb RL, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In :Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology, Vol.1.3rd ed. Philadelphia :Lippincott-Raven; 1996.p. 1353-95

LaSalle GL, Robert JJ, Berrard S. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. Science 1993 ; 259 : 988-90

Laquerre S, Goins WF, Motiuchi S, Oligino TJ, Krisky DM, Marconi JC, Soares Mk, Cohen JB, Glorioso JC, Fink DJ. Gene-transfer tool: herpes simplex virus vectors. In: The Development of Human Gene Therapy, pp 173-208. Ed T Friedman. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999

Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud CP. Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalisation. Infect Immun 1997 ; 65 : 5309-19

Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. The expression of virulence genes in Listeria monocytogenes is thermoregulated. J. Bacteriol 1992 ; 174 : 947-52

Leon SP, Zhu J, Black P McL. Genetic Aberrations in Human Brain Tumors. J Neurosurg 1994 ; 34(4) : 708-22

Lewis ED, Manley JL. Repression of simian virus 40 early transcription by viral DNA replication in human 293 cells. *Nature* 1985 ; 317(6033) : 172-75

Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, Chakraborty T. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by prfA-dependent and- independent mechanisms. *Infect immune* 1995 ; 63(10) : 3896-3903

Lockett LJ, Molloy PL, Russell PJ, Both GW. Relative Efficiency of tumor cell killing in vitro by two Enzym-prodrug Systems delivered by identical adenovirus vectors. *Clin Cancer Res* 1997 ; 3 : 2075-80

Luytjes W, Krystal M, Enami M, Pavin JD, Palese P. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 1989 ; 59(6) : 1107-13

Mao C, Cook WJ, Zhou M, Koszalka GW, Krenitsky TA, Ealick SE. The crystal structure of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase: a comparison with the humane enzyme reveals a conserved topology. *Structure* 1997 ; 5(19) : 1373-83

Mar EC, Chiou JF, Cheng YC, Huang ES. Inhibition of cellular DNA polymerase and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxy- methyl)guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *J Virol* 1985 ; 53 : 776-80

Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodef Rev* 1991 ; 3(1) : 45-81

Marco AJ, Prats N, Ramos JA, Briones V, Blanco M, Dominiguez L, Domingo M. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* 1992 ; 107 : 1-9

McLauchlin I, Audurier A, Taylor AG. Treatment failure and recurrent human listeriosis. *J Antimicrob Chemother* 1991 ; 27(6) : 851-57

Mengaud J, Geoffroy C, Cossart P. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect Immunol* 1991 ; 59 :1043-49

Mengaud J, Dramsi S, Gouin E, Vazquez-Boland JA, Milon G, Cossart P. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* 1991 ; 5 : 2273-83

Miller CR, Christopher RW, Buchsbaum DJ, Gillespie GY. Intratumoral 5-Fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-Fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human Glioblastomas. *Cancer research* 2002 ; 62 : 773-80

Misteli T, Spector DL. Application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotech* 1997 ; 15 : 961- 63

- Mitani K, Graham FL, Caskey T.** Transduction of human bone marrow by adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 941-48
- Moolten FL, Wells JM, Heymann RA, Evans RM.** Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum Gene Ther* 1990 ; 1(2) : 125-34
- Moors MA, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA.** Expression of Listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect and Immun* 1999 ; 67(1) : 131-39
- Müller W, Afra D, Schröder R.** Supratentorial recurrences of gliomas. Morphological studies in relation to time intervals with oligodendrogliomas. *Acta Neurochir* 1977 ; 39(1-2) : 15-25
- Murphy AM, Hawkes RA.** Neurological complications of influenza A2-Hong Kong-68 virus. *Med J Aust* 1970 ; 2(11) : 511
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY.** Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: Lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 1992 ; 3 : 649-56
- Nakagawa Y, Kimura N, Toyoda T, Mizumoto K, Ishiama A, Oda K, Nakada S.** The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol* 1995 ; 69(2) : 728-33
- Nakajima S, Sugiura.** Neurovirulence of influenza virus in mice. II. Mechanism of virulence as studied in a neuroblastoma cell line. *Virology* 1980 ; 101 : 450-57
- Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(6) : 539-43
- Nau R, Suchardt V, Prange H.** Zur Listeriose des Zentralnervensystems. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1990 ; 58 : 408-22
- Nestler U, Heinkelein M, Lücke M, Meixensberger J, Scheurlen W, Kretschmer A, Rethwilm A.** Foamy virus vectors for suicide gene therapy. *Gene Ther* 1997 ; 4 : 1270-77
- Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar L.K., Chakravarti A, Muzikansky A, Stemmer-Rachamimov A, Chiocca E.A., Aguilar-Cordova E., Hochberg F.H.** The combination of adenoviral HSV-TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J Neuroonc* 2004; 67 : 177-188
- Neumann G, Hobom G.** Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 1709-17
- Neumann G, Zobel A, Hobom G.** RNA polymerase I mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* 1995 ; 202 : 477-79

- Nguyen LT, Ishida T, Ukitsu S, Li WH, Tachibana R, Kiwada H.** Culture time-dependent gene expression in isolated primary cultured hepatocytes by transfection with the cationic liposomal vector TFL-3. *Biol Pharm Bull* 2003 ; 26(6) : 880-85
- Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA.** Suicide gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effect. *Histol Histopathol* 2003; 18(2) : 495-507
- Niemann G, Watanabe T, Kawaoka Y.** Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J Virol* 2000 ; 74(1) : 547-51
- Niemann RE, Lorber B.** Listeriosis in adults: A changing pattern. Report of eight cases and review of the literature 1968-78. *Rev Infect Dis* 1980 ; 2 : 207-27
- Nishiyama Y, Rapp F.** Anticellular effects of 9-(2-hydroxy-ethoxymethyl)guanine against herpes simplex virus-transformed cells. *J Gen Virol* 1979 ; 45 : 5276-81
- O'Neill RE, Talon J, Palese P.** The influenza virus NEP(NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 1998; 17 : 288-96
- Parker WB, King SA, Allan PW, Bennett LL Jr., Secrist JA, Montgomery JA, Gilbert KS, Waud WR, Wells AH, Gillespie Y, Sorscher EJ.** In vivo gene therapy of cancer with E.coli Purine Nucleoside Phosphorylase. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 1637-44
- Parker WB, Allan PW, Shaddix SC, Rose LM, Speegle HF, Gillespie GY, Bennett LL.** Metabolism and metabolic actions of 6-Methylpurine and 2- Fluoroadenine in human cells. *Biochem Pharmacol* 1998 ; 55 : 1673-81
- Peters M, Hewicker-Trautwein M.** Infection of murine fetal brain cell culture with *Listeria monocytogenes*. *Vet Microbiol* 1994 ; 41(1-2) : 19-28
- Pilkington GJ.** Tumour cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol* 1994 ; 4 : 157-66
- Pleschka S, Jaskunas RS, Engelhardt OG, Zürcher T, Palese P, Garcia-Sastre A.** A Plasmid-Based Reverse Genetics System for Influenza A Virus. *J Virology* 1996 ; 70(6) : 4188-92
- Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM.** A unique cap (m Gppp-pXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 1981 ; 23 : 847- 58
- Potter CW. Chronicle of influenza pandemics.** In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ eds. *Textbook of influenza*. Blackwell Science, Oxford; 1998 p.3-18
- Puhlmann M, Gnant M, Brown CK, Alexander HR, Bartlett DL.** Thymidine kinase-deletes Vaccinia Virus expressing Purine Nucleoside Phosphorylase as a Vector for tumor-directed Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 : 649-57

Rainova NG, Kramm CM, Aboody-Guterman K, Chase M, Ueki K, Louis DN, Harsh GR 4th, Chiocca A, Breakefield XO. Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasm using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm. *Cancer Gene Ther* 1996 ; 3(2) : 99-106

Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1993 ;54(14) : 3947-48

Recht LD, Lew R, Smith TW. Suspected low-grade glioma: is deferring treatment safe ? *Ann Neurol* 1992 ; 31(4) : 431-36

Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK Fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 73-85

Roizman B, Sears AE. Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields' Virology* (3rd edn) (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds) Lippincott-Raven 1996 pp. 2231-95

Rose JA, Berns KI, Hoggan MD, Kocot FJ. Evidence for a single-stranded adeno-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 ; 64 : 863-69

Rouquette C, Berche P. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiol* 1996 ; 12(2) : 245-58

Rubsam LZ, Boucher PD, Murphy PJ, Ku Kuruga M, Shewach DS. Cytotoxicity and accumulation of ganciclovir triphosphate in bystander cells cocultured with herpes simplex virus type I thymidine kinase-expressing human glioblastoma cells. *Cancer Res* 1999 ; 59(3) : 669-75

Sauders BD, Wiedmann M, Desjardins M, Fenlon C, Davenport N, Hibbs JR, Morse DL. Recurrent *Listeria monocytogenes* infection: relaps or reinfection with a unique strain confirmed by molecular subtyping. *Clin Infect Dis* 2001 ; 33(2) : 257-59

Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M, Rott R. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 1992 ; 166 : 783-91

Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 1991 ; 4 : 169-83

Schwartz B, Ciesielski CA, Broome CV, Gaventa S, Brown GR, Gellin BG, Hightower AW, Mascola L. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hotdogs and undercooked chicken. *Lancet* 1988 ; 2 :779-82

Secrist III JA, Parker WB, Allan PW, Bennett LL, Waud WR, Truss JW, Fowler AT, Montgomery JA, Ealick SE, Wells AH, Gillespie GY, Sorscher EJ. Gene Therapy of cancer: Activation of Nucleoside Prodrugs with E.coli Purine Nucleoside Phosphorylase. *Nucleosides & Nucleotides* 1999 ; 18 (4-5) : 745-57

Segal M, Bye J, Sambrook J, Gething M. Disulfide bond formation during the folding of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 1992 ; 118 : 227-44

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 the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum gene Ther* 1999 ; 10(14) : 2325-35

Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000 ; 103(3) : 501-10

Sheng-Qing LV, Hui J, Jia-Quan HE, Bin W, Ishiro Y. Effects of CD/5-FC Suicide Gene Therapy System on Human Malignant Glioma Cells in Vitro. *Acta Biochimica et biophysica sinica* 2003 ; 35(5) : 430-34

Smith GA, Portnoy DA, Theriot JA. Assymetric distribution of *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. *Mol Microbiol.* 1995 ; 17 : 945-51

Smyth CJ, Duncan JL. Thiol-activated (oxygenlabile) cytolysins. In: Jeljaszewicz J and Wasstrom T ed. *Bacterial toxins and cell membranes.* Academic press, Inc., New York 1978 ; p: 129-83

Sorscher EJ, Peng S, Bebok Z, Allan PW, Bennett LL, Parker WB. Tumor cell bystander killing in colonic carcinoma utilizing the *Escherichia coli* DeoD gene to generate toxic purines. *Gene Ther* 1994 ;1(4) : 233-38

Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 2001 ; 33(2) : 107-17

Stewart MJ, Plautz GE, del Buono L. Gene transfer in vivo with DNA-liposom complexes : Safety and acute toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 1992 ; 3 : 267-75

Stuart-Harris CH. A neurotropic strain of human influenza virus. *Lancet* 1939 ; i : 497-99

Sturtz FG, Waddell K, Shulok J, Chen X, Caruso M, Sanson M, Snodgrass HR, Platika D. Variable efficiency of the thymidine kinase/ganciclovir system in human glioblastoma cell lines: Implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 1945-53

Süss J. Specificity of interactions between thymus-dependent lymphocytes and influenza viruses. *Allerg Immunol* 1979 ; 25(3) : 187-96

Sugaya N. Influenza-associated encephalopathy in Japan : pathogenesis and treatment. *Pediatr Int* 2000; 42(2) : 215-18

Sugiura A, Ueda M. Neurovirulence of influenza virus in mice. I. Neurovirulence of recombinants between virulent and avirulent strains. *Virology* 1980 ; 101 : 440-49

Takahashi M, Yamada T, Nakajima S, Yamamoto T, Okada H. The substantia nigra is a major target for neurovirulent influenza A virus. *J Exp Med* 1995 ; 181(6) : 2161-69

Tchatalbachev S, Flick R, Hobom G. The packaging signal of influenza virus RNA molecules. *RNA* 2001 ; 7(7) : 979-89

Theriot JA, Mitchison TJ, Tilney LG, Portnoy DA. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerisation. *Mature* 1992 ; 357 : 257-60

Thraenhart O, Schley G, Kuwert E. Isolation of influenza virus „A/Hong Kong/1/68 (H3N2)“ from liquor cerebrospinalis of patients with CNS involvement. *Med Klin* 1975 ; 70 (47) : 1910-14

Trinh QT, Austin EA, Murray DM, Knick VC, Huber BE. Enzym/prodrug gene therapy: Comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzym/prodrug system in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res* 1995 ; 55 : 4808-12

Uckert W, Kammertöns T, Haack K, Qin Z, Gebert J, Schendel DJ, Blankenstein T. Double suicide gene (Cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum Gene Ther* 1998 ; 9 : 855-65

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE. Heterologous protection against influenza ba injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993 ; 259 : 1733-45

Vazquez-Boland J, Kocks C, Dramsi S, Ohayon H, Geoffroy J, Mengaud J, Cossart P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1992 ; 60 : 219-30

Velge P, Bottreau E, Kaeffer B, Pardon P. Cell immortalization enhances *Listeria monocytogenes* invasion. *Med Microbiol Immunol* 1994 ; 183(3) : 145-58

Wagner RR. A pantropic strain of influenza virus : generalised infection and viremia in the infant mouse. *Virology* 1955 ; 1 : 497-515

Webster RG, Hinshaw VS, Laver WG. Selection and analysis of antigenic variants of the neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies. *Virology* 1982 ; 117 : 93-104

Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jodicke A, Böker DK. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment opinion? *J Neurooncol* 2000 ; 46(2) : 97-103

Wünscher MD, Kohler S, Göbel W, Chakraborty T. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lis A*. *Mol Gen Genet* 1991 ; 228(1-2) : 177-82

Yang NS, Burkhold J, Roberts B. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 9568-72

Yang R, Nunes FA, Berencsi K. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4407-11

Yewdell JW, Hackett CJ. Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses. In : Krug RM ed. The influenza viruses 1989. New York. Plenum Press : 361-429

Young RJ, Content J. 5'-terminus of influenza virus RNA. Nature New Biol. 1971 ; 230 : 140-42

Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. J Antimicrob Chemother 1999 ; 44, Topic B, 3-9

Zerrouqi A, Rixe O, Ghoumari AM, Yarovoi SV, Mouawad R, Khayat D, Soubrane C. Liposomal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase gene in glioma: improvement of cell sensitization to ganciclovir. Cancer Gene Ther 1996 ; 31(6) : 385-92

Zhang H, Air GM. Expression of functional influenza virus A polymerase proteins and template from cloned cDNAs in recombinant vaccinia virus infected cells. Biochem Biophys Res Commun 1994 ; 200(1) : 95-101

Zhang L, Liu T, Cui Q. The killing effects of two prodrug sensitivity genes on human pancreatic carcinoma cells PC-2. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 1998 ; 27(6) : 412-5

Zhang W, Nwagwu C, Le DM, Yong VW, Song H, Couldwell WT. Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. J Neurosurg. 2003 ; 99(6) : 1039-46.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 1999 bis April 2001 in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Giessen.

Ich möchte mich beim Leiter der Neurochirurgischen Klinik Herrn Prof. Dr. med. D.-K. Böker für das in mich gesetzte Vertrauen, mir das vorliegende Thema zur Bearbeitung zu überlassen, und für die Bereitstellung der notwendigen Mittel und Räumlichkeiten bedanken.

Herrn Dr. med. U. Nestler danke ich für die persönliche Betreuung und seine Bereitschaft, in allen Situationen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und meiner Arbeit den notwendigen Rahmen zu geben.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. S. Pleschka, der mir seitens der Virologie das wissenschaftliche Arbeiten ermöglichte und auch für Fragen jederzeit ansprechbar war.

Auch danke ich Herrn Dr. rer. nat. T. Hain und Herrn Prof. Dr. T. Chakraborty aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie für die Unterstützung und Hilfe auf dem Gebiet der Listerienforschung.

Für das sehr freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima im neurochirurgischen Forschungslabor möchte ich allen dort tätigen MTA's herzlich danken. Ohne Ihre Erfahrung und Ihr Engagement wäre die Entstehung der Arbeit kaum möglich gewesen

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Sven Dillmann
Wohnort: Frh.v.Grechtler Str 18b
77971 Kippenheim
Tel. privat: 07825/869777
Tel. mobil: 0170/5354654
Geburtstag und -ort: 24.05.1976 in Haiger
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

08.1982 - 07.1986 Grundschule Ewersbach
08.1986 - 07.1987 Orientierungsstufe Holderbergschule Eibelshausen
08.1987 - 06.1995 Gymnasium Schloß Wittgenstein Bad Laasphe
08.06.1995 Abitur

Zivildienst

07.1995 - 08.1996 Pflegedienst im Alten- und Pflegeheim Kronberg
Ewersbach

Studium

09.1996 - 11.2002 Studium der Humanmedizin Universität Giessen

AIP

12.2002 - 05.2004 Allgemein- und Unfallchirurgie Lahn-Dill-Kliniken
Dillenburg

Assistenzstellen

seit 01.07.2004 Urologie Klinikum Offenburg