

Fremdgentransfer in Glioblastomzellen mittels *Listeria monocytogenes*-Vektoren

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

vorgelegt von Chris Schulz

aus Parchim

Gießen, 2006

Aus der Neurochirurgischen Klinik

Leiter: Herr Prof. Dr. med. D.-K. Böker

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. D.-K. Böker

Gutachter: Prof. Dr. M. Kann

Tag der Disputation: 07. November 2006

1. EINLEITUNG	1
<hr/>	
1.1 DAS HUMANE GLIOBLASTOM	1
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLASSIFIKATION	1
1.1.2 PATHOLOGIE	2
1.1.3 DIAGNOSTIK	4
1.1.4 THERAPIE	5
1.1.5 EXPERIMENTELLE THERAPIEANSÄTZE	6
1.2 DAS FAKULTATIV INTRAZELLULÄRE BAKTERIUM <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	9
1.2.1 TAXONOMIE, MORPHOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE	9
1.2.2 DIE HUMANE LISTERIOSE	10
1.2.2.1 Adhäsion und Internalisation	11
1.2.2.2 Intrazellulärer Lebenszyklus	13
1.2.3 NEUROTROPISMUS VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	14
1.3 PROBLEMSTELLUNG	17
2. MATERIALIEN	18
<hr/>	
3. METHODEN	23
<hr/>	
3.1 ANLAGE UND KONSERVIERUNG VON ZELLKULTUREN	23
3.2 ANLAGE UND KONSERVIERUNG VON BAKTERIENKULTUREN	24
3.3 INVASIONSVERSUCHE MIT ZNS-TUMORZELLEN	25
3.3.1 VORBEREITEN DER ZELLKULTUREN FÜR INVASIONSVERSUCHE	25
3.3.2 VORBEREITEN DER BAKTERIENKULTUREN FÜR INVASIONSVERSUCHE	25
3.3.3 INFEKTION DER SÄUGERZELLEN IN INVASIONSVERSUCHEN	26
3.3.4 PLATTIERUNG, BESTIMMUNG DES BAKTERIENGHALTES UND AUSWERTUNG	27
3.3.5 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN NACH INVASIONSVERSUCHEN	30
3.4 METHODEN DER PLASMIDVERARBEITUNG	31
3.4.1 PLASMIDISOLIERUNG AUS <i>E. COLI SPP.</i>	31
3.4.2 PLASMIDRESTRIKTIONSVERDAU	31
3.4.3 GELELEKTROPHORESE	32
3.4.4 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION	33
3.4.5 DEPHOSPHORYLIERUNG UND „HEIßE“ PHENOLEXTRAKTION	33
3.4.6 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	34
3.4.7 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	34
3.5 HERSTELLUNG TRANSFORMATIONSFÄHIGER BAKTERIEN	35
3.5.1 HERSTELLUNG ULTRAKOMPETENTER <i>E. COLI</i>	35
3.5.2 HERSTELLUNG VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> -PROTOPLASTEN	36
3.6 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	37
3.6.1 PLASMID-TRANSFORMATION IN ULTRAKOMPETENTE <i>E. COLI</i>	37
3.6.2 PLASMID-TRANSFORMATION IN PROTOPLASTEN VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	38
3.7 KONSTRUKTION VON PLASMIDVEKTOREN	38
3.7.1 ANFORDERUNGEN AN REPORTERGENPLASMIDVEKTOREN	38
3.7.2 PLASMIDKLONIERUNGSSTRATEGIE	40
3.7.3 HERSTELLUNG DES BASISPLASMIDS PCS2A UND DES KONTROLLTRANSFERPLASMIDS PCS2	44
3.7.4 HERSTELLUNG DES TRANSFERPLASMIDS PCS1	45
3.7.5 AMPLIFIZIERUNG VON <i>EGFP</i> UND HERSTELLUNG DES TRANSFERPLASMIDS PCS3	46
3.8 GENTRANSFERVERSUCHE MITTELS LIPOFEKTION	48
3.9 GENTRANSFERVERSUCHE MIT TRANSFORMIERTEN LISTERIEN-VEKTOREN	48
3.9.1 VORBEREITEN DER BAKTERIENKULTUREN FÜR GENTRANSFERVERSUCHE	48
3.9.2 VORBEREITEN DER ZELLKULTUREN FÜR GENTRANSFERVERSUCHE	49
3.9.3 INFEKTION DER SÄUGERZELLEN IN GENTRANSFERVERSUCHEN	49

3.10 ERGEBNISDOKUMENTATION NACH GENTRANSFERVERSUCHEN	50
3.10.1 LACZ - NACHWEISFÄRBUNG	50
3.10.2 DURCHLICHT- UND FLUORESCENZMIKROSKOPIE	51
4. ERGEBNISSE	52
4.1 ERGEBNISSE DER INVASIONSVERSUCHE	52
4.2 ERGEBNISSE DER RESTRIKTIONSVERDAU- UND PCR-ANSÄTZE	59
4.2.1 VERDAU UND PCR DER AUSGANGSPASMIDE PCMVβ, PEGFP-1 UND PSOG 3012	59
4.2.2 KONTROLLVERDAU UND PCR DES BASISPLASMIDES PCS2A SOWIE VON PCS3A	60
4.2.3 PRÄPARATIVER VERDAU VON PCMVβ, PCS2A, PCS3A UND PSOG 3012	61
4.2.4 KONTROLLVERDAU UND PCR VON PCS1, PCS2 UND PCS3	62
4.3 ERGEBNISSE DER GENTRANSFERVERSUCHE MITTELS LIPOFEKTION	63
4.3.1 TRANSFEKTION VON PCMVβ UND PCS1 IN U87	63
4.3.2 TRANSFEKTION VON PCS3A UND PCS3 IN U87	64
4.3.3 TRANSFEKTION VON PCS2A UND PCS2 IN U87	64
4.4 ERGEBNISSE DER GENTRANSFERVERSUCHE MIT <i>L.MONOCYTOGENES SPP.</i>	65
4.4.1 TRANSFER VON <i>L.MONOCYTOGENES</i> 1/2A+PCS1	65
4.4.2 TRANSFER VON <i>L.MONOCYTOGENES</i> 1/2A+PCS3	66
4.4.3 TRANSFER VON <i>L.MONOCYTOGENES</i> 1/2A+PCS2	67
5. DISKUSSION	68
5.1 DISKUSSION DER INVASIONSVERSUCHE	68
5.2 DISKUSSION DER GENTRANSFERVERSUCHE	71
5.3 BEWERTUNG IM ZUSAMMENHANG	75
6. LITERATURNACHWEIS	76
7. ANHANG	88
7.1 TABELLENÜBERSICHT	92
7.2 ABBILDUNGSNACHWEIS	93
7.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	96
ZUSAMMENFASSUNG	97
SUMMARY	98
LEBENS LAUF	99
DANKSAGUNG	100

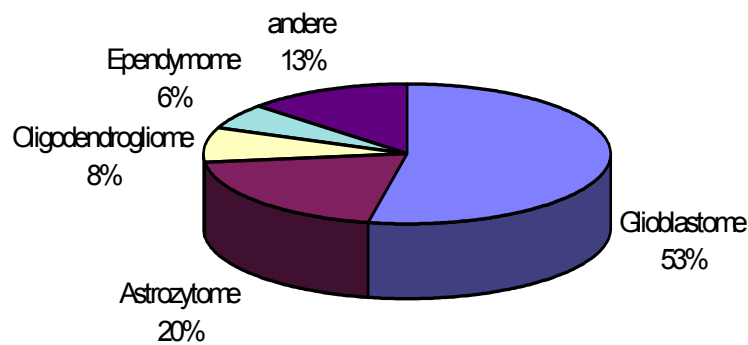
1. EINLEITUNG

1.1 Das humane Glioblastom

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Glioblastome nehmen ihren Ursprung von der Neuroglia aus und gehören somit zu den hirneigenen Tumoren. Nach der aktualisierten WHO-Klassifikation der intrakraniellen Tumoren werden die Glioblastome zu den neuroepithelialen Tumoren gerechnet. Bei einem Glioblastom handelt es sich um den Grad-IV-Tumor der astrozytären Reihe. Die Tumore wachsen infiltrativ, bevorzugt im Marklager der Großhirnhemisphären (Böker und Mennel,2002).

Das Glioblastom ist mit etwa 15% aller intrakraniellen Neoplasien der häufigste diagnostizierte hirneigene Tumor. Unter den Gliomen bestimmt das Glioblastom mehr als die Hälfte der auftretenden Fälle. Seine geschätzte Jahresinzidenz in Europa und Nordamerika liegt bei etwa 10 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Zülch,1986; Lantos et al.,1996)



Tab.1 Häufigkeitsverteilung bei neu diagnostiziertem Gliom (nach Zülch und Lantos)

Deutlich bevorzugt betroffen ist das höhere Alter (5.-6. Lebensjahrzehnt). Bei Patienten im jüngeren Alter wird meist eine sekundäre Malignisierung aus einem niedergradigen Gliom heraus beobachtet, während beim älteren Patienten das Glioblastom häufiger „de novo“ entsteht.

Der Verlauf der Glioblastomerkrankung ist trotz der heute möglichen Therapie infaust. Tumorrezidive sind die Regel, die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose beträgt etwa ein Jahr. Die Prognose wird von Patientenalter, Karnofsky-Performance-Status zum

Diagnosezeitpunkt, Tumolvolumen und –lokalisierung sowie operativem Resektionsausmaß und durchgeführter postoperativer adjuvanter Therapie bestimmt (Lacroix et al.,2001).

Das Spätstadium der Erkrankung ist durch auftretende Komplikationen gekennzeichnet. Neben der Raumforderung durch den Tumorprogress führen Pneumonien und Thrombosen zum Tode der zumeist bettlägerigen Patienten. Die Gerinnungsstörung wird neuerdings im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms diskutiert (Kleihues et al.,1997; Marras et al.,2000).

1.1.2 Pathologie

Histologisch leiten sich die Zellen der neuroepithelialen Tumoren von den Gliazellen und deren Vorstufen ab. Mit zunehmender Entdifferenzierung der Gliomzellen finden sich der Verlust spezifischer glialer Zellmerkmale und gehäuft Phänotypen, die den embryonalen Vorstufen entsprechen. Histomorphologisch sind das „bunte“ Bild und die sogenannte „Leopardenfelltigerung“ typisch für das Glioblastom. Die Grad IV-Typisierung stützt sich auf den histologischen Nachweis von zellulärer und nukleärer Atypie bzw. Polymorphie, erhöhter mitotischer Aktivität und Zelldichte sowie von Endothelproliferaten, Thrombosen, Einblutungen und intratumoralen Nekrosen (Böker und Mennel,2002).

Ebenfalls von diagnostischem Interesse ist die zelluläre Expression bestimmter Antigene. Für die astrozytären Tumoren ist dabei der Nachweis von GFAP entscheidend. Die Glioblastomzellen sind aufgrund ihrer Anaplasie im Vergleich zu den Astrozytomen jedoch seltener zur GFAP-Bildung fähig. Auch das Kalzium-bindende Protein S-100 wird häufig in Gliazellen nachgewiesen und kann zur Einordnung von Tumorzellen genutzt werden.

Eine Vielzahl molekularer Abweichungen ist an Glioblastomzellen untersucht worden und die Aberrationen betreffen höchstwahrscheinlich wachstumskontrollierende Gene. In Betracht kommen hierbei insbesondere Tumorsuppressorgene, welche inaktiviert oder inhibiert sind, und Protoonkogene, welche in ihrer Anzahl vermehrt und in ihrer Funktion gesteigert vorliegen. So finden sich in Glioblastomzellen häufig Verluste des Chromosoms 10 (>75%), des kurzen Arms von Chromosom 9 und des langen Arms von Chromosom 19 (40%) und zum anderen eine Amplifikation von *EGFR*- (30-40%), *CDK4*- sowie *MDM2*-Genen (10%) (Paulus et al.,1994; Kruse et al.,1998; von Deimling,1998). Eine Aufzählung weiterer Genalterationen und Chromosomenaberrationen, die unterschiedlich häufig in Gliomzellen gefunden wurden, zeigt Tabelle 2 (zusammengefaßt nach James,1996; Wiestler und von Deimling,1996; Kleihues et al.,2000; Ichimura et al.,2000).

Onkogene (Überamplifikation)	Tumorsuppressorgene (Defekt, Inaktivierung)	Chromosomenabschnitte mit unklarer Mutation
<i>myc-Familie,</i>	<i>RB-1</i> (13q14),	1p,
<i>c-erb-B,</i>	<i>NF-1</i> (17q11),	9, 9p21,
<i>EGF,</i>	<i>NF-2</i> (22q11),	10,
<i>EGFR,</i>	<i>ARF</i> (14p),	11q24,
<i>MDM2,</i>	<i>CDKN2A</i> (16p),	12q13-14,
<i>MDM4,</i>	<i>CDKN2B</i> (15p),	13q14,
<i>PDGF-A,</i>	<i>CDK6,</i>	14p,
<i>PDGFR-α,</i>	<i>MMAC1,</i>	15p,
<i>TGF-α,</i>	<i>PTEN,</i>	16p,
<i>SAS,</i>	<i>DCC,</i>	17p,17q,
<i>CDK4,</i>	<i>p21,</i>	19q,
<i>CDK6,</i>	<i>p53</i> (17p13),	22q
<i>CCND1,</i>	<i>DMBT1</i>	
<i>CCND3</i>		

Tab.2 Häufig in Glioblastomzellen nachgewiesene genetische Veränderungen

In der astrozytären Tumorstammzelle müssen offenbar bestimmte Aberrationen zusammentreffen, um die Bildung des Glioblastoms zu ermöglichen. Fast alle Abweichungen münden dabei in einer gestörten p53-Zellzyklus- und Apoptosekontrolle. Es konnten anhand bestimmter Kombinationen von genetischen Abweichungen zumindest zwei Subtypen von Glioblastomen identifiziert werden.

Das sogenannte Glioblastom Typ1 (sekundäres Glioblastom) ist charakterisiert durch den p53-relevanten Allelverlust auf Chromosom 17, welcher offenbar eine Amplifikation von *EGFR* in den allermeisten Fällen ausschließt. Umgekehrt findet sich in Glioblastomzellen mit deutlicher *EGFR*-Überamplifikation seltener ein Allelverlust von Chromosom 17p (25-30%), wodurch das Typ2-Glioblastom (primäres Glioblastom) definiert ist. Die klinische Relevanz dieser Subtypen-Klassifikation ist darin begründet, daß sich Typ1-Glioblastome gehäuft bei jüngeren Patienten nachweisen lassen, bei denen sich das Glioblastom aus einem vorbestehenden niedergradigen Astrozytom entwickelt hat, während das Typ2-Glioblastom bei überwiegend älteren Patienten „de novo“ entstanden ist (ca. 15 Jahre Altersunterschied). Patienten mit Typ1-Glioblastom haben im Schnitt eine längere Überlebenszeit (von Deimling, 1998).

	<i>Typ I - Glioblastom sekundäres Glioblastom</i>	<i>Typ II - Glioblastom primäres Glioblastom</i>
Häufigkeit	5 - 10 % der Fälle	90 - 95 % der Fälle
p53 - Mutation (17p13)	70 - 80 %	25 - 30 %
EGFR - Überamplifikation	extrem selten	relativ häufig (30 – 40 %)

Tab.3 Zusammenfassung der unterschiedlichen genetischen Merkmale sekundärer und primärer Glioblastome

Eine weitere molekulare Subtypisierung der äußerst heterogenen Tumorgruppe wird derzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgenommen. Eine klinisch bedeutsame prognostische Klassifizierung ließ sich zumindest für einige Kombinationen finden und auch der Effekt therapeutischer Maßnahmen scheint von der genetischen Konstellation abhängig zu sein. So wurden in über 90% der Glioblastomzellen Alterationen in 3 oder mehr Tumorsuppressorgenen gefunden. Tumorpatienten mit p53-Alterationen und Verlust des Chromosoms 10 in den Tumorzellen zeigten eine auf 5,2 Monate reduzierte Überlebenszeit. Der vermehrte Nachweis des epidermal growth factor receptor (EGFR) verbunden mit dem kompletten Verlust des Chromosoms 10 in Glioblastomzellen beeinflusste die Prognose derart, daß eine mediane Überlebenszeit von 4 Monaten resultierte (Leenstra et al.,1998; Ishii et al.,1999; Schlegel et al.,1999).

1.1.3 Diagnostik

Diagnostische und therapeutische Maßgaben zum Vorgehen bei malignen Gliomen sind von der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie in Leitlinien zusammengefaßt worden. Weitere Empfehlungen wurden durch die Neuroonkologische Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Krebsgesellschaft herausgegeben (Mennel,1999).

Etwa 50% der Patienten mit Glioblastom stellen sich nach einer dreimonatigen Anamnesedauer vor. Das erstmalige Auftreten von epileptischen Anfällen im Erwachsenenalter ist hochgradig auf einen Großhirntumor verdächtig. Glioblastome verursachen ortsabhängige Lokalsymptome sowie unspezifische Wirkungen durch die intrakranielle Drucksteigerung (Westphal und Winking,2003). Am häufigsten zeigen die Betroffenen Beschwerden, die als Hirntumor-Trias bezeichnet werden: Kopfschmerz, Erbrechen oder Übelkeit und Stauungspapillen. Das konstanteste Zeichen ist der Kopfschmerz. Ein Viertel der Patienten klagt zudem über Schwindel und Gangstörungen.

Zusätzlicher Hinweis kann eine Wesensänderung des Patienten sein (Kleihues et al.,1997; Schirmer,1998).

Die apparative Diagnostik der Glioblastome hat sich seit Einführung computergestützter bildgebender Systeme vereinfacht. Kraniale Computer- und Magnetresonanztomographie gehören heute zum diagnostischen Standard. Hirnszintigraphie, MR-Spektroskopie, PET und SPECT können zusätzlich ein präoperatives nicht-invasives Grading ermöglichen.

Bei zweifelhafter Artdiagnose wird das diagnostische Spektrum um invasive Maßnahmen erweitert. Eine Biopsie des Tumors kann stereotaktisch geführt werden oder offen nach Kraniotomie erfolgen.

1.1.4 Therapie

Die Behandlungsstrategien bei Glioblastomen umfassen operative, radio- und chemotherapeutische Optionen. Bestehen Kontraindikationen für diese Vorgehensweise kommen konservativ-palliative sowie experimentelle Therapieformen in Betracht (aktuelle Übersichtsdarstellung bei Böker,2004).

Handelt es sich um einen operationsfähigen Patienten ist das Vorgehen der Wahl beim Glioblastom die Operation. Ziel ist eine weitgehende Reduktion des Tumolvolumens unter bestmöglichem neurologischen Funktionserhalt. Die Resektion unter Mitnahme möglichst großer Tumormassen senkt die postoperative Mortalität, verbessert die Wirkung nachfolgender adjuvanter Verfahren, verlängert die Zeit bis zum erneuten Progress des Tumors und die Überlebenszeit (Albert et al.,1994; Gratzl et al.,1998; Keles et al.,1999; Hess,1999).

Glioblastomzellen sind mäßig strahlensensibel, bei inoperabler Ausgangssituation stellt die Radiotherapie (nach bioptischer Diagnosesicherung) aber die wesentliche Therapieform dar (Kleinberg et al.,1999). Als adjuvante involved-field Radiotherapie mit einer Gesamtherddosis von 55-60 Gy wird die Bestrahlung in der Regel der operativen Behandlung aller Glioblastome angeschlossen. Im Vergleich von operierten und bestrahlten Patienten zu jenen ohne angeschlossene Radiatio ergab sich bereits in früheren Studien eine Verlängerung der postoperativen Überlebenszeit von 17,5 auf 37,5 Wochen (Walker et al.,1978; Bamberg und Hess,1992). Eine Hyperfraktionierung mit Steigerung der Gesamtdosis sowie die akzelerierte Fraktionierung zur Verkürzung der Behandlungszeit sind möglich, mit intraoperativer Brachytherapie können lokale Herddosen bis zu 80 Gy erreicht werden (Larson et al.,1991; Fulton et al.,1992; Fitzek et al.,1999). Andere Möglichkeiten der

Tumorbestrahlung bestehen im Einbringen radioaktiver Implantate oder in stereotaktischen radiochirurgischen Techniken (Flowers et al.,1995; Loeffler et al.,1995; Mehta,1997; Gaspar et al.,1999; Shrieve et al.,1999).

Glioblastome sind nur wenig chemosensibel. Um allgemein zur Chemotherapie raten zu können, sollten die Patienten nicht älter als 60 Jahre sein und mindestens einen Karnofsky-Performance-Status von 50 erreichen. Therapeutische Barrieren der Chemotherapie sind zum einen der schlechte Übertritt der Medikamente durch die Blut-Hirn- bzw. Blut-Tumor-Schranke, zum anderen die Neurotoxizität der Substanzen. Unter diesen Gesichtspunkten ist ein Überlebensvorteil für circa 20-25% der Patienten mit malignem Gliom möglich, bei isolierter Betrachtung der Glioblastom-Patienten reduziert sich diese Ansprechrate zusätzlich (DeAngelis et al.,1998). Von den zahlreichen untersuchten Substanzen und Applikationsformen (DeAngelis,2005) werden für Glioblastome die folgenden Schemata empfohlen: Die Kombinationstherapie von Procarbazin, CCNU und Vincristin (PCV-Schema) sowie von VM-26 [Etoposid] mit ACNU oder BCNU zudem die Monotherapie mit Temozolomid (auch in Kombination mit simultaner Radiatio [Stupp et al.,2005]).

Die konservativ-palliative Therapie kommt meist im Endstadium der Erkrankung zum Einsatz. Hirndrucksymptome werden medikamentös mit Analgetika, Antiemetika und antiödematös mit Dexamethason oder Mannitol behandelt. Häufig ist auch eine antikonvulsive Medikation erforderlich. In den letzten Jahren erlangte das Weihrauchpräparat H15, das antiödematöse Effekte entfaltet, eine Bedeutung. Die Wirkung wird durch Inhibition bestimmter Leukotriensyntheseschritte vermittelt. Die Wirkstoffe dieses Medikamentes sind Boswellia-Säuren, deren potentielle zytotoxische Wirkung auf Glioblastomzellkulturen und implantierte Tumoren im Rattenmodell durch Topoisomerasehemmung vermittelt sein kann (Böker und Winking,1997; Winking et al.,2000).

1.1.5 Experimentelle Therapieansätze

Die Unmöglichkeit der Totalexstirpation, die begrenzte Chemo- und Radiosensibilität sowie die schlechte Prognose der Glioblastome geben Anlaß zur Suche nach alternativen therapeutischen Strategien. Neben Neuerungen in bereits etablierten chemo- und radiotherapeutischen Konzepten werden Verfahren der Immun- und Genterapie zunehmend in die klinische Forschung eingeführt.

Grundsätzlich ist bei genterapeutischen Strategien zwischen direkten und indirekten Verfahren zu unterscheiden. Bei Transfer unmittelbar therapeutisch wirksamer Gene

(Prototyp Tumorsuppressorgen p53) wird von direkter Gentherapie gesprochen. Demgegenüber wird der Transfer eines für sich genommen nicht therapeutisch wirksamen Gens, dessen Genprodukt erst in Kombination mit Pharmaka – klassischerweise durch Prodrug-Aktivierung (sogenannte VDEPT) - zytotoxisch wirkt, als indirekte Gentherapie bezeichnet. Sowohl für direkte als auch indirekte Verfahren existieren verschiedene auf Vektoren basierende Transfermethoden, z.B. durch Liposomen oder virale Vektoren (Voges et al.,2002; Ram et al.,1997).

Unter Nutzung des Gentransfers können Tumorzellen über unterschiedliche Mechanismen zerstört werden. Je nach transferiertem Gen geschieht dies durch Apoptoseeinleitung, Auslösung spezifischer entzündlicher Umgebungsreaktionen, Proliferationshemmung durch DNA/RNA-Blockierung, Hemmung der Replikationsvorgänge oder Proteinbiosynthesestop sowie Hemmung der Neovaskularisation (Culver,1996; Alavi und Eck,1998). Weit verbreitet ist die sogenannte Suizidgentherapie.

Suizidgene kodieren für Enzyme, die zumeist in den Nukleosidstoffwechsel eingreifen. Die Suizidgentherapie basiert auf der Umwandlung einer relativ ungiftigen Nukleosidvorstufe (prodrug) in eine zytotoxische Nukleosidform. Die Insertion dieser toxischen Metaboliten in den DNA-Strang führt zur Hemmung der DNA-Polymerasen, zum DNA-Kettenabbruch und hierüber zum Absterben der betroffenen Zelle (Aghi et al.,2000).

Bereits in klinischen Studien wurde die Wirksamkeit des adenoviral vermittelten Transfers der HSV-1-Thymidinkinase mit nachfolgender Ganciclovir-Medikation untersucht. Um eine gezielte Infektion von Glioblastomzellen zu gewährleisten, wurden gliom-selektive Adenovirusstämme konstruiert, deren Einsatz jedoch bislang nur in vitro erfolgte (Eck et al.,1996; Sturtz et al.,1997; Chen et al.,1998; Sandmair et al.,2000).

Die Auswertung der ersten Daten von deutschen Teilnehmern einer prospektiven, internationalen Phase-II-Multicenter-Studie mit genterapeutischem Ansatz zeigte keinen sicheren klinisch relevanten Effekt. Als Vektoren wurden hierbei, anders als beim direkten viralen Transfer durch Adenoviren, retrovirale Vektoren für die Übertragung der HSV-1-Thymidinkinase eingesetzt (Weber et al.,2000). Wesentliche antitumoröse Effekte wurden dabei eher durch sogenannte Bystander-Mechanismen als durch die Virus-Wirkung selbst gesehen. Unter Berücksichtigung der Bystander-Effekte genügt zur nachweisbaren Suizidgentherapie danach eine Infektionsrate von etwa 10% der Tumorzellen, was sich jedoch nicht in klinisch eruierbarer Verbesserung von Lebensqualität oder Verlängerung der Überlebensdauer im untersuchten Kollektiv auswirkte. Durch die Kombination der Effekte von Suizidgen-Transfer und Bestrahlungsbehandlung könnte sich zukünftig aber ein

klinischer Vorteil ergeben, was im Mausmodell unter Nutzung eines Adenovirus-/Thymidinkinase-Systems bereits gezeigt werden konnte (Nestler et al.,2004).

Der Einsatz anderer Suizidgene, z.B. PNP oder CD und weiterer Prodrugs ist in klinischen Studien noch nicht untersucht worden, bildet aber, wie auch die Überprüfung des in vitro-Einsatzes anderer retro- und nicht-retroviraler Vektoren, einen Forschungsschwerpunkt (Parker et al.,1997; Nestler et al.,1997; Rosolen et al.,1998).

Neben Viren wurden auch gentechnisch veränderte Bakterien bereits für Gentransferversuche genutzt. So konnte mit speziell konstruierten Stämmen von *E.coli*, *Shigella flexneri* und *Salmonella spp.* der Nachweis des Transportes genetischer Information in eukaryote Zellen geführt werden (Courvalin et al.,1995). Primär wurden die bakteriellen Vektoren zur oralen Vakzinierung gegenüber bakteriellen Antigenen entwickelt, ihre Eignung zur Genterapie der Neoplasien ist jedoch zunehmend in das Blickfeld der Forschung gerückt worden (Darjii et al.,1997; Yuhua et al.,2001; Jain,2001, Loessner und Weiss,2004). Insbesondere *Listeria monocytogenes* ist für die bakterielle vektorbasierte Genterapie bedeutsam geworden (Weiss und Chakraborty, 2001), wobei über die Eignung zum Transfer in Zellen maligner hirneigener Tumoren noch keine Erfahrungen publiziert worden sind.

1.2 Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes*

1.2.1 Taxonomie, Morphologie und Epidemiologie

Die Gattung *Listeria* wird von sechs Arten gebildet. Alle sechs sind grampositive, peritrich begeißelte Stäbchen, die weder Sporen noch Kapseln bilden. Mittlerweile erfolgte die taxonomische Einordnung in die Sektion 14 im „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ (regelmäßig geformte, nichtsporenbildende, grampositive Stäbchen). Nur *L.monocytogenes* und seltener *L.ivanovii* sind humanpathogen. Erstmals beschrieben wurde *L.monocytogenes* von Murray 1926 in Cambridge. Er beobachtete bei septischen Infektionen von Kaninchen eine Monozytose als Reaktion auf den Erreger. Auf diesen Effekt ist der Speziesname zurückzuführen. Erst 1929 beschrieb Nyfeldt das von diesem Keim ausgehende Krankheitsbild der Listeriose. Der Gattungsname geht auf den Begründer der chirurgischen Antiseptik, Lord Joseph Lister, zurück.

Grundsätzlich gleicht *L.monocytogenes* im Wandaufbau anderen grampositiven Bakterien. Die Stäbchen haben eine Länge von 1-3 µm und einen Durchmesser von circa 0,5 µm. In mikroskopischen Präparaten erscheinen sie oft kokkoid und paarig verbunden, was zu Verwechslungen mit Pneumokokken führen kann. Listerien können sich sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen vermehren. Bei Umgebungstemperaturen um 20°C sind sie peritrich begeißelt und beweglicher als bei 37°C mit dann polarer Geißelformation. Der Temperaturbereich optimalen Wachstums liegt zwischen 30°C und 37°C. Die Vermehrung der Bakterien findet aber auch noch bei 4°C und bis zu 45°C statt. Salzkonzentrationen bis zu 1700 mosmol/l (10%ige NaCl-Lösung) und Schwankungen des pH-Wertes von 4,5-9 werden toleriert. Diese außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen ermöglicht die ubiquitäre Verbreitung der Listerien in der Umwelt.

Die Listerieninfektion zählt zu den Zoonosen. Eine Infektion beruflich Exponierter (Veterinäre, Metzger, Landwirte) ist selten. Meist handelt es sich dann um granulierende lokale Hautinfekte, systemische Erkrankungen sind eine Rarität. Eine Ingestion der Bakterien läßt sich praktisch kaum vermeiden, da Listerien gewöhnlich auf rohen Nahrungsmitteln zu finden sind. So kann *L.monocytogenes* in 10-20% der Proben von Kopfsalat, Käse, Fleisch, Wurst und Milch nachgewiesen werden. Ungenügende Hygienemaßnahmen bei der Verarbeitung von landwirtschaftlichen Produkten führen immer wieder zu Ausbrüchen einer Listeriose. Eine spezielle Gefahr stellt nicht ausreichend pasteurisierte Rohmilch dar. *L.monocytogenes* ist in der Lage, die in der Milch enthaltenen Monozyten zu invadieren. Hier

sind die Erreger durch die Lipide der Zellmembran vor der Hitzewirkung relativ geschützt und die nachfolgende Kühlung bietet ihnen die Möglichkeit sich erneut zu vermehren (Hahn et al.,1994; Hof,1994).

Aus dem Stuhl gesunder Erwachsener läßt sich der Keim in 5-10% der Fälle isolieren und 90% der Bevölkerung besitzen spezifische T-Zellen gegen Listerien-Antigene. Trotz der hohen Trägerrate wird eine Listeriose nur bei 2,5-6/10⁶ Einwohnern pro Jahr in Deutschland diagnostiziert. Um den gesunden Gastrointestinaltrakt manifest zu infizieren, müssen mindestens 10⁶-10⁹ Listerien aufgenommen werden. Die zumeist selbstlimitierenden Symptome reichen dann von grippalen Infekten bis zu leichter Gastroenteritis. Die große Diskrepanz zwischen Keimträgerrate und Inzidenz der Erkrankung zeigt, daß die Listeriose nicht durch einen Problemkeim hervorgerufen wird, sondern daß Problempatienten infiziert werden. Nahezu ausschließlich sind Abwehrgeschwächte Opfer einer septischen Listeriose, die in 10-40% der Fälle letal endet. Eine besondere Gefährdung besteht in der Schwangerschaft. *Listeria monocytogenes* kann die Plazentaschranke durchdringen und sich diffus hämatogen im kindlichen Körper ausbreiten. Folge dessen ist häufig der Abort. Bei infizierten Lebendgeborenen bestehen granulomatöse Gewebereaktionen in allen Organsystemen, das Vollbild ist die sogenannte Granulomatosis infantiseptica. Das Krankheitsbild geht mit hoher Letalität und schweren Behinderungen einher (Kayser et al.,1998).

1.2.2 Die humane Listeriose

L.monocytogenes ist für die mikrobiologische und zellbiologische Forschung ein Modellkeim, denn die Listeriose gilt als Prototyp einer Infektion mit fakultativ intrazellulären Erregern. Insbesondere die Umstrukturierung des zellulären Aktinfilamentapparates während der Einwirkung bestimmter bakterieller Proteine wird für die Erforschung von Zellbewegungsmechanismen genutzt (Cossart und Mengaud,1989; Portnoy et al.,1992; Dramsi et al.,1996; Cossart und Lecuit,1998; Chakraborty,1999).

Auch Gentransferversuche in eukaryote Zellen sind mit *Listeria monocytogenes* schon gelungen (Hense et al.,2001; Krusch et al.,2002). Dabei zeigte sich, dass Listerienvektoren aufgrund ihres fakultativ intrazellulären Infektionszyklus für die Belange eines Fremdgen-Transfers sehr gut nutzbar sind. Listerien tragen in natura keine Plasmide und müssen, um Fremd-Plasmid-DNA transkribieren, exprimieren und transferieren zu können, speziell aufgearbeitet werden. Die Grundlagen hierfür sind unter anderem auch durch das Institut für

Mikrobiologie der Universität Gießen maßgeblich geschaffen worden (Chakraborty,1999; Weiss und Chakraborty,2001).

Der Infektionszyklus von *L.monocytogenes* läßt sich in mehrere Schritte gliedern (Abb.1). Nach der Adhäsion der Listerien an die Membran der Wirtszelle schließt sich die Invasion durch Vakuolenbildung an. Die phagozytotische Vakuole wird von den Listerien perforiert und die Bakterien beginnen sich im Zytoplasma der invadierten Zelle zu bewegen und zu teilen. Die Ausbreitung in benachbarte Wirtszellen erfolgt mittels doppelmembranumhüllter Pseudopodien nach deren Perforation die Listerien ihren intrazellulären Lebensweg erneut vollführen können. Einige an diesem Zyklus beteiligte bakterielle Faktoren sind mittlerweile gut untersucht. Die Rolle der Internaline soll im Folgenden detaillierter geschildert werden.

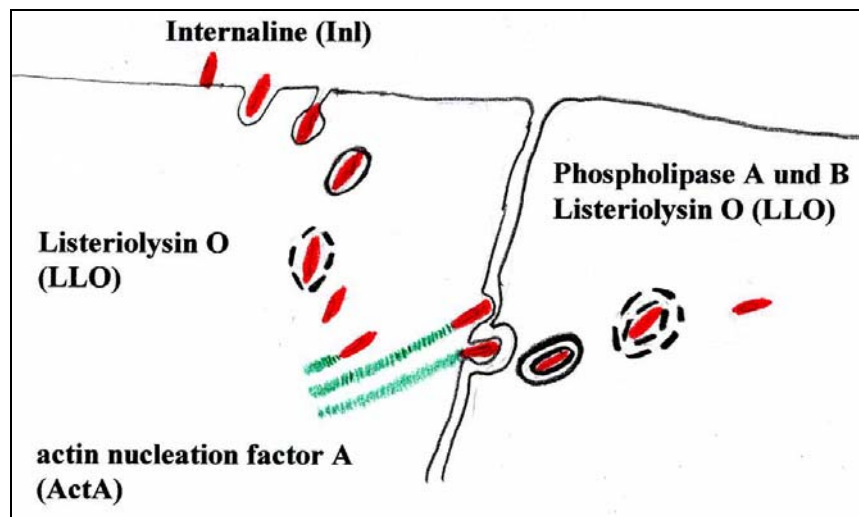


Abb. 1 Schema von Infektionszyklus und daran beteiligten Virulenzfaktoren von *L.monocytogenes*

1.2.2.1 Adhäsion und Internalisation

Die Aufnahme von *L.monocytogenes* erfolgt typischerweise im Gastrointestinaltrakt (Daniels et al.,2000). Die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszellmembran wird über mehrere bakterielle wandassoziierte Proteine gesteuert. Diese werden als Internaline (Inl) zusammengefaßt. Sie vermitteln sowohl die Adhäsion als auch die Invasion der Erreger. Die am besten untersuchten Internaline sind das InlA und das InlB.

Internalin A (InlA) wird aus einer Kette von 800 Aminosäuren gebildet und hat ein Molekulargewicht von 88 kDa (Gaillard et al.,1991). Der N-Terminus besteht aus einer

Signalstruktur (Aminosäuren 1-35), die den Weg des Proteins durch die Bakterienwand steuert. Diese Signalsequenz wird nach dem Membrandurchtritt von einer Peptidase abgetrennt. Die Kette von 330 Aminosäuren der Positionen 85-415 stellt ein sich 15 mal wiederholendes Schema von 22 Aminosäuren dar. Wegen seines charakteristischen Gehaltes an Leucin wird diese Domäne als leucin-rich-repeat-region (LRR) bezeichnet. Die Positionen 517-707 der Aminosäurenkette zeigen ebenfalls ein Wiederholungsmotiv. Dieses Schema besteht aus 70 Aminosäuren und wird einmal wiederholt, während die zweite Wiederholung nach 49 Aminosäuren abbricht. Der C-Terminus wird von einer Membranverankerungsstruktur gebildet (Lebrun et al.,1996).

Als InIA-Rezeptor konnte 1996 das Glykoprotein E-Cadherin identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das von Zellen des Darmepithels vorrangig basolateral exprimiert wird. Für die InIA-Bindung an E-Cadherin ist die LRR des InIA von entscheidender Bedeutung. Einer Blockierung dieser Region oder einer Deletion des entsprechenden Genabschnittes folgt die Inhibition der zellulären Listerieninvasion in vitro. (Gaillard et al.,1991; Mengaud et al.,1996; Lecuit et al.,1997; Pron et al.,1998; Lecuit et al.,1999).

Internalin B (InIB) besteht aus einer Kette von 630 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Die ersten 154 Aminosäuren des N-Terminus bilden das Signalpeptid. Daran angeschlossen sind die dem InIA identischen LRR in 7 facher Kopie. Der C-Terminus hingegen ist gänzlich von dem des InIA verschieden. So gibt es weder das zweite Wiederholungsmotiv noch den Zellwandanker. Statt dessen existiert am C-Terminus ein sich dreimal wiederholendes Schema von etwa 80 Aminosäuren Länge. Jedes Segment beginnt mit der Dipeptidkombination aus Glycin und Tryptophan. Diese 232 letzten Aminosäuren der Kette ermöglichen dem InIB die Assoziation an die Bakterienwand (Braun et al.,1997).

Für InIB ist als Rezeptor auf wirtszellulärer Seite die Bindungsstelle für den globulären Anteil der Komplementkomponente C1q (gC1q-R/p32) identifiziert worden (Braun et al.,2000). Die verstärkte Invasion von Listerien mit InIB-Überexpression konnte für verschiedene Zelllinien in vitro gezeigt werden. Hierbei fiel eine andere Wirtszellspezifität als für das InIA auf. In vivo ist InIB auch nicht in besonderem Maße an der Invasion des Darmepithels beteiligt, anders als InIA (Dramsı et al.,1995; Braun et al.,1998; Parida et al.,1998; Müller et al.,1998).

Die Gene *inIA* (2400 bp) und *inIB* (1890 bp) sind im sogenannten *inIAB*-Operon zusammengefaßt. Fünf verschiedene Promotoren steuern die Expression in diesem Operon. Drei davon beeinflussen isoliert die *inIA*-, einer nur die *inIB*-Expression und einer steuert das Gesamttranskript. Letzterer ist für die Expressionsregulierung des *inIAB*-Operons maßgeblich.

Ihm vorgeschaltet liegt eine Box, die der Bindung des positiven Regulationsfaktors A (prfA) dient. Unter prfA-Einfluß werden die Internalingene, aber auch andere Virulenzgene, von *L.monocytogenes* verstärkt exprimiert (Chakraborty et al.,1992b und Lingnau et al.,1995).

Neben InlA und InlB gehören die Internaline C, C2 und D-I zur sogenannten Internalinmultigen-Familie. Sie wurden als internalinähnliche Genabschnitte an verschiedenen Positionen des Chromosoms charakterisiert. Typischerweise enthalten auch sie die LRR. Anfangs wurde den übrigen Internalinen keine Invasionswirkung zugeschrieben, mittlerweile wird zumindest für einige eine Beteiligung an der zellulären Invasion angenommen (Dramsi et al.,1997; Domann et al.,1997; Raffelsbauer et al.,1998).

Die Internaline induzieren eine Änderung der Zytoskelettformation und steuern somit die Aufnahme der Listerie in die Wirtszelle über Vakuolenbildung. Dazu werden dem Rezeptor angeschlossene Signaltransduktionskaskaden durchlaufen. Verschiedene aktivierte Tyrosinkinase wurden während der Invasion von *L.monocytogenes* in die Wirtszelle nachgewiesen. Die wesentliche Bedeutung kommt dabei der PI-(3)-Kinase zu (Tang et al.,1994; Ireton et al.,1996; van Langendonck et al.,1998; Tang et al.,1998). Die wirtszellmembranadhärenten Listerien werden von der phagozytotischen Vakuole umschlossen und in das Zytoplasma befördert. Damit ist die Internalisation abgeschlossen.

1.2.2.2 Intrazellulärer Lebenszyklus

Internalisierte Listerien befinden sich von einer Phospholipidmembran umschlossen im Inneren der Wirtszelle. Das Milieu in der phagozytotischen Vakuole säuert sich rasch an und verschlechtert die Lebensbedingungen des Bakteriums. Zum Schutz vor dem lytischen Potential der Wirtszelle werden, bakteriell gesteuert, bestimmte Proteine auf der Vakuolenmembran verstärkt exprimiert. Diese fördern die Fusion mit Endosomen, die Fusion mit den Lysosomen zum Phagolysosom wird dagegen gehemmt (Alvarez-Dominguez et al.,1997). Trotz dieser Schutzmechanismen kann die weitere pH-Senkung innerhalb der Vakuole aber nicht verhindert werden. Unter anderem durch den niedrigen pH-Wert von 4-5 aktiviert, wird dann das Gen für ein bakterielles Zytolysin vermehrt abgelesen. Dieses Listeriolysin O (LLO) bewirkt den entscheidenden Anteil am sogenannten „phagosomal escape“. Mittels LLO gelingt es den Listerien sich aus der perforierten Vakuole zu befreien und in das Zytoplasma der Wirtszelle zu gelangen (Chakraborty und Goebel,1988; Cossart et al.,1989; Tilney und Portnoy,1989; Moors et al.,1999).

Die frei im Zytoplasma beweglichen Bakterien finden hier optimale Bedingungen vor. Nun beginnen sie ihren Fortbewegungszyklus. Die gerichtete Bewegung basiert auf einem für die Bakterien passiven aber für die Wirtszelle energieabhängigen Prozeß, der die Listerien durch das Zytoplasma der Wirtszelle schiebt (Lasa et al.,1995; Marchand et al.,1995). Dazu binden die Listerien Aktinfilamente der Wirtszelle an ihre Bakterienwand. Diese werden an einem Pol des Bakteriums akkumuliert und polymerisiert. Die Listerien werden dann in Richtung des nicht Aktin-tragenden Pols durch das Wirtszellzytoplasma bewegt. Das hierzu notwendige bakterielle Protein wurde actin nucleation factor A (ActA) benannt. Unter dem Einfluß dieses Proteins werden sogenannte Aktinschweife ausgebildet. Die hierfür wesentlichen Abschnitte der Aminosäurenkette befinden sich im N-Terminus des Polypeptides. ActA selbst wird, im Gegensatz zu den Bestandteilen des wirtszellulären Zytoskeletts, nicht in den Aktinschweif eingebaut (Domann et al.,1992; Kocks et al.,1993; Niebuhr et al.,1993; Chakraborty et al.,1995; Lasa et al.,1995; Gerstel et al.,1996; Lasa et al.,1997; Ireton und Cossart,1997).

Auf diese Weise gelangen die Bakterien an die innere Membran der Wirtszelle. Dort induzieren sie pseudopodienartige Protrusionen zu benachbarten Wirtszellen. Von jenen aufgenommen, befinden sich die Listerien von einer doppelten Phospholipidmembran umschlossen im Plasma der Nachbarwirtszelle. Dieser Vorgang wird als „cell-to-cell-spread“ bezeichnet und beschreibt die Ausbreitungsfähigkeit der Erreger im Wirtsorganismus ohne Kontakt mit dem extrazellulären Raum (Kocks et al.,1992).

Die Doppelmembranhülle wird wiederum von den Listerien perforiert. Hierzu nutzt das Bakterium neben LLO zwei weitere Phospholipasen. Bakterielle Mutanten mit Deletion dieser Phospholipasengene *plcA* und *plcB* zeigten sich in Infektionsversuchen deutlich im interzellulären Ausbreitungsvermögen gehemmt (Leimeister-Wächter et al.,1991; Domann et al.,1991; Poyart et al.,1993; Smith et al.,1995; Marquis et al.,1995).

Wenn die Listerien die Doppelmembranvakuole perforiert haben, führen sie ihren intrazellulären Lebenszyklus wie oben beschrieben von neuem fort.

1.2.3 Neurotropismus von *Listeria monocytogenes*

Die Dissemination der Listerien in das humane ZNS erfolgt höchstwahrscheinlich auf hämatogenem Wege (Pollock et al.,1984). Untersuchungen der murinen Listeriose zeigen, daß eine persistierende Bakteriämie mit der Schwere der ZNS-Infektion korreliert ist (Berche,1995). Der Austritt aus dem Blutgefäßsystem erfolgt über das Endothel. Listerien haben verschiedene Möglichkeiten, an das Endothel zu adhären und dieses zu

durchwandern. Zum einen über indirekte Mechanismen, welche infizierte Monozyten als Vektoren zum Endothel nutzen. Zum anderen über direkt invasive Eigenschaften der Listerien. Auch hierbei spielen die Internaline, insbesondere InlB, eine Rolle. Ihr interzelluläres Ausbreitungsvermögen ermöglicht den Listerien dann die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS). In der Nähe der zirkumventrikulären Organe werden Listerien nach hämatogener Aussaat regelmäßig gefunden, aber auch isoliert im Hirnstamm nach zentripetaler Durchwanderung der Hirnnervenaxone (Prats et al.,1992; Schlüter et al.,1996; Drevets et al.,1995; Greiffenberg et al.,1998).

Die erste Station auf der zentralen Seite der BHS sind die perivaskulären Astrozyten. Diese werden von den Bakterien invadiert und durchwandert. Gleiches erfolgt in den Zellen der Mikroglia und den Oligodendrozyten. Hierbei zeigte sich in Infektionsstudien, daß die meisten Listerien von der Mikroglia aufgenommen wurden. Weit weniger Bakterien fanden sich in Astro- und Oligodendrozyten. Obwohl der in vitro-Nachweis der Direktinvasion in Neurone nicht möglich war, fanden sich in in vivo-Studien Bakterien innerhalb von Neuronen, so daß ein anderer, indirekter Invasionsmechanismus angenommen wird. In spinalen Rattenneuronen wurden Listerien beispielsweise erst nach interzellulärer Weitergabe der Bakterien durch die umgebenden Gliazellen gefunden. In der gleichen Publikation wird auch die phagozytotische Aktivität von Rattengliazellen bestätigt, die bereits von Noske et al.,1982 postuliert wurde (Otter und Blakemore,1989; Peters et al.,1994; Peters et al.,1996; Dramsi et al.,1998).

Als wesentlicher Virulenzfaktor der Listerienmeningitis von Mäusen wurde das Vorhandensein des Gens der broad-range-Phospholipase C (*plcB*) ermittelt, welche die interzelluläre Ausbreitung der Listerien ermöglicht und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Manifestation der zerebralen Listeriose ist. Die Internaline A und B spielten eher eine untergeordnete Rolle für die Schwere der Infektion (Schlüter et al.,1998).

Die Listeriensepsis kann mit zentralnervösen Affektionen einhergehen. Typischerweise tritt im Rahmen der ZNS-Infektion eine meningitische Verlaufsform auf. Diese zeigt charakteristische Zeichen wie: Fieber, Kopfschmerzen, Meningismus und Bewußtseinsstörungen. Eine Unterscheidung von Meningitiden anderer bakterieller Genese ist aufgrund klinischer Symptome nicht möglich. Auch die Liquorbefunde (lymphogranulozytäre Pleozytose, erhöhtes Gesamtlíquorprotein und normale, gelegentlich auch verminderte Glukosewerte) sind unspezifisch. Eine Monozytose im Liquor wird, wie auch die des Blutes, nur selten gesehen. Der entscheidende diagnostische Schritt ist der Keimnachweis in Blut- oder (gelegentlich negativen) Liquorkulturen. Die Infektion kann indirekt auf das neuronale

Gewebe übergehen und einen meningoenzephalitischen seltener auch überwiegend enzephalitischen Verlauf nehmen. Als Spätkomplikation treten gelegentlich Abszesse auf. Antibiotikum der Wahl ist Ampicillin, welches bei Sepsis in Kombination mit Gentamycin zu verabreichen ist (Schuchat und Broome,1995).

1.3 Problemstellung

Die herkömmlichen Verfahren zur Behandlung des Glioblastoms sind an ihre Grenzen gestoßen. Trotz der Verfeinerung operativer Standards, intensivierter Strahlen- und Chemotherapie sowie der Kombination dieser Verfahren lassen sich nur geringe Verbesserungen der Überlebenszeiten betroffener Patienten erreichen. Die schlechte Prognose dieser Tumoren rechtfertigt die Suche nach alternativen Therapieverfahren.

Die in vitro erfolgreichen Methoden der Immun- und Gentherapie des Glioblastoms werden in zunehmendem Maße auch in klinischen Studien untersucht. In gentherapeutischen Modellen wurden bislang Viren oder Retroviren als Vektoren etabliert. Aus vielerlei Gründen ist deren Einsatz jedoch problematisch (Culver et al.,1992; Chen et al.,1994; Rüger,1997; Dewey et al.,1999; Cowsill et al.,2000). Bakterielle Vektoren bieten demgegenüber einige Vorteile (Loessner und Weiss,2004):

1. Die Kultur der Bakterien in üblichen Nährmedien ist vergleichsweise einfach.
2. Die antibiotische Eradikation der Bakterien stellt ein geringes Problem dar, häufig stehen auch attenuierte Stämme zur Verfügung.
3. Das Vektorgenom verbleibt nur transient in der Zelle.
4. Vom Bakterium können, zusätzlich zu den bakteriellen Genen, Fremdgene bis zu 1000kb Länge aufgenommen und transportiert werden (Narayanan und Warburton,2003).

Um zu klären, ob *Listeria monocytogenes* als Vektor für den in vitro Fremdgentransfer in humane Glioblastomzellen geeignet ist, waren folgende Fragen zu klären:

1. In welchem Maße werden humane Hirntumorzellen von *Listeria monocytogenes* invadiert?
2. Kann durch Expressionssteuerung bestimmter bakterieller Virulenzfaktoren das Invasionsausmaß in humane Hirntumorzellen beeinflusst werden?
3. Lassen sich Fremdgen-Plasmide konstruieren, die durch - normalerweise nicht plasmidtragende - *L.monocytogenes spp.* transkribiert und exprimiert werden können?
4. Können diese Fremdgene in vitro durch *Listeria monocytogenes* in humane Glioblastomzellen transportiert und von diesen translatiert und exprimiert werden?

2. MATERIALIEN

Zelllinien:

A172 (humane Glioblastomzellen),
C6lacZ (Rattengliomzellen),
U87 (humane Glioblastomzellen),
U373 (humane Glioblastomzellen),
293T (humane embryonale Nierenepithelzellen)

American Type Culture Collection
Rockville, Maryland, USA

Kulturmedien, Seren, Puffer und Lösungen:

BHI,
Casein Hydrolysate,
DMEM,
Foetal Bovine Serum (FBS),
LB,
Nutrient Broth,
Yeast Extract

GIBCO BRL Life Technologies
Gaitersburg, USA

Bacto TRYPTONE,
Bacto YEAST EXTRACT

DIFCO
Franklin Lakes, USA

4xBacto Perassau Broth (PAB):

14g Bacto Tryptone
16g Nutrient Broth
12,4g Yeast Extract
ad 1000ml steriles Aqua dest.; pH 6,8; autoklaviert

1M Bernsteinsäure:

135,05g Natriumsuccinat
ad 500ml steriles Aqua dest.; pH 7,3; sterilfiltriert

BSA 5%:

5g BSA (Gerbu FraktionV)
ad 100ml steriles Aqua dest.; pH 7,5; sterilfiltriert

DM3 Regenerationsplatten:

200ml 5 % Agar
500ml 1M Bernsteinsäure
10ml 5 % BSA (25°C)
100ml 5 % Casein Hydrolysate
10ml 50 % Glucose
100ml 3,5 % K₂HPO₄ oder 1,5 % KH₂PO₄
20ml 1M MgCl₂
60ml 10 % Yeast Extract

5mM dNTP-Lösung:

10µl dATP[100mM]
10µl dCTP[100mM]
10µl dGTP[100mM]
10µl dTTP[100mM]
ad 160µl steriles Aqua dest.

Elvanol:

2ml Glycerin
1g Moviol 4-88
4ml PBS
-20°C

Färbelösung:

50mg X-Gal
1,5ml N,N-Dimethylformamid
-20°C

Fusogen:	40g PEG 6000 50ml 2xSMM ad 100ml steriles Aqua dest.; pH 6,8;autoklaviert
Glutaraldehyd 0,125 %:	125ml Glutaraldehyd ad 1000ml 0,15M PBS; pH 7,3; 4°C
Konservierungslösung:	0,02 % NaN ₃ in PBS
Mixer-Lösung:	0,16g K ₃ Fe(CN) ₆ 0,21g K ₄ Fe(CN) ₆ 41µl 1M MgCl ₂ 10µl 0,01 % Natrium-Desoxycholat 20µl Triton X-100 ad 100ml PBS; 4°C
Paraformaldehyd 2 %:	313µl 0,5M EGTA 2ml 1M MgCl ₂ 20g Paraformaldehyd 32,4g PIPES Disodium salt ad 1000ml steriles Aqua dest.; pH 6,9; 4°C
10xPCR-Puffer:	1mg/ml Gelatine 250mM KCl 20mM MgCl ₂ 200mM Tris/HCl, pH 8,3 0,5% Tween 20
2xSMM:	0,04M Maleinsäure 0,01M MgCl ₂ (Hexahydrat) 1M Sucrose 0,02 Tris ad 1000ml steriles Aqua dest.; pH 6,8; autoklaviert
SMMP:	5ml 5 %BSA 40ml 4xPAB 55ml 2xSMM
SOB-Medium:	2% Bacto Tryptone 0,5 % Bacto Yeast Extract 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ (Hexahydrat) 10 mM MgSO ₄ (Heptahydrat) 10 mM NaCl (20 mM Glucose [für die Herstellung von SOC-Medium]) ad 1000ml steriles Aqua dest.; pH 6,7-7,0; autoklaviert
TB:	10 mM PIPES Disodium salt 15 mM CaCl ₂ x2H ₂ O 250 mM KCl 15-20 ml 1 M KOH 55 mM MnCl ₂ x4H ₂ O ad 1000ml steriles Aqua dest.; pH 6,7-7,0;sterilfiltriert; 4°C
Waschlösung:	1ml 1M MgCl ₂ ad 500ml PBS

Zellkultur- und Reaktionsgefäße:

Tissue Culture Flask, 25 ml,
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml

Cellstar Greiner Labortechnik
Frickenhausen, Deutschland

EASY GRIP Tissue Culture Dish 60 x15 mm

Becton Dickinson Franklin Lakes, USA

Tissue Culture Plate 6-well, 24-well, 96-well

Nunc, Kopenhagen, Dänemark

100µl, 200µl, 1,5ml, 1,8ml

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zusatzreagenzien:

Trypsin/EDTA (1x)

PAA Laboratories GmbH
Linz, Österreich

Agarose ELECTROPHORESIS GRADE,
Gentamycin 50 mg/ml,
Penicillin/Streptomycin 50 mg/ml

GIBCO BRL Life Technologies
Gaitersburg, USA

Ampicillin (A 9518),
EGTA (E 4378),
Erythromycin (E 6376)
Glutaraldehyd (G 5882),
Kanamycin (K 4000),
6-Mercaptopurin (M7000),
6-Mercaptopurin-2'-Deoxyribosid (M5628)
6-Methylpurin (M6502),
N,N-Dimethylformamid (D 4254),
Paraformaldehyd (P 6148),
PEG 6000 (P 4463),
PIPES Disodium Salt (P 3768),
Potassium-Ferricyanid (P 8131),
Potassium-Ferrocyanid,
Sodium-Desoxycholat (D 6750),
Tetracyclin Hydrochlorid (T 3383),
Triton X-100 (X 100),
X-Gal (B 4252)

SIGMA
Deisenhofen, Deutschland

D(+)-Glucose-Monohydrat,
Dikaliumhydrogenphosphat,
Chloroform-Isoeacylalkohol,
Kaliumchlorid,
Kaliumdihydrogenphosphat
Kalziumchlorid,
Magnesiumchlorid,
Magnesiumchlorid-Hexahydrat,
Magnesiumsulfat,
Maleinsäure,
Manganchlorid,
Natriumchlorid,
Natriumhydroxid,
Natriumsuccinat,
Sucrose,
Tris

MERCK
Darmstadt, Deutschland

BSA (Fraktion V)

GERBU, Gaiberg, Deutschland

Ethanol, absolut
Deutschland
Glycerol

Riedel - de Haen AG, Seelze,
SERVA, Heidelberg, Deutschland

Moviol 4-88
Deutschland

CALBIOCHEM, Heidelberg,

Ethidiumbromid,
Phenol

ROTH, Karlsruhe,
Deutschland

Fertig-Kits:

Lipofectamine plus

GIBCO BRL Life Technologies,
Gaitersburg, USA

GFX *Micro* Plasmid Prep Kit

Amersham Pharmacia,
Uppsala, Schweden

QIAquick PCR Purification Kit

Quiagen

Enzyme, Enzypuffer, Antikörper, Oligonukleotide und Plasmide:

EcoRI,
MunI,
NotI,
SalI,
XhoI,
T4 DNA Ligase
Taq Polymerase
Lysozym,
Alkalische Phosphatase,
buffer *EcoRI*⁺,
buffer G⁺,
buffer *NotI*⁺,
buffer O⁺,
buffer R⁺,
T4 DNA Ligase buffer

MBI Fermentas, St. Leon-Rot,
Deutschland

Primer CMVβ-3',
Primer CMVβ-5',
Primer EGFP-3',
Primer EGFP-5',
Marker 1 kb+

GIBCO BRL Life Technologies,
Gaitersburg, USA

Maus-IgG M108,
anti-Maus-IgG CY3,
Phalloidin-FITC

dianova, Hamburg,
Deutschland

pCMV beta,
pEGFP-1,

CLONTECH Laboratories
Heidelberg, Deutschland

Geräte:

Mikroskop ID03

ZEISS, Jena, Deutschland

Mikroskop Leitz Diaplan

Leitz, Wetzlar, Deutschland

Brutschränke: B 6060, B6060 (I)
Sterilwerkbänke,
Biofuge 15, Biofuge 15R,
Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments, Hanau,
Deutschland

Water-Jacketed Incubator 3250

Forma Scientific, Marietta, USA

Thermoblock	JUMOTRON, Nürnberg, Deutschland
Kühlschränke, Gefrierschränke	BOSCH, Stuttgart, Deutschland
Mikrowelle Micro-Chef FM 3915 Q	Moulinex, Stuttgart, Deutschland
Destillierkolonne Milli-Q water purification	Millipore, Eschborn, Deutschland
Vortexmischer Vibrofix VF1 Electronic, Magnetrührer IKA MAG RCT	Janke&Kunkel Labortechnik, Stauffen, Deutschland
Thermomixer compact	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Vacuum Concentrator	Bachhofer, Aachen, Deutschland
Digital-pH-Meter 646	KNICK, Duisburg, Deutschland
Waage Kern 770/GS/GJ	KERN, Hamburg, Deutschland
Wasserbad E 100	LAUDA, Deutschland
Gasbrenner Fireboy	Technomara, Ratingen, Deutschland
OD-Meßgerät Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Eisgerät F90 Compact Electronic	Icematic, Frankfurt, Deutschland
Absorptionsmeßgerät Microplate Autoreader EL 310	BIO-TEK INSTRUMENTS, Frederick, USA
PCR-Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	PERKIN ELMER, Norwalk, USA
Rundschüttler HAT	Infors AG, Einsbach, Deutschland
BioSys Spiralplattierer	Biosys, Hannover, Deutschland
RC2-B Superspeed-Zentrifuge	SORVALL, Newtown, USA
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E 865	CONSORT, Menlay, USA
Pipetten und Glaswaren:	
Handpipetten: 2µl-1000µl	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Pipetboy Impact	MATRIX, Nashville, USA
Dispensette III Easy Calibration	BRAND, Hamburg, Deutschland
Pipetboy acu, Absaugpumpe Vacuboy	Integra Biosciences, Plainsboro, USA
Glasflaschen	Schott, Bayreuth, Deutschland
Glaspipetten 1ml-25ml, Erlenmeyerkolben 50ml-1500ml	BRAUN, Melsungen, Deutschland
Objektträger, Deckgläschen	MENZEL-GLÄSER Burgdorf, Deutschland

3. METHODEN

3.1 Anlage und Konservierung von Zellkulturen

Um ausreichend natives Tumorzellmaterial zu gewinnen, werden Direktpräparate, sogenannte Primärkulturen, von intraoperativ entnommenen Tumorteilen wie folgt angefertigt:

1. DMEM-Kulturmedium mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung [50mg/ml] anreichern
2. Tumorfragment in 5ml einer 1:1 Mischlösung aus Kulturmedium und Trypsin aufnehmen
3. Ansatz für 3 Stunden zur Enzymeinwirkung im 37°C-Brutschrank belassen
4. Währenddessen zusätzlich mechanische Zerkleinerung durch Resuspendieren
5. Lösung mild zentrifugieren und Überstand entfernen
6. Resuspendiertes Zellmaterial in Kulturflaschen mit frischem DMEM-Medium geben
7. Zellen ein bis zwei Tage später von Medium und Detritus befreien, mit frischem Kulturmedium versetzen und bis zur Konfluenz der Zellschicht züchten.

Die wachsenden Zellen müssen regelmäßig, wenn sie einen konfluenten Zellrasen gebildet haben, auf enzymatischem Wege voneinander getrennt werden (sog. Passagieren). Dazu:

1. Medium aus der 25ml-Kulturflasche entnehmen und Zellen behutsam mit PBS überspülen
2. Zellen vorsichtig mit 2ml Trypsinlösung benetzen, wovon 1,5ml wieder entfernt werden (Die verbliebenen 0,5 ml Trypsin lösen die Zellen sowohl von der Unterlage als auch von Nachbarzellen ab. Dieser Vorgang nimmt 2-5 Minuten in Anspruch und kann durch vorsichtiges Schwenken und Abklopfen der Flasche beschleunigt werden. Eine möglichst vollständige Vereinzelung der Zellen ist anzustreben.)
3. Trypsin-Zellsuspension mit Kulturmedium auf 5ml auffüllen, von dieser Lösung 0,5-1ml in der Kulturflasche belassen und den Rest verarbeiten oder verwerfen
4. Verbliebene Zelllösung mit frischem Kulturmedium auf 5ml Gesamtvolumen auffüllen und im Brutschrank wieder kultivieren.

Die für die weitere Kultivierung nicht benötigten, abgelösten Zellen in der DMEM-Trypsin-Lösung können für Versuchszwecke vorbereitet werden. Die Zellsuspension wird hierzu mittels einer Zählkammer auf den Einzelzellgehalt hin bestimmt. Entsprechend der

Zellzahl/ml wird eine Verdünnung mit frischem Kulturmedium auf den für die Versuche gewünschten Zellgehalt vorgenommen.

Zur dauerhaften Konservierung wird das zellhaltige Medium mit DMSO im Verhältnis 95:5 gemischt. Diese Mischung muß, da DMSO auf stoffwechselaktive Zellen zytotoxisch wirkt, sofort mit Flüssigstickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Von DMSO-konservierten Zellen können folgendermaßen Kulturen angelegt werden:

1. Zellen im 37°C-Wasserbad auftauen und DMSO-haltiges Kulturmedium entfernen
2. Frisches Zellkulturmedium zugeben und Gesamtansatz mild zentrifugieren
3. Überstand verwerfen und Zellen in frischem Medium resuspendieren
4. Suspension in Kulturflaschen verbringen und im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) bis zur Konfluenz züchten.

3.2 Anlage und Konservierung von Bakterienkulturen

Die für die Experimente benötigten Bakterien wachsen auf Agarplatten mit speziellen Nährmedien. *Listeria spp.* werden auf BHI- und *E.coli spp.* auf LB-haltigen Medien gezüchtet. Wildtypbakterien und nicht-plasmidtragende Stämme benötigen keine weiteren Zusätze. Handelt es sich um plasmidtragende Bakterien, enthalten die Medien zudem ein Antibiotikum. Dies bestimmt die Selektion von Bakterien, auf deren Plasmiden eine Antibiotikumresistenz kodiert ist. Auf Agarplatten ausgestrichene Bakterien werden im Brutschrank oder im Kühlraum kultiviert und gelagert. Für die Versuche werden üblicherweise frisch kultivierte, optimal wachsende Bakterienkulturen, sogenannte Übernachtkulturen (ÜNK) verwendet. Zum Anlegen der Kulturen:

1. Autoklavierte 100ml-Erlenmeyerkolben mit 20ml Flüssignährmedium befüllen
2. Bei plasmidtragenden Bakterien das entsprechende Antibiotikum in wirksamer Endkonzentration zur Selektion hinzufügen (*Listerien* mit Erythromycinresistenz [5µg Erythromycin/ml BHI-Medium], *E.coli spp.* mit Ampicillinresistenz [100µg Ampicillin/ml LB-Medium], Wildtypbakterien und nicht plasmidtragende Stämme ohne antibiotische Zusätze animpfen)
3. Zum Medium Abstriche von Bakterienkolonien der Agarplatten oder 10µl einer Glycerinkultur geben
4. Erlenmeyerkolben im Rundschtüttler bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubieren.

Eine dauerhafte Konservierung kann durch das Anlegen sogenannter Glycerinkulturen erreicht werden. Die Bakterien werden hierfür bis zu einer OD_{600} von 0,9-1,1 in entsprechendem, gegebenenfalls mit Antibiotikum versetztem Nährmedium gezüchtet. 1ml des Ansatzes wird zu 0,5ml Glycerol in ein Gefrierbehältnis gegeben, durchmischt und bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Bei Nutzung der Glycerinkulturen sind diese nur so kurz wie nötig aufzutauen.

3.3 Invasionsversuche mit ZNS-Tumorzellen

3.3.1 Vorbereiten der Zellkulturen für Invasionsversuche

Mit Invasionsversuchen soll die Invasionsfähigkeit verschiedener Listerien-Stämme in ZNS-Tumorpräparate untersucht werden. Zur Vorbereitung:

1. 25ml einer verdünnten Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml anfertigen
2. Je 1 ml/well in eine 24-well-Zellkulturplatte füllen. Das letzte well einer jeden Reihe zuvor mit einem Runddeckgläschen (für die spätere Fluoreszenzantikörperfärbung) versehen
3. Zellkulturplatte im 37°C -Brutschrank bis zur Semikonfluenz der Zellen züchten
4. Zellkulturmedium entfernen, die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem PBS waschen
5. je 1ml frisches, vorgewärmtes, *antibiotikumfreies* Kulturmedium in die wells füllen und Kulturplatte bis zur Infektion im Brutschrank lagern.

3.3.2 Vorbereiten der Bakterienkulturen für Invasionsversuche

1. ÜNK der verschiedenen Listerienstämme anlegen
2. Am nächsten Tag jeweils 200 μl der ÜNK zu 9,8ml frischem erythromycinhaltigen bzw. antibiotikumfreien BHI-Medium geben
3. Ansatz bis zu einer OD_{600} von 0,9-1,1 im 37°C -Rundschüttler kultivieren (ca.3 Stunden)
4. Je 1ml von jeder Stammkultur entnehmen und in separaten Reaktionsgefäßen zentrifugieren (2 min; 8000 rpm)
5. Überstände entfernen und Bakterienpellets in 1ml frischem *antibiotikumfreien* Zellkulturmedium durch vortexen resuspendieren

6. Bakterienkulturen erneut zentrifugieren (2 min; 8000 rpm), in *antibiotikumfreiem* Zellkulturmedium resuspendieren und möglichst bald in den Infektionsansatz geben.

Um später die Zahl der in die Tumorzellen invadierten Bakterien gegen die Anzahl der hierfür eingesetzten Bakterien abzugleichen, werden Kontrollkulturen (Inokulum) für jede Bakterienkultur angelegt. Je 50µl der bereits vorbereiteten Bakterienkulturen werden 1:100 in 4,95ml PBS verdünnt. Nach Durchmischung werden diese Ansätze nochmals 1:100 und daran anschließend 1:10 in PBS verdünnt. Somit wird die Bakterienkultur insgesamt auf 10^{-5} verdünnt und dann mit dem Spiralplattierer auf je zwei BHI-Agarplatten ausgestrichen.

3.3.3 Infektion der Säugerzellen in Invasionsversuchen

Die vorbereiteten Säugerzellen werden mit den präparierten Bakterienkulturen infiziert. Die Listerien adhären und invadieren die Säugerzellen in unterschiedlich starkem Ausmaß. Um im Nachhinein bestimmen zu können, wieviele Listerien bis nach intrazellulär vordringen konnten, muß die Säugerzellmembran perforiert/lysiert werden. Die intrazellulär lokalisierten Listerien (relativ resistent gegenüber der lytischen Substanz) werden in das umgebende Kulturmedium freigegeben, das durch ein Antibiotikum zuvor von den viablen extrazellulären Listerien befreit wurde. Das Medium wird dann auf Agarplatten ausgestrichen und somit gelangen lediglich die koloniebildenden Einheiten von intrazellulären Listerien zur Auszählung.

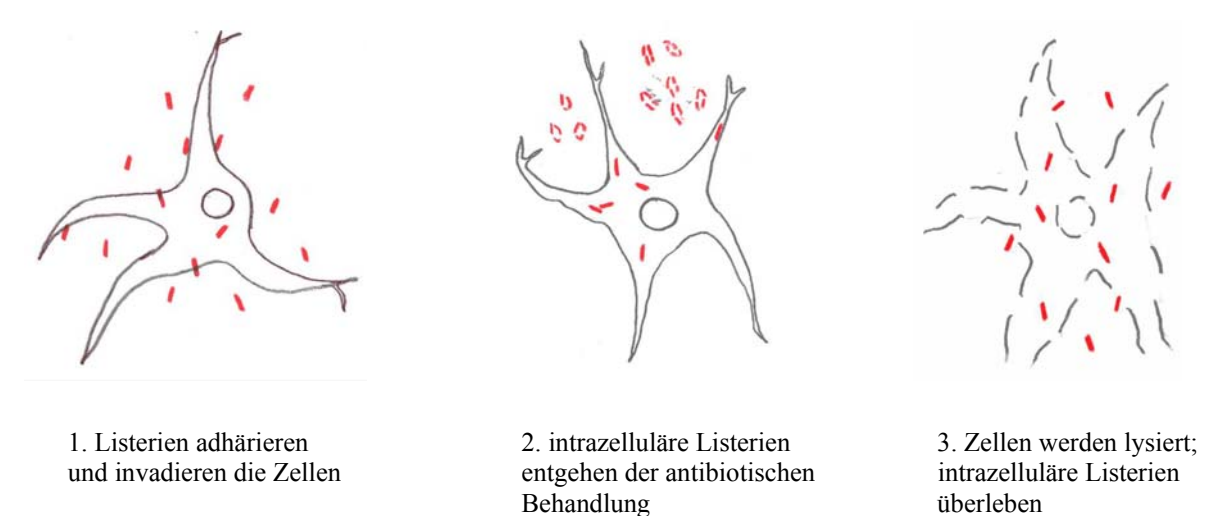


Abb. 2 Schematischer Ablauf der Invasionsversuche

1. Je 8µl der vorbereiteten Bakterienkulturen in entsprechende wells zum Kulturmedium der präparierten Zellen geben und vorsichtig resuspendieren
2. Infektion der Zellen im 37°C-Brutschrank für 1 Stunde
3. Nach der Infektionszeit Zellkulturmedium entfernen und wells vorsichtig mit vorgewärmtem PBS waschen
4. Je 1ml vorgewärmtes gentamycinhaltiges Kulturmedium (50µg/ml) in wells geben und für 1 Stunde bei 37°C inkubieren
5. Gentamycin-Medium entfernen und Zellen vorsichtig mit PBS waschen
6. Zur Wirtszellperforation pro well je 1ml Triton X-100-Lösung 0,2% geben und für 20 min auf den Zellen belassen, danach Ansatz mehrfach mit einer Multipipette auf- und abpipettieren
7. Je 0,5ml der Suspension in Glasröhrchen geben und 1:10 mit 4,5ml PBS verdünnen.

Die wells mit Deckgläschen für die Fluoreszenzmikroskopie werden nicht mit Triton X-100 behandelt. Nach dem letzten Waschschrift werden diese wells stattdessen mit 0,5ml Paraformaldehyd (4% in PBS) für 10 min fixiert und danach die Fixierlösung durch PBS ersetzt. Die Beschreibung der Vorbereitung zur Immunfluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie erfolgt im Kapitel 3.3.5.

3.3.4 Plattierung, Bestimmung des Bakteriengehaltes und Auswertung

Das Inokulum (Kontrollbakterienkulturen), die verdünnten sowie die in der Zellkulturplatte verbliebenen unverdünnten Bakteriensuspensionen werden zur Bestimmung der Bakterienkonzentration auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Die Plattierung wird von einem Spiralplattierer übernommen, der ein Probenvolumen von 50µl zirkulär auf einer Agarplatte ausstreicht. Die Platten werden über Nacht bei 37°C kultiviert und tags darauf für weitere 3-4 Tage im 4°C-Kühlraum bebrütet.

Zur Auswertung des Koloniewuchses der Agarplatten wird ein Scanner genutzt. Dieser zählt den absoluten Besatz von Bakterieneinzelkolonien auf der Platte aus und setzt diesen Wert unter vorzugebenden Optionen (gewählte Verdünnung, plattiertes Probenvolumen) direkt in den Zahlenwert koloniebildender Einheiten pro ml der eingesetzten Suspension um.

Die Resultate der Scans ergeben für jede Verdünnung und jeden Bakterienstamm separat die Mittelwerte der absoluten Koloniezahl/ml eingesetzter Probenlösung. Die Scanwerte der zwei Agarplatten des Inokulums ergeben dabei die absolute Anzahl koloniebildender

Einheiten pro ml der jeweils für die Invasionsversuche eingesetzten Bakterienkulturen. Um daraus berechnen zu können, wieviele der eingesetzten Bakterien in die Zellen invadieren konnten, wird der Quotient aus den mittleren Absolutzahlen der einzelnen Bakteriensuspensionen und dem entsprechendem Inokulum gebildet. Der erhaltene Quotient (absolute Invasion) wird mit dem Faktor 0,008 (8/1000) multipliziert, da für die Infektion nur 8µl und nicht 1000µl der jeweiligen Bakterienkultur eingesetzt wurden.

$$\text{absolute Invasion} = \frac{\text{Mittelwert der absoluten Koloniezahl/ml der Bakteriensuspension} \times 0,008}{\text{Mittelwert der absoluten Koloniezahl/ml des entsprechenden Inokulums}}$$

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Invasionsfähigkeit der einzelnen Bakterienstämme herzustellen, wird die relative Invasionsrate des jeweils untersuchten Stammes gegenüber dem Wildtypstamm gebildet. Hierzu wird die absolute Invasion des jeweiligen Bakterienstammes durch die absolute Invasion des Wildtyps dividiert. Die Invasionsrate des Wildtypstammes wird dabei willkürlich gleich 100% gesetzt und die Invasionsraten der untersuchten Stämme werden dagegen aufgetragen.

$$\text{relative Invasion (\%)} = \frac{\text{absolute Invasion des interessierenden Stammes} \times 100}{\text{absolute Invasion des Wildtypstammes}}$$

Das Invasionsverhalten wird zur Ergebnisüberprüfung in zwei voneinander unabhängigen Experimenten pro Zelllinie untersucht. Die Invasionsraten der einzelnen Stämme werden für die verschiedenen Tumorgruppen zusammengefaßt und der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

Zur Überprüfung der Unterschiedssignifikanz der Invasionswerte der einzelnen Listerienstämme innerhalb der jeweiligen Tumorzelllinien wird der *U*-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Anhand der wenigen Versuche an teils nicht dauerhaft stabilen Zelllinien kann nicht geklärt werden, ob tatsächlich eine Normalverteilung der unabhängigen Variablen vorliegt, obwohl dies zumindest approximiert hätte vereinfachend (aber u.U. verfälschend) angenommen werden können. Auch die errechnete Varianz ist nicht ausreichend homogen. Somit sind die grundsätzlichen Voraussetzungen für eine parametrische Testung nicht gegeben, weshalb ein nicht-parametrisches Testverfahren angewandt werden musste (Sachs,1993). Durch eine symmetrieerzeugende Transformation der Daten (log-oder Wurzel-Transformation) wäre auch

ein einfacher parametrischer Test (z.B. t -Test) anwendbar gewesen, was aufgrund der möglichen inkongruenten Transformation der Erwartungswerte wieder verworfen wurde. Der U -Test (nicht-parametrisches Pendant zum t -Test) bedarf hingegen, bei im Vergleich höherem Rechenaufwand, keiner Transformation. Unter den gegebenen Umständen bietet der Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon somit die bessere Trennschärfe, was zugleich aber auch seine Auslegung beeinträchtigt. Als Rang-Test deckt er selbst kleinste (und damit u.U. vielleicht doch nicht relevante) Invasionsunterschiede mit höherer Wahrscheinlichkeit auf, da zwar die Rang-Reihenfolge, weniger aber die Größenordnung der jeweiligen Invasionsdifferenz in die Berechnung einfließt. Spätestens an diesem Punkt wird die Grenze zur Verallgemeinerungsfähigkeit der Invasions-Experimente und deren statistischer Auswertung erreicht. Die Bestimmung eines ausreichenden Stichprobenumfangs lässt sich für Rangtests nur sehr schwer gestalten. Man kann aber davon ausgehen, dass die zur Verfügung stehenden Hirntumor-Proben in dieser Arbeit sicher nicht die hierfür notwendige Anzahl erreicht. Eine Verallgemeinerung der Ergebnisse, bei wohl nicht voraussetzender Repräsentativität für die Grundgesamtheit aller Hirntumoren, ist allein schon aus diesem Grunde nicht ohne weiteres nachvollziehbar - aber auch nicht Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit.

3.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen nach Invasionsversuchen

Immunfluoreszenzpräparate werden hergestellt, um die Adhäsion und Invasion von Listerien sichtbar zu machen. Dazu werden als Primärantikörper Maus-IgG (M108) und als Sekundärantikörper ein anti-Maus-IgG (α -mouse-CY3) verwendet. Zusätzlich wird das zelluläre Aktin mit einem fluoreszierenden Antikörper (Phalloidin-FITC) gefärbt.

Die vor dem Invasionsversuch mit Deckgläschen versehenen wells werden anschließend mit Paraformaldehydlösung fixiert, welche nach 10 min Fixierung durch PBS ersetzt wird. Zur Immunfluoreszenz wird wie folgt vorgegangen:

1. In den wells befindliches PBS entfernen und durch je 0,5ml Triton X-100-Lösung 0,2% (zur Membranpermeabilisation) ersetzen, welches für 2 min auf dem Zellrasen bleibt
2. Triton X-100-Lösung durch je 1ml PBS ersetzen, die Runddeckgläschen den wells entnehmen und in eine vorbereitete feuchte Kammer legen
3. Auf jedes Deckgläschen 15 μ l des unverdünnten Primärantikörpers M108 pipettieren, feuchte Kammer verschließen und 30 min in 37°C-Brutschrank *ohne CO₂-Zusatz* stellen
4. Während der Inkubation des Primärantikörpers das zweite Antikörpergemisch frisch zusammenpipettieren (2 μ l des Antikörpers Phalloidin FITC und 1 μ l des Sekundärantikörpers α -Maus-CY3 werden in 97 μ l PBS verdünnt [1:50 und 1:100]. Das Antikörpergemisch wird bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.)
5. Mit dem Primärantikörper inkubierte Deckgläschen mit einer Pinzette der feuchten Kammer entnehmen und vorsichtig in PBS waschen
6. Je 15 μ l des zweiten Antikörpergemisches auftragen und in feuchter Kammer 30 min im 37°C-Brutschrank inkubieren
7. Deckgläschen nach der Inkubation erneut mit PBS waschen, Präparate mit der zellbewachsenen Seite auf einen Objektträger mit einem Elvanol-Tropfen legen und zum Aushärten mindestens 15 min im 37°C-Brutschrank (*ohne CO₂*) belassen
8. Deckgläschen vorsichtig am Rand mit Nagellack punktuell fixieren und unter dem Mikroskop fotografieren.

Es werden jeweils 10 nicht verbundene Blickfelder pro Fluoreszenzpräparat betrachtet. Im Durchschnitt können in der geeigneten Vergrößerung dabei 50-100 Zellen untersucht werden. Adhärenz und nicht adhärenz sowie invadierte und nicht invadierte Zellen werden gezählt. Das Ausmaß der Adhäsion und Invasion wird in ein semiquantitatives Bewertungsschema eingefügt:

> 40/100 Zellen adhärenz oder invadiert	+++++
20-40/100 Zellen adhärenz oder invadiert	++++
10-20/100 Zellen adhärenz oder invadiert	+++
5-10/100 Zellen adhärenz oder invadiert	++
0-5/100 Zellen adhärenz oder invadiert	+

3.4 Methoden der Plasmidverarbeitung

3.4.1 Plasmidisolierung aus *E.coli* spp.

Die verwendeten Plasmide sind üblicherweise in *E.coli* spp. transformiert worden. Hierüber läßt sich das Plasmidmaterial leicht vermehren, muß aber zur Bearbeitung aus den Bakterien extrahiert werden. Zur Isolierung der extrachromosomalen bakteriellen DNA wird der GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit nach Herstelleranleitung genutzt. Der Kit kann zum Isolieren und Reinigen von Plasmid-DNA aus 1-3ml einer ÜNK von *E.coli* eingesetzt werden.

Die verschiedenen Präparationsschritte führen zu einer modifizierten alkalischen Lyse der bakteriellen Wandstruktur, Neutralisation des Ansatzes und zur Bindung der Plasmid-DNA an eine Glasfaser-Matrix sowie deren Aufreinigung. Die Elution wird mit sterilem Aqua dest. durchgeführt. So lassen sich etwa 3-6µg DNA pro eingesetztem ml der ÜNK isolieren. Danach folgt entweder die Weiterverarbeitung oder die Konservierung des Eluates bei -20°C. Jeder Gefriervorgang führt zu mechanischen Schäden am DNA-Strang, weshalb Frier- und Auftauphasen auf das Nötigste beschränkt werden sollten.

3.4.2 Plasmidrestriktionsverdau

Um die ringförmigen Plasmide für den Einbau von zusätzlichen DNA-Fragmenten zu öffnen, kann an bestimmten Abschnitten der DNA mit hierfür spezifischen Restriktionsenzymen eine Ringtrennung erfolgen. Wird an mehreren Positionen des Ringes geschnitten, können

(aufgrund der Spezifität der Enzyme) bestimmte gewünschte DNA-Abschnitte herausgetrennt werden. Das Vorgehen im Einzelnen:

1. 500ng Plasmidisolat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
2. 2µl (enzymspezifischen) Puffer zugeben und Ansatz mit sterilem Aqua dest. auf 19µl auffüllen
3. Ansatz durchmischen und 1µl (10U) Restriktionsenzym dazugeben
4. Reaktionsvolumen durchmischen und 2 Stunden bei 37°C inkubieren.

Auf die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und gewählten DNA-Schnittstellen wird im Kapitel 3.7 (Konstruktion der Plasmidvektoren) genauer eingegangen.

3.4.3 Gelelektrophorese

Die restriktionsverdauten DNA-Schnittfragmente und PCR-Produkte können auf Agarosegelen nach Ethidiumbromid-Markierung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Martin,1996). Folgendes Vorgehen wurde angewandt:

1. Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämmen auf Präparationstisch eben justieren
2. In 250ml-Erlenmeyerkolben 100ml 1xTBE-Puffer sowie 1g Agarose geben
3. Lösung aufkochen
4. Lösung kühlen und mit 5µl Ethidiumbromid versetzen
5. Die noch flüssige Agaroselösung zum Erkalten in vorbereitete Gelschlitten gießen
6. Nach Erstarren des Geles Kämmen und Abklebungen entfernen
7. Gel samt Schlitten in Elektrophoresekammer mit 1xTBE-Puffer einsetzen
8. Verdauansätze mit 5µl Ficoll-Auftragspuffer mischen und in separate „Slots“ des Gels pipettieren
9. 6µl DNA-Leiter (z.B. Marker1kb⁺) in ein separates „Slot“ geben
10. Elektrophorese bei 150V und 500mA für 1-1,5 Stunden
11. DNA-Banden nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar machen und mit angeschlossener Fotoeinheit dokumentieren.

3.4.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um DNA von Proteinen, Enzymen und Puffersubstanzen zu trennen, wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen.

1. Zum Reaktionsansatz 0,5 Volumenteile Phenol sowie 0,5 Volumenteile Chloroform-Isoneacylalkohol geben
2. Ansatz durchmischen und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (Dadurch bilden sich zwei etwa gleich große Phasen im Reaktionsgefäß. In der oberen Phase befindet sich die phenolisierte DNA, in der unteren sind die Proteine enthalten.)
3. Die obere Phase entnehmen und in neues Reaktionsgefäß überführen
4. Ein Zehntel des jetzigen Probenvolumens an 3M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumenteile eiskalten Ethanol (100%) dazugeben
5. Ansatz mischen und 30 min bei -20°C lagern
6. Ansatz 15 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugieren und Überstand entfernen (Das häufig sichtbare DNA-Pellet soll dabei nicht abgelöst werden.)
7. 200µl eiskalten Ethanol (70%) vorsichtig dazupipettieren und 10 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugieren, dann Überstand entfernen
8. DNA-Pellet trocknen und in sterilem Aqua dest. aufnehmen.

3.4.5 Dephosphorylierung und „heiße“ Phenolextraktion

Zur Verbesserung der Effizienz bei Ligationsreaktionen von DNA-Fragmenten sollte eines der Fragmente an den zu ligierenden Enden frei von Phosphatresten sein. Diese Dephosphorylierung wird mit Alkalischer Phosphatase folgendermaßen vorgenommen:

1. 0,1 Volumenteile 10xDephosphorylierungs-Puffer mit phenol-chloroform-extrahiertem DNA-Ansatz mischen
2. 1U Alkalische Phosphatase hinzupipettieren und Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubieren
3. 0,1 Volumenteile 200mM EGTA-Lösung zum Reaktionsansatz geben und 10 min bei 65°C inkubieren
4. Auf 65°C erhitztes Gemisch (1:1) von Phenol und Chloroform-Isoneacylalkohol dazugeben und Gesamtansatz 90 Sekunden bei 65°C inkubieren
5. Das weitere Vorgehen entspricht der Phenol-Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 3.4.4; ab Punkt 2).

3.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um linearisierte DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, wird eine enzymatische Ligation vorgenommen. Die Ligase stammt vom T4-Phagen. Unter Enzymwirkung kommt es zur Verbindung der DNA-Fragmente an komplementären Segmenten. Je ein Fragment pro Ligationsstelle sollte dephosphoryliert sein. Der Assay wird folgendermaßen angesetzt:

1. Je 1µl präparierter, phenolextrahierter DNA-Fragmente in Reaktionsgefäß geben
2. Dazu 4µl T4-DNA-Ligase-Puffer pipettieren und Ansatz mit Aqua dest. auf 19µl auffüllen
3. Ansatz mischen und 1µl T4-DNA-Ligase dazugeben
4. Ansatz nochmals mischen, 20 Stunden im 14°C-Wasserbad inkubieren und anschließend bei -20°C lagern.

3.4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für das Screening nach spezifischen DNA-Fragmenten, zur Überprüfung der korrekten Genorientierung in Plasmidvektoren und das Einbringen von flankierenden Schnittstellen in einen gewünschten Genabschnitt kann die polymerase chain reaction (PCR) eingesetzt werden. Reaktionsprinzip ist zunächst die Anhaftung (annealing) von kurzstreckigen Oligonukleotiden (primern) an komplementäre Anteile des DNA-Ausgangsstranges (template). Ausgehend von den Primern kann durch eine DNA-Polymerase (üblicherweise von *Thermus aquaticus*) ein Komplementärstrang gebildet werden. Durch vielfache Wiederholung des temperaturabhängigen Reaktionsschrittes (Amplifikation) entstehen größere DNA-Mengen, die besser für den Nachweis oder die Weiterverarbeitung geeignet sind (Newton und Graham,1994).

Beim Erstellen der Oligonukleotidsequenzen müssen einige Regeln befolgt werden, um möglichst spezifische und stabile Reaktionen zu ermöglichen. Die Primer sollen eine Länge von 18-25bp mit einem ausgewogenem Verhältnis aller vier Basen haben. Längere Primer erhöhen die Spezifität nicht, sondern fördern unspezifische Bindungen. Die 3'-Enden sollen eine Bindung der Primer untereinander (Primerdimere und andere Artefakte) nicht zulassen.

Für einen PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien im PCR-tube auf Eis zusammenpipettiert:

1. 1µl Template (Ursprungs-DNA)
2. 5µl 10xPCR-Puffer
3. 2µl 5mM dNTP
4. 0,5µl 5'-Primer
5. 0,5µl 3'-Primer
6. 0,25µl Taq-Polymerase
7. ad 50µl Aqua dest.

Die Templates werden in dieser Arbeit nach folgendem Standardprogramm amplifiziert:

1. Denaturierung des gesamten Ansatzes bei 94°C für 2 min
 2. Denaturierung bei 94°C für 30s
 3. Annealing bei 50°C für 30s
 4. Amplifizierung bei 72°C für 90s
 5. Letzte Amplifizierung bei 72°C für 3 min
 6. Kühlung auf 4°C.
- Das Zyklusprogramm wird 25-fach durchlaufen.

Nach der PCR werden 5µl des PCR-Produktes mit 5µl Ficoll-Auftragspuffer sowie 5µl Ethidiumbromid gemischt und auf einem Elektrophoresegel aufgetragen. Vor Weiterverarbeitung des PCR-Ansatzes wird eine Aufreinigung der DNA mit dem Quiaquick PCR Purification kit nach Anleitung des Herstellers vorgenommen.

3.5 Herstellung transformationsfähiger Bakterien

3.5.1 Herstellung ultrakompetenter *E.coli*

Plasmid-DNA lässt sich am einfachsten durch die in *E.coli* enthaltenen Polymerasen vervielfältigen. Fremd-DNA wird von *E.coli* allerdings nicht ohne weiteres aus der Umgebung des Bakteriums aufgenommen. Nach spezieller Vorbehandlung können Plasmide aber in sogenannte ultrakompetente *E.coli* transformiert werden. Die Herstellung dieser *E.coli*-Stämme erfolgt nach dem Protokoll von Inoue et al.,1990:

1. 10µl Glycerinkultur von DH10-*E.coli* mit 10ml SOB-Medium in 100ml-Erlenmeyerkolben geben und über Nacht im 37°C-Rundschüttler kultivieren

2. Tags darauf 5ml der ÜNK und 245ml frisches SOB-Medium in 1000ml-Erlenmeyerkolben geben (1:50 Verdünnung)
3. Kultur im 18°C-Wasserbad bis zur OD₆₀₀ von 0,6 züchten
4. Ansatz in GS3-Zentrifugenbecher pipettieren und 10 min auf Eis kühlen
5. Zentrifugation (10 min, 2500g, 4°C)
6. Überstand entfernen, Pellet in 80ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendieren und Ansatz 10 min auf Eis stellen
7. Zentrifugation (10 min, 2500g, 4°C)
8. Überstand vollständig entfernen und Pellet in 18,6ml eiskaltem TB resuspendieren
9. 1,4ml DMSO zur Suspension geben (Endkonzentration 7%) und Kultur 10 min auf Eis inkubieren
10. Ansatz zu je 250µl in Eppendorf-Gefriergefäße aliquotieren
11. Aliquots mit Flüssigstickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.

3.5.2 Herstellung von *Listeria monocytogenes*-Protoplasten

Um aus Listerien Gen-Vektoren herzustellen, müssen Plasmide in die Bakterien transformiert werden. Auch native *L.monocytogenes*-Stämme nehmen Fremd-DNA aus ihrer Umgebung unter Normbedingungen nicht auf und sie tragen auch keine speziestypischen Plasmide. Um Listerien für Plasmide transformationsfähig zu machen, müssen diese von ihrer Zellwand befreit werden. Die dann zellwandlosen Bakterien werden Protoplasten genannt. Die Herstellung der Protoplasten wird durch eine enzymatisch/osmotische Lyse der Mureinschicht nach einem Protokoll von Wuenscher et al.,1991 vorgenommen:

1. In 100ml-Erlenmeyerkolben ÜNK aus 10µl einer *L.monocytogenes*-EGD-Glycerinkultur und 20ml BHI-Medium (mit 0,2% Glycin) ansetzen
2. 300µl der ÜNK in 29,7ml BHI-Medium (0,2% Glycin) 1:100 verdünnen
3. Ansatz im 37°C-Rundschüttler bis zur OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultivieren
4. 25ml des Ansatzes in 50ml-Greiner-Spitzbodenröhrchen pipettieren und 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
5. Überstand verwerfen, Pellet mit 25ml sterilem Aqua dest. waschen und erneut zentrifugieren
6. Pellet in 2,5ml SMMP resuspendieren und in neues 50ml-Greiner-Spitzbodenröhrchen verbringen

7. 250µl einer frisch angesetzten Lysozymlösung (100mg Lysozym/ml 2xSMM) zum resuspendierten Bakterienpellet geben
8. Gesamtansatz 12-22 Stunden im 37°C-Brutschrank inkubieren
9. Währenddessen Proben des Ansatzes unter dem Mikroskop beurteilen (Die normalerweise stäbchenförmigen Listerien sollen nach enzymatischer Entfernung der Mureinschicht eine sphäroide Form angenommen haben.)
10. Protoplasten 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
11. Überstand entfernen, Pellet in 10ml frischem SMMP resuspendieren und zentrifugieren (5000 rpm; 10 min).
12. Pellet in 2,5ml frischem SMMP aufnehmen und in Eppendorf-Gefriergefäße zu 300µl aliquotieren
13. Aliquots in Flüssigstickstoff tiefrieren und bei -80°C aufbewahren.

3.6 Transformation von Bakterien

3.6.1 Plasmid-Transformation in ultrakompetente *E.coli*

In die vorbereiteten ultrakompetenten *E.coli* können Fremdgene transformiert werden. Hierzu wird die Hitzeschocktransformation angewandt (Hannahan et al.,1991). Durch die rasche Erhitzung dehnen sich die *E.coli* etwas aus, so dass durch die permeabilisierte Zellmembran Plasmid-DNA-Anteile passiv nach intrazellulär gelangen. Folgendes Vorgehen:

1. 100µl der kompetenten *E.coli* mit 500-1000ng DNA mischen und 30 min auf Eis belassen
2. Ansatz exakt 1,5 min in 42°C-Wasserbad stellen
3. 2 min Inkubation auf Eis
4. 400µl SOC-Medium zum Ansatz geben
5. Regeneration der *E.coli* bei 30-37°C für 1-3 Stunden (Die Dauer der Inkubation ist abhängig von der kodierten Antibiotikum-Resistenz. Die Ampicillin-Resistenz ist z.B. schneller hergestellt als Erythromycin-Resistenz.)
6. Kultur auf entsprechenden Antibiotikumagarplatten ausstreichen und bei 37°C inkubieren
7. Identifizierung fremdgetragender Klone durch PCR oder Kontrollrestriktionsverdau.

3.6.2 Plasmid-Transformation in Protoplasten von *Listeria monocytogenes*

Die Transformation von Plasmiden in die vorbereiteten *L.monocytogenes*-Protoplasten wird nach dem Protokoll von Wuenscher et al.,1991 vorgenommen:

1. 300µl Protoplasten je Transformationsansatz in 15ml-Greiner-Röhrchen pipettieren
2. Ansatz mit 500-1000ng zu transformierendem Plasmid vorsichtig mischen
3. 2ml Fusogen dazu geben, Ansatz per Hand 1 min kreisförmig schwenken und 1 min inkubieren
4. 7ml frisches SMMP dazugeben und Ansatz 5x sanft invertieren
5. Zentrifugation (5000 rpm; 20 min)
6. Überstand entfernen und Protoplastenpellet in 1ml SMMP resuspendieren
7. Ansatz 3 Stunden im 30°C-Wasserbad kultivieren (bakterielle Zellwand wird rekonstruiert)
8. Je 333µl der Kultur auf vorgetrockneter DM3-Regenerationsplatte austreichen und 4-8 Tage im 30°C-Brutschrank kultivieren
9. Identifizierung positiver Transformanten durch Plasmidisolierung mit anschließendem Kontrollverdau, PCR oder Teilsequenzierung.

3.7 Konstruktion von Plasmidvektoren

3.7.1 Anforderungen an Reporter-genplasmidvektoren

In dieser Arbeit kommen Plasmidvektoren von *L.monocytogenes* für den Transfer von Genmaterial in humane Zellen zur Anwendung. Die Plasmide und die genutzten Bakterien müssen zunächst erst konstruiert bzw. vorbereitet werden. Für die Experimente mit den Plasmidvorstufen werden ultrakompetente DH10-*E.coli* verwendet, hiermit lassen sich relativ schnell und einfach größere Mengen Plasmid-DNA zur Weiterverarbeitung gewinnen. Die funktionstüchtigen Reporter-genplasmide werden anschließend in Protoplasten von *L.monocytogenes* transformiert.

Es soll unter anderem nachgewiesen werden, ob ein Fremdgentransfer in humane Zellen von Listeria-Vektoren prinzipiell zu gewährleisten ist. Die Vektoren werden daher jeweils mit Genen transformiert, deren Genprodukte sich optisch nachweisen („reportieren“) lassen. Als Reporter-gen wurde in dieser Arbeit zum einen die kodierende Sequenz der β -Galaktosidase

aus *E.coli* gewählt. Das Enzym setzt eine Farbstoffvorstufe um und markiert fremdproteintragende Wirtszellen blau. Zum anderen wurde ein Abkömmling des *green fluorescent protein (GFP)* aus *Aequora victoria* als Reporter gen eingesetzt. Wirtszellen, die *GFP* translatieren, zeigen eine Grünfluoreszenz mit charakteristischem Spektrum. Für den Einsatz als Reporter gen in humanen Zellen wurde *GFP* durch Austausch bestimmter Aminosäuren optimiert (*enhanced green fluorescent protein; EGFP*). Das Fremdprotein EGFP hat eine höhere Fluoreszenzleistung als natives GFP.

Die Reporter gene müssen in ein geeignetes Basisplasmid eingefügt werden. Dieses muß neben Genen, welche die Transkription des Reporter gens steuern auch die zur Vervielfachung und Selektion des Plasmides in Bakterien nötigen Gene besitzen. Zur effizienten Transkription des Plasmides im Bakterium bzw. des Reporter gens in der Wirtszelle werden zusätzlich mindestens benötigt:

1. ein eukaryoter Promotor zum Starten der Reporter gen-Transkription in der Wirtszelle
2. eine mRNA-Splicing-Region im Reporter gen
3. eine Polyadenylierungssequenz am Ende des Reporter gens
4. ausreichend Schnittstellen für Restriktionsenzyme (um einzelne Genabschnitte variabel aus dem Plasmid entfernen bzw. in das Plasmid einsetzen zu können)
5. ein spezifischer bakterieller Replikationsursprung (sogenanntes ori) und
6. mindestens eine Antibiotikumresistenz (obligat für die Selektion in Bakterien; fakultativ auch für die Selektion fremdgentragender Wirtszellen).

Idealerweise können die als Vektor genutzten Bakterien das Reporter gen nicht selbst in das wirksame Genprodukt umsetzen und die humanen Zellen sind nicht in der Lage, anderes als das Reporter genmaterial zu translatieren. Dies kann unter anderem durch den Einsatz spezifischer Promotoren gewährleistet werden. Bakterielle Promotoren können in humanen Wirtszellen keine Transkription initiieren, die meisten der humanwirksamen Promotoren können aber auch von Bakterien abgelesen werden. Desweiteren ist durch gegenläufige Orientierung von Bakteriengenom und inseriertem Reporter gen eine spezifische Transkription/Translation realisierbar. Das Bakterium liest dann, entsprechend seinem Replikationsursprung, die Reporter genkassette in Minusstrang-Richtung ab und es entsteht kein funktionierendes Reporterprotein. Die humanen Zellen beginnen die Transkription am humanwirksamen Promotor und terminieren nach der Poly-A-Sequenz. Dahinter liegendes

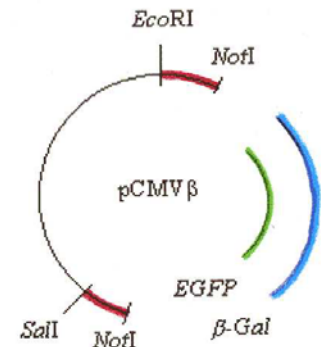
bakterielles Genom würde von der Wirtszelle, wenn überhaupt, dann in „falscher Richtung“ abgelesen werden, so daß keine funktionellen bakteriellen Proteine entstünden.

3.7.2 Plasmidklonierungsstrategie

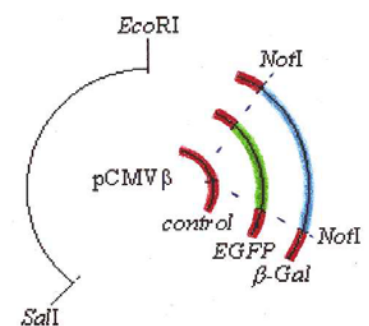
Ein Ziel dieser Arbeit ist die Konstruktion von Reporterplasmiden, die von *L.monocytogenes* in humane Glioblastomzellen transferiert werden können. Die Transferplasmide sollen β -Galaktosidase und EGFP enthalten, die aus den käuflichen Klonierungsvektoren pCMV β und pEGFP-1 isoliert werden. Die Reportergene müssen zunächst in *E.coli*-Plasmide ligiert werden, um multiple Plasmidkopien zur molekularbiologischen Bearbeitung (Restriktionsverdau, Ligationsreaktionen, PCR) zu gewinnen. Letztlich müssen die Reporterengassetten aber in einen für Listerien geeigneten Plasmidvektor überführt werden. Listerien beherbergen unter Nativbedingungen keine Plasmide. Daher wurde die Ring-DNA mit einem in grampositiven Bakterien unspezifisch wirksamen Replikationsursprung einer *Streptococcus spp.* versehen, der auch von *L.monocytogenes* genutzt werden kann.

Unter Berücksichtigung der im Kapitel 3.7.1 aufgeführten Mindestanforderungen an Plasmidvektoren ist folgende Klonierungsstrategie (in Tabelle 4 schematisch dargestellt) entwickelt worden:

Als Basis dient das Plasmid pCMV β , aus dem über die flankierenden *NotI*-Schnittstellen das β -Galactosidase-Gen herausgetrennt wurde. Nach Entfernung des Gens wird das entstehende Basisplasmid pCS2a zunächst über die komplementären *NotI*-Stellen ligiert, kann aber durch einen *NotI*-Restriktionsverdau geöffnet und mit einem Reporter gen ligiert werden. Hierdurch entstehen die Ausgangsplasmide pCS1a mit β -Galactosidase (entspricht pCMV β) und pCS3a mit *EGFP*.

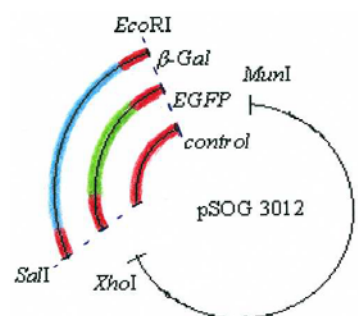


Durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* wird aus den Ausgangsplasmiden jeweils die sogenannte Reporter genkassette ausgeschnitten. Jede Kassette enthält den in humanen Zellen aktiven Promotor $P_{CMV\ IE}$ (aus Cytomegalievirus), eine Splice-Donor/Splice-Acceptor-Sequenz SV40-SD/SA (aus Simian-Virus 40; [die Region unterstützt den m-RNA-Splicing-Prozeß]) und eine Polyadenylierungssequenz SV40-polyA (aus Simian-Virus 40).

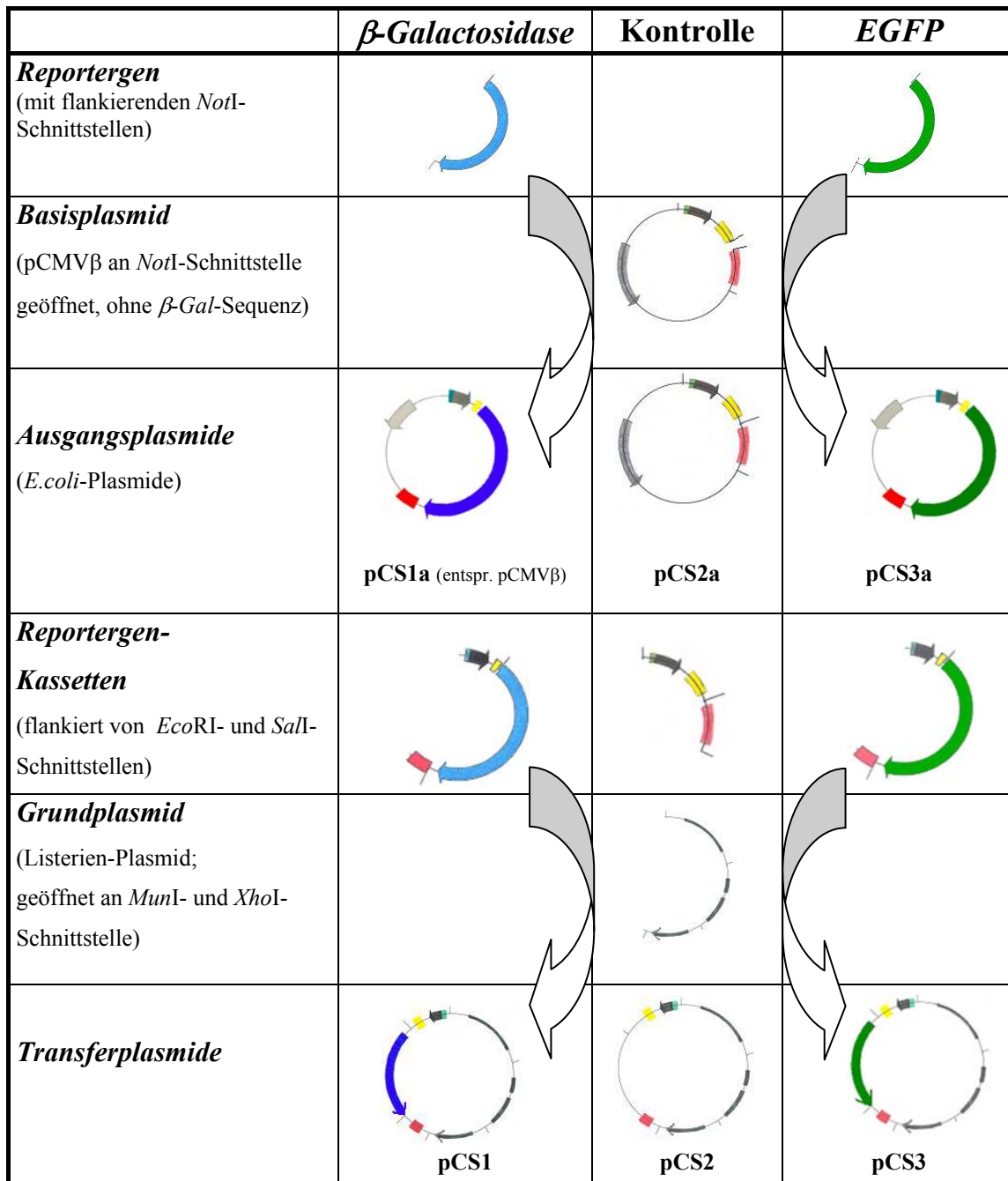


Zwischen der SV40-SD/SA-Sequenz und der SV40-polyA-Region befinden sich die Reporter gene bzw. die singuläre *NotI*-Schnittstelle im Basisplasmid pCS2a, dessen Sequenz zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *SalI* als Kontrolle dient.

Die Reporter genkassetten werden in den für *Listeria spp.* geeigneten Grundvektor pSOG 3012 ligiert. Hierzu wird eine Plasmidöffnung an der *MunI*- und *XhoI*-Schnittstelle dieses Plasmides vorgenommen. Die Schnittstellensequenzen von *MunI* und *EcoRI* sowie von *XhoI* und *SalI* sind komplementär zueinander (s. Tabelle im Anhang), weshalb durch eine Ligationsreaktion die jeweilige Reporter genkassette (entgegengesetzt zur Orientierung der bakteriellen Gene) in den Grundvektor pSOG 3012 gebunden werden kann (sticky end ligation). Ergebnis dieser Ligation sind die Transferplasmide, welche in *L.monocytogenes* transformiert werden, die dann als Transfervektoren dienen.



Die dezidierte Beschreibung der molekularbiologischen Arbeitsschritte zur Herstellung der einzelnen Plasmide wird in den Folgekapiteln vorgenommen.



Tab.4 Schematische Darstellung der Plasmidklonierungsstrategie
(Blockpfeile markieren die Ligationsschritte der Klonierung)

Zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation kann neben einem Restriktionsverdau auch die PCR angewendet werden. Als PCR-Primer sind geeignete Sequenzanteile 120 bis 140 Basenpaare jeweils ober- und unterhalb der reportergenflankierenden *NotI*-sites gesucht worden. Der CMV β 5'-Primer entspricht der Basensequenz 635-652 und der CMV β 3'-Primer ist komplementär zu den Basen 4408-4427 des Plasmides pCMV β :

CMV β 5'-Primer: 5' - CGG TAC TCG AGG AAC TGA-3

CMV β 3'-Primer: 3' - CAT TGG TAA TAT TCG ACG TT-5'

Durch die Amplifikation entstehen Fragmente mit jeweils charakteristischer Länge für die β -*Galactosidase*-, *EGFP*- und Kontrollplasmide (siehe Kapitel 4.2.1 - 4.2.4).

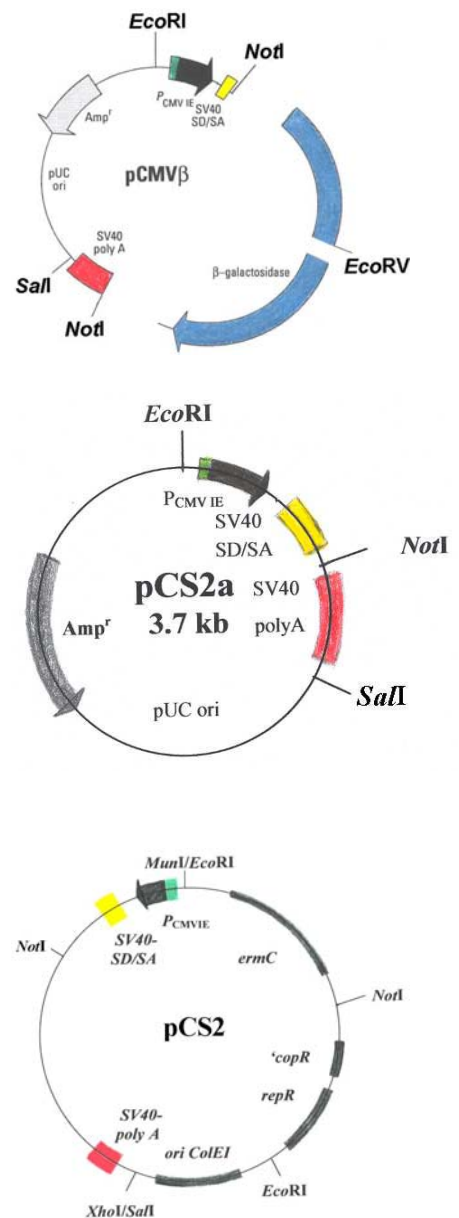
3.7.3 Herstellung des Basisplasmids pCS2a und des Kontrolltransferplasmids pCS2

Die Auswirkungen der Plasmidexpression auf die Wirtszellen, wenn ein Reporter gen fehlt, das restliche genetische Material des Vektors aber intakt ist, wird durch den Einsatz eines Kontrollvektors untersucht.

Zunächst wird aus dem Klonierungsvektor pCMV β das Reporter gen β -Galaktosidase über die flankierenden *NotI*-Schnittstellen entfernt und zusätzlich durch *EcoRV* etwa mittig gespalten, um eine spätere Religation mit dem Restplasmid zu erschweren. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wird das linearisierte Plasmid über die *NotI*-Schnittstellen jeweils am Ende des Plasmidgerüsts (sogenanntes backbone) religiert. Nach der Ligation wird der Ansatz in ultrakompetente *E.coli* transformiert. Plasmid-positive Klone werden identifiziert, konserviert und das Plasmid wird isoliert und *NotI*-kontrollverdaut. Das entstandene Basisplasmid pCS2a ist nicht nur zur Herstellung des Kontrollvektors geeignet. Durch Öffnung der singulären *NotI*-Schnittstelle im Plasmid kann dem CMV-Promotor jedes beliebige Gen nachgeschaltet werden.

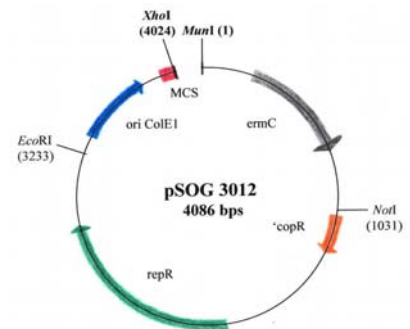
Bei Verdau von pCS2a mit *EcoRI* und *SalI* werden der CMV-Promotor, die SV40-SD/SA-Region und das SV40 poly-A-Signal herausgetrennt. Das Fragment wird nach Aufreinigung in das über die *MunI*- und *XhoI*-Schnittstellen geöffnete Grundplasmid pSOG 3012 ligiert. Es entsteht das Kontrollplasmid pCS2. Der Ansatz wird in ultrakompetente *E.coli* transformiert, positive Klone werden durch PCR identifiziert, und das Plasmid pCS2 wird isoliert und *NotI*-kontrollverdaut.

Danach kann pCS2 in Protoplasten von *L.monocytogenes* transformiert werden. Korrekt plasmidtragende Klone werden glycerinkonserviert.

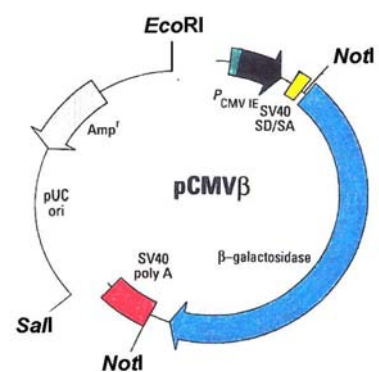


3.7.4 Herstellung des Transferplasmids pCS1

Die Plasmide pSOG 3012 und pCMV β werden aus *E. coli* isoliert und mit dem Enzym *NotI* kontrollverdaut. Um pSOG 3012 für die Insertion der Reportergene zu öffnen, wird es präparativ mit den Enzymen *MunI* und *XhoI* verdaut. Hierfür befinden sich jeweils singuläre Schnittstellen in der multiple cloning site (MCS) des Plasmids pSOG 3012 (*MunI* [1]; *XhoI* [4024]). Dadurch wird das Plasmid linearisiert und ein Fragment von 62bp aus der MCS herausgetrennt.

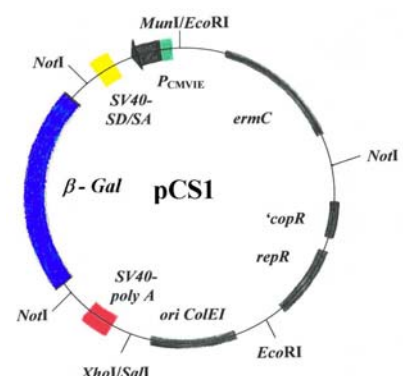


Das Plasmid pCMV β wird mit den Enzymen *EcoRI* (1) und *Sall* (4445) verdaut. Hierdurch wird das Plasmid in zwei Teile geteilt: 1.) die Reportergenkassette und 2.) das Restplasmid. In der Reportergenkassette befinden sich der CMV-Promotor (P_{CMVIE}), die SV40 splice-donor/splice-acceptor-Region (*SV40-SD/SA*) und das β -Galaktosidasegen, welches von einer SV40-Polyadenylationssequenz (*SV40-poly A*) gefolgt wird.



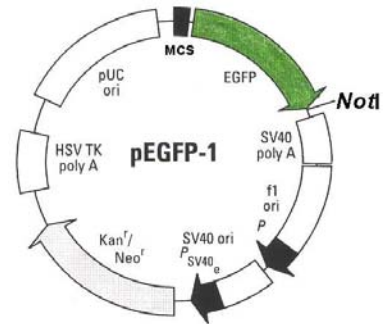
Das Reportergen entspricht dem β -Galaktosidasegen (3144bp) von *E. coli* in eukaryotem mRNA-code. Das Restplasmid enthält den Replikationsursprung für *E. coli* (*pUC ori*) sowie das Ampicillinresistenzgen (*Amp^r*).

Zum Aufreinigen beider Verdauansätze wird jeweils eine Phenol-Chloroform-Extraktion angeschlossen, der pCMV β -Ansatz wird zusätzlich dephosphoryliert. Danach werden beide Ansätze linearisierter Plasmidteile ligiert. Die Schnittstellen von *MunI* und *EcoRI* sowie von *XhoI* und *Sall* sind einander komplementär, weshalb die Reportergenkassette in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung zum Grundvektor pSOG 3012 eingebunden wird (sticky end ligation). Der Ligationsansatz wird in ultrakompetente *E. coli* transformiert. Klone, die das korrekte Plasmid tragen, werden durch PCR identifiziert. Das Plasmid pCS1 wird isoliert, mit *NotI* kontrollverdaut und in Protoplasten von *L. monocytogenes* transformiert. Von korrekt plasmidtragenden Klonen werden Glycerinkonserven angefertigt.



3.7.5 Amplifizierung von *EGFP* und Herstellung des Transferplasmids pCS3

Das käufliche Plasmid pEGFP-1 wird aus *E.coli* isoliert und *NotI*-kontrollverdaut. Nur am 3'-Ende des Gens findet sich eine *NotI*-Schnittstelle. Die *EGFP*-Squenz kann demzufolge nicht ohne weiteres in das Basisplasmid pCS2a eingefügt werden. Um eine entsprechende Schnittstellensequenz in das Gen zu inserieren, wird eine PCR-Insertionsmutagenese angewandt (Schema siehe Abb.4). Das Vorgehen entspricht prinzipiell einer normalen PCR. Durch spezielle Konstruktion der Primerbasenfolge können jedoch bestimmte gewünschte Basenabschnitte, zum Beispiel Schnittstellensequenzen, zusätzlich in das PCR-Produkt eingesetzt werden (Newton und Graham,1994).



Der Primer zur Bindung am 5'-Ende des *EGFP* enthält die Sequenz der *NotI*-Schnittstelle und stellt diese bei Amplifizierung dann dem Reportergen voran. Auch der 3'-Primer enthält die *NotI*-Sequenz, diese deckt aber lediglich die bereits bestehende *NotI*-Schnittstelle am Ende des Reportergens ab. Folgendes Primerpaar wird zur Amplifizierung verwendet:

EGFP 5'-Primer: 5'-CAT GTT CAT TT **G CGG CCG** CAT GGT GAG CAA GGG CGA GG-3'

EGFP 3'-Primer: 3'-GAT CTA GAG TCG **CGG CCG** CTT TAC TTG TAC AGC TCG TC-5'

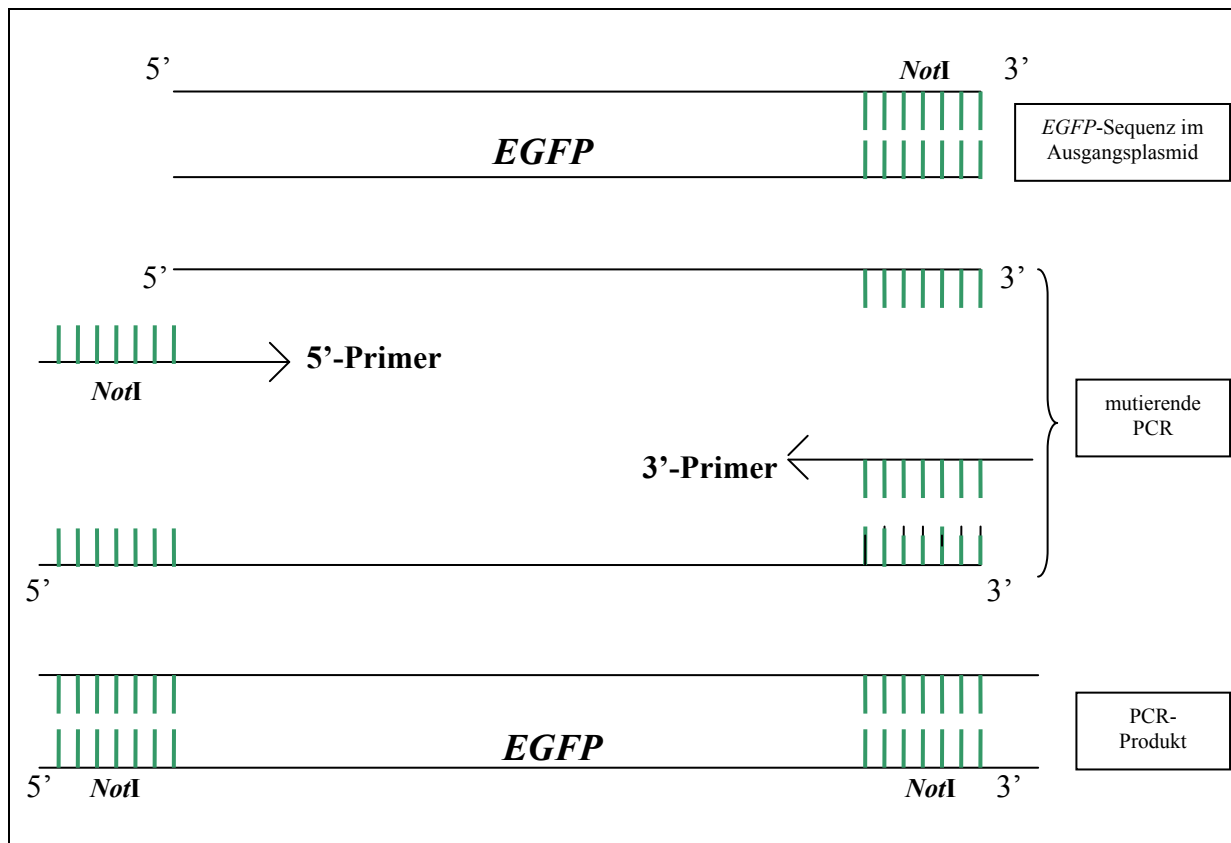


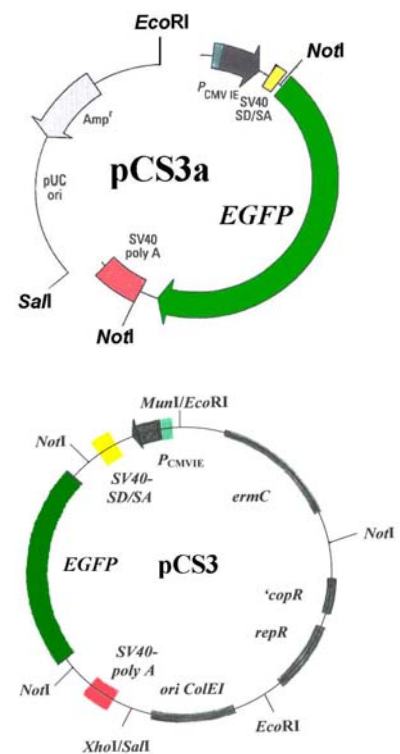
Abb. 3 Schematische Darstellung der *EGFP*-Amplifizierung

Um die *EGFP* flankierenden *NotI*-Schnittstellen freizulegen, wird das aufgereinigte PCR-Produkt mit *NotI* verdaut und phenolextrahiert. Das Fluoreszenzreportergen kann nun in das, ebenfalls mit *NotI* verdaute, Basisplasmid pCS2a ligiert werden. Durch die Ligation des phenolextrahierten und dephosphorylierten pCS2a-Ansatzes mit dem aufgereinigten EGFP entsteht ein neues Transferplasmid, pCS3a. Nach der Ligation erfolgt die Transformation des Ansatzes in ultrakompetente *E.coli*.

Da es sich bei der Insertion des *EGFP* in pCS2a um eine sticky end ligation in identische Schnittstellen handelt, ist eine Prüfung der korrekten Orientierung des Reportergens im Plasmid notwendig, weil das Gen auch in falscher Richtung eingebaut worden sein kann. Die Kontrolle ist durch eine PCR mit Primern, die nur korrekt orientiert eingesetztes EGFP amplifizieren, gewährleistet. Prinzipiell kann auch ein asymmetrischer Restriktionsverdau des Plasmides durchgeführt werden, wobei aber mit der PCR im Vergleich dazu erheblich mehr fragliche Klone ohne zusätzliche Plasmidisolierung überprüft werden können.

Um die *EGFP*-Reportergenkassette aus pCS3a in das für Listerien geeignete Grundplasmid pSOG 3012 inserieren zu können, wird zunächst das Plasmid pCS3a aus *E.coli* isoliert und mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut. Dadurch wird die Reportergenkassette vom restlichen Plasmid abgeschnitten.

Das Fragment wird dann in das mit *MunI* und *XhoI* geöffnete Plasmid pSOG 3012 ligiert. Nach dem Ligationsassay wird der Ansatz in ultrakompetente *E.coli* transformiert. Positive Klone werden via PCR identifiziert, das Plasmid pCS3 isoliert und kontrollverdaut. Das korrekte Plasmid wird in Protoplasten von *L.monocytogenes* transformiert. Die Konservierung der Vektoren erfolgt in Glycerinkulturen.



3.8 Gentransferversuche mittels Lipofektion

Für die Testung der Plasmidwirkung auf Säugerzellen *in vitro* wird eine Transfektion mittels Lipofektion durchgeführt. Die isolierten und aufgereinigten Plasmide werden in liposomenartige Strukturen aufgenommen, die mit den wirtszellulären Membranen verschmelzen und so die Plasmide in den Intrazellularraum transportieren können. Hierfür wird der LIPOFECTAMINE-PLUS-kit an Kulturen der humanen Glioblastomzelllinie U87 sowie an Zellen der Rattengliomzelllinie C6 nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt.

Die Zellen werden in Zellkulturschälchen auf Deckgläschen bis zur Semikonfluenz kultiviert. Nach Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Plasmide erfolgt die Lipofektion unter Verwendung des kits. Folgende Plasmide werden getestet: pCMV β , pEGFP-1, pCS1, pCS2a, pCS2, pCS3a und pCS3.

Zur Kontrolle werden das Basisplasmid pCS2a, das Kontrolltransferplasmid pCS2 und ein nicht plasmidtragender Lipofektionsansatz in die Zellen transfiziert. So kann nach der Lipofektion bestimmt werden welche Auswirkungen an der Wirtszelle durch die Liposomen bedingt sind und welche Konsequenz die Transfektion der Plasmidsequenzen ohne Reportergen auf die Wirtszelle hat. Als Positivkontrollen kommen C6*lacZ*-Zellen (Rattengliomzelllinie C6 mit stabil in das zelluläre Genom inserierter β -Galactosidase-Sequenz) zum Einsatz, die sich durch die Nachweisfärbung zu ca. 90% färben lassen.

24-48 Stunden nach der Lipofektion kann die Fremdproteinwirkung in der Wirtszelle durch lacZ-Nachweisfärbung und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

3.9 Gentransferversuche mit transformierten Listerien-Vektoren

3.9.1 Vorbereiten der Bakterienkulturen für Gentransferversuche

1. ÜNK verschiedener *Listeria monocytogenes*-Stämme, welche jeweils das Plasmid pCS1, pCS2 oder pCS3 enthalten sowie des Listerien-Wildtyps anlegen
2. Je 200 μ l jeder ÜNK zu 9,8ml frischem erythromycinhaltigen bzw. antibiotikumfreien BHI-Medium geben
3. bis zur OD₆₀₀ von 0,9-1,1 im 37°C-Rundschüttler kultivieren
4. Je 1ml der Kultur entnehmen und zentrifugieren (8000 rpm; 2min)

5. Überstände entfernen und Bakterien in 1ml frischem antibiotikumfreien Zellkulturmedium resuspendieren
6. Kulturen nochmals zentrifugieren und in frischem Zellkulturmedium resuspendieren.

3.9.2 Vorbereiten der Zellkulturen für Gentransferversuche

1. Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml Kulturmedium anfertigen
2. Je 5ml der Suspension in mit einem Deckgläschen versehene Kulturschälchen (6x15mm) geben
3. Über Nacht bis zur Semikonfluenz im 37°C-Brutschrank züchten
4. Antibiotikumhaltiges Medium aus den Zellpräparaten entfernen
5. Zellen vorsichtig mit PBS waschen
6. Vorgewärmtes antibiotikumfreies Zellkulturmedium hinzufügen
7. Zellen bis zum Transferversuch im 37°C-Brutschrank kultivieren.

3.9.3 Infektion der Säugerzellen in Gentransferversuchen

1. 20µl der vorbereiteten Bakterienkultur in das Medium der präparierten Zellen geben
2. Durch vorsichtiges Schwenken die Bakterien im Schälchen verteilen
3. Inkubation des Ansatzes für 4-8 Stunden bei 37°C (Während dieser Zeit invadieren Listerien die Wirtszellen.)
4. Nach der Infektionszeit bakterienhaltiges Zellkulturmedium entfernen
5. Zellen mit angewärmtem PBS waschen
6. 5ml gentamycinhaltigen Mediums (50µg/ml) zur Zellkultur geben
7. Zellkultur bei 37°C inkubieren (Extrazelluläre befindliche Listerien werden dadurch abgetötet, während intrazelluläre Listerien vom Gentamycin nicht erreicht werden und sich intrazellulär vermehren und ausbreiten können.)
8. Inkubationsdauer kann je nach Viabilität der Wirtszellkultur 1-5 Tage variieren
9. Nach Inkubation Zellkultur mit PBS waschen

10. Zugabe frischen Zellkulturmediums mit Gentamycin (50µg/ml) und Tetracyclin (10µg/ml) (Durch die Zugabe von Tetracyclin werden nun auch intrazelluläre Listerien abgetötet und nach Lyse der bakteriellen Zellwandstrukturen die enthaltenen Plasmide in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Ab diesem Zeitpunkt kann die Wirtszelle das Reportergen über den CMV-Promotor translatieren und exprimieren.)
11. Antibiose für 24 Stunden im 37°C-Brutschrank beibehalten.

3.10 Ergebnisdokumentation nach Gentransferversuchen

3.10.1 lacZ - Nachweisfärbung

Der Nachweis des Fremdgenproduktes β -Galaktosidase erfolgt mittels Färbung der Zellen. Das Enzym β -Galaktosidase setzt ein in der gelblichen Färbelösung enthaltenes Substrat (X-Gal) in ein blau gefärbtes Endprodukt um. Dazu:

1. Zellkulturmedium aus der Kulturschale entfernen
2. 5min Fixierung mit Glutaraldehydlösung (0,125 %) bei Raumtemperatur
3. Fixierlösung entfernen und Paraformaldehydlösung (2%) auf die Zellen pipettieren und bei Raumtemperatur für 4min belassen
4. Paraformaldehydlösung entfernen und Zellen mit 2ml der Waschlösung von Fixiermittelresten befreien
5. Waschlösung 5min bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen, danach entfernen und ein weiteren Waschschrift anschließen
6. Färbelösung aus X-Gal-Lösung und Mixer-Lösung (Verhältnis 1:40) frisch ansetzen
7. Waschlösungsüberstand entfernen und mit der Färbelösung den Zellrasen im Kulturschälchen bedecken
8. Färbeansatz über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubieren (Die Aktivität der β -Galaktosidase kann mitunter bereits nach 15-30min unter herkömmlicher Durchlichtmikroskopie beobachtet werden [Blaufärbung der Zellen bei positivem Ergebnis].)
9. Färbelösung aus dem Kulturschälchen entfernen und Natriumazidlösung (0,02%) zur Stabilisierung der Färbung dazugeben (Die weitere Färbeaktivität im Hintergrund durch Kontamination wird so unterbunden.).

3.10.2 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die mit Zellen bewachsenen und β -Gal-gefärbten Deckgläschen werden mit Elvanol auf Objektträgern fixiert. Die eingebetteten Präparate werden unter Durchlichtmikroskopie betrachtet und mit automatischer Belichtungszeiteinstellung photographiert (Bsp. Abb.5).

Die mit Fluoreszenzgenen transfizierten Zellen werden mit Elvanol auf Objektträgern fixiert, durch einen Fluoreszenzkanal des Mikroskopes betrachtet und automatisch belichtet photographiert (Bsp. Abb.6). Die Intensität der Fluoreszenz wird durch längere Betrachtung im Fluoreszenzkanal oder durch Lagerung abgeschwächt.

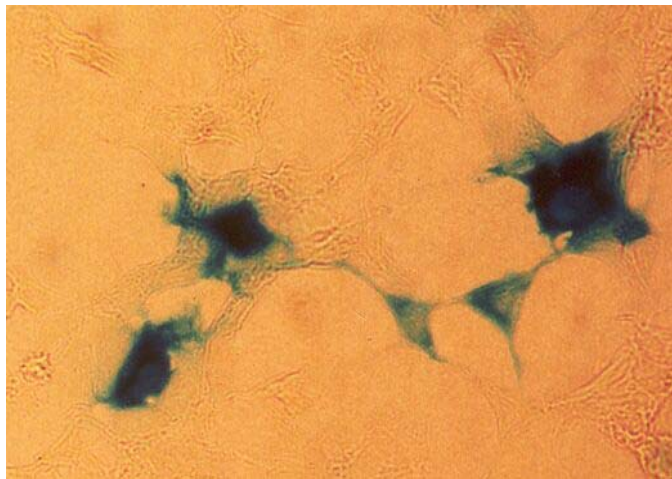


Abb.4 Beispiel eines β -Gal-Assays

(293T-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes* 1/2a+pCS1, Originalvergrößerung 400x)

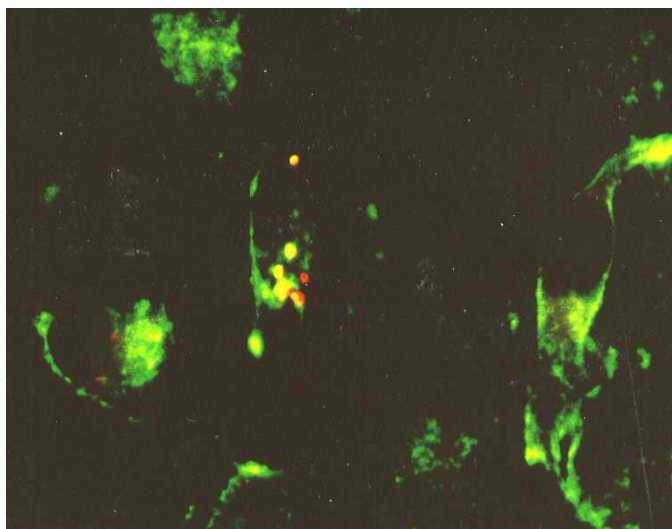


Abb.5 Beispiel der Immunfluoreszenzfärbung

(A172-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes* 1/2a [rot markiert sind adhärierende Listerien, gelb-rot markiert sind invadierte Listerien], Originalvergrößerung 400x)

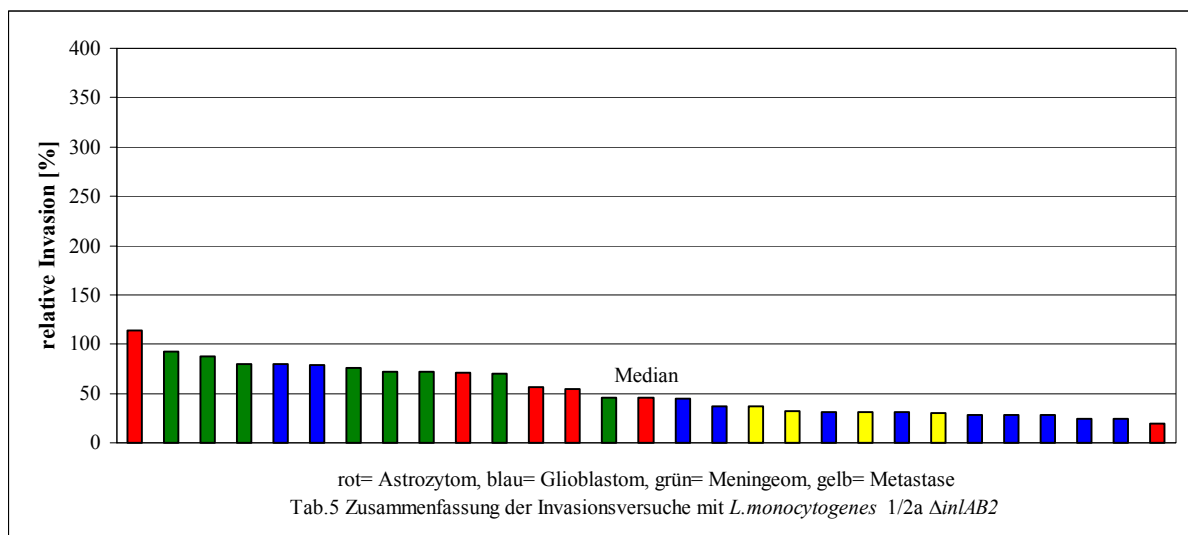
4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Invasionsversuche

Die Diagramme zeigen die relativen Invasionsraten von *L. monocytogenes spp.* in die Zellen von 29 untersuchten Hirntumorkulturen. Die Wildtypinvasion wurde auf 100% festgelegt und die Invasionsraten der anderen 5 untersuchten Listerienstämme wurden darauf bezogen. Es sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung der relativen Invasion aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt worden, auf eine Signifikanztestung wurde verzichtet. Die absoluten und relativen Invasionswerte für jede Zellkultur sind im Anhang zusammengefasst (Tabellen 11 und 12).

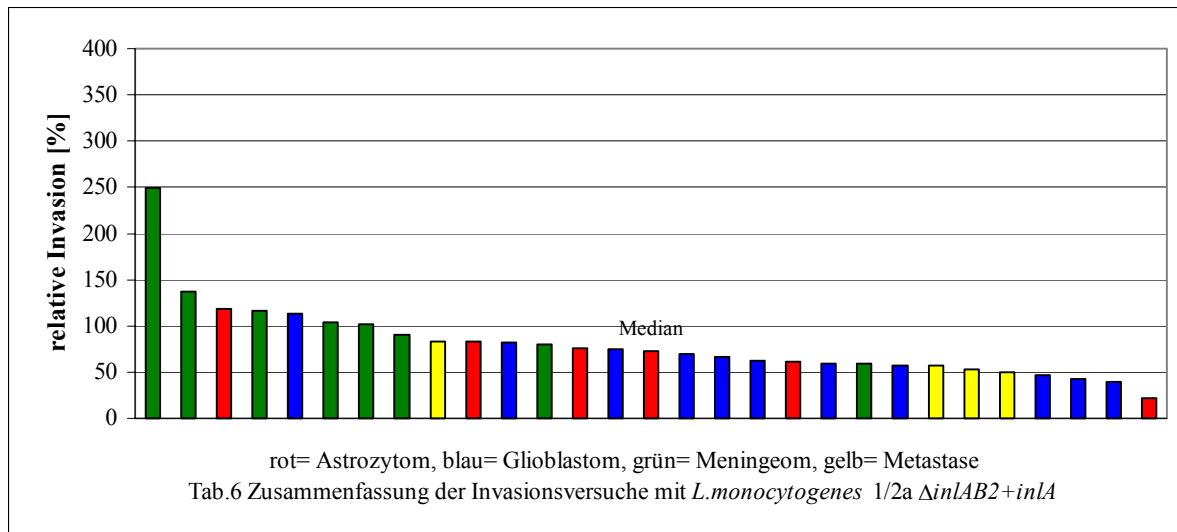
Als Symmetriezentrum der mittleren Invasionswerte wurde der Mittelwerts-Median der relativen Invasion (jeweils Index 15 [bei jeweils 29 Einzelwerten]) auch innerhalb der Tabellen 5-9 kenntlich gemacht, um zu zeigen, wieviele Zelllinien welcher Tumorgruppe Invasionswerte ober- oder unterhalb dieses zentralen Tendenzmaßes erreichten.

Die Auswertung der Invasionsversuche mit dem Deletionsmutationsstamm für die Internalingene A und B *Listeria monocytogenes 1/2a ΔinlAB2* zeigt Tabelle 5:



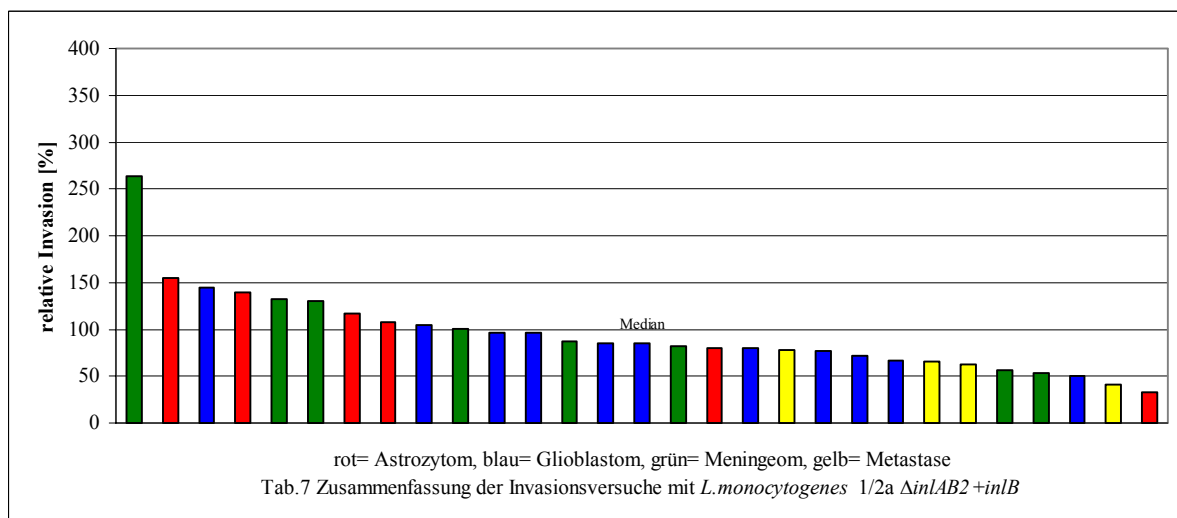
Relative Invasionsraten oberhalb des Medians (45,48%) wurden erreicht in allen untersuchten Meningeomkulturen, 4/6 Astrozytomkulturen, 2/11 Glioblastomkulturen und keiner untersuchten Metastasenkultur.

Für die Invasionsfähigkeit des mit dem *Internalin A*-Gen komplementierten Stammes *Listeria monocytogenes* 1/2a Δ *inlAB2+inlA* ergaben sich folgende Werte (Tabelle 6):



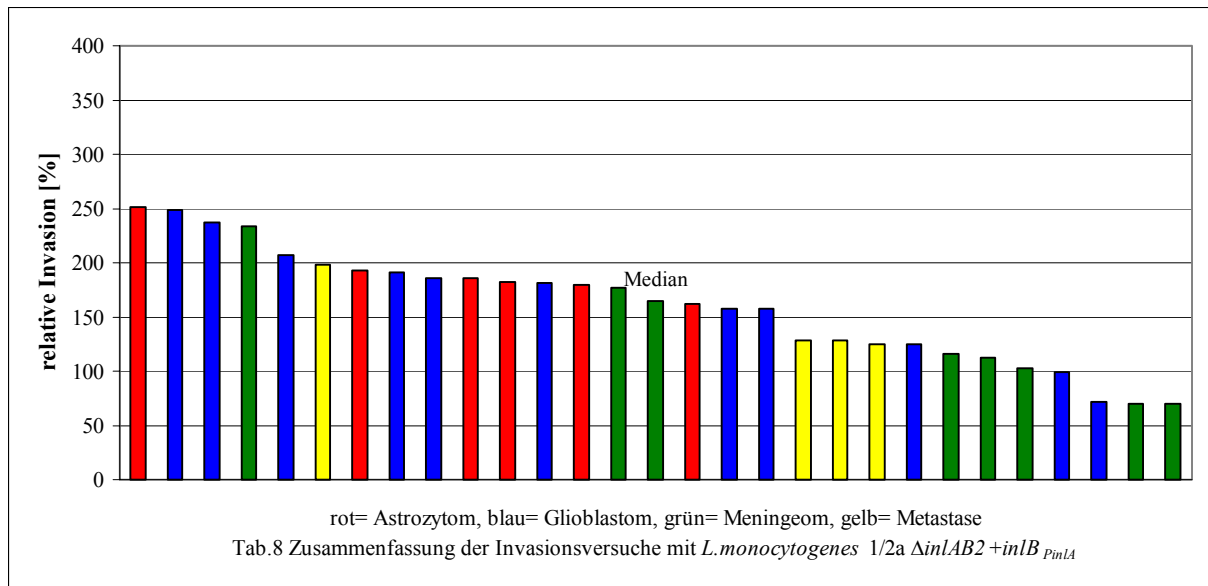
Relative Invasionsraten oberhalb des Medians (73,04%) wurden erreicht in 7/8 Meningeomkulturen, 3/6 Astrozytomkulturen, 3/11 Glioblastomkulturen und 1/4 Metastaskulturen.

Die Invasionsfähigkeit des *inlB*-komplementierten Stammes *Listeria monocytogenes* 1/2a Δ *inlAB2+inlB* war durch folgende Werte gekennzeichnet (Tabelle 7):



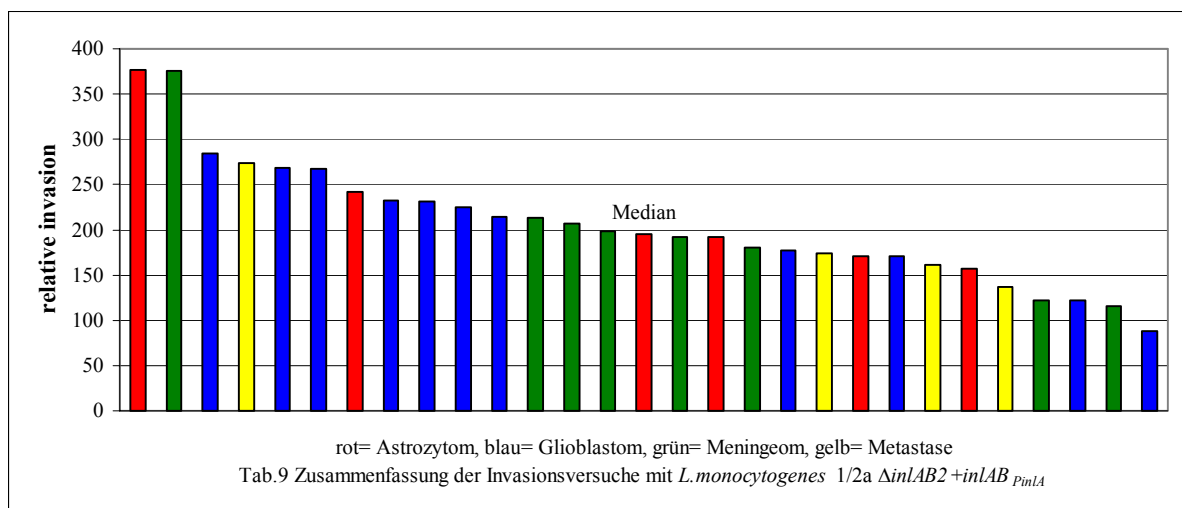
Hier wurden relativen Invasionsraten oberhalb des Medians (84,78%) in 4/6 Astrozytomkulturen, 5/8 Meningeomkulturen, 5/11 Glioblastomkulturen und keiner untersuchten Metastaskultur erreicht.

In Tabelle 8 ist die Auswertung des komplementierten und *inlB*-überexprimierenden Stammes *Listeria monocytogenes* 1/2a $\Delta inlAB2+inlB_{PinlA}$ zusammengefasst.



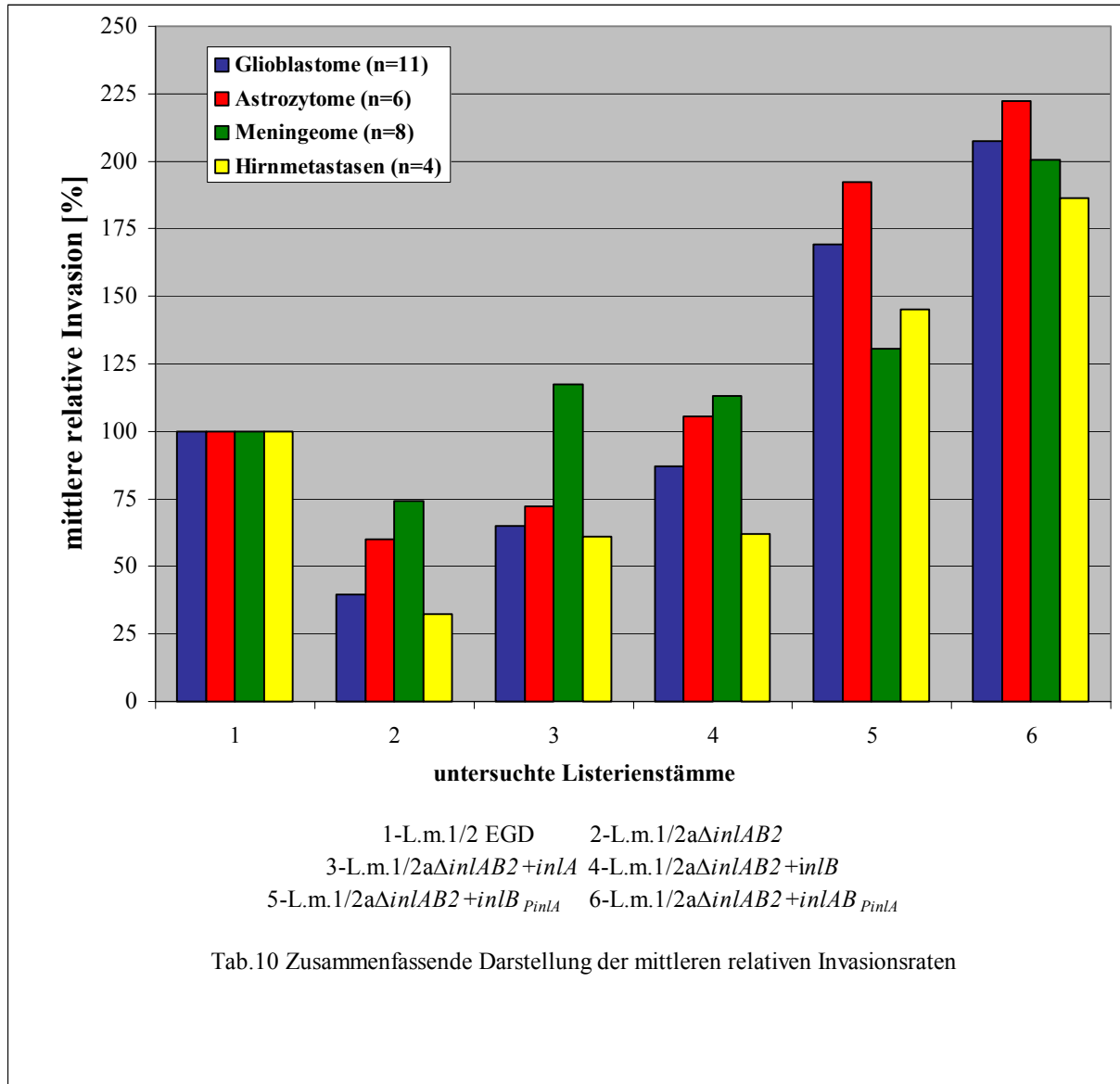
Relative Invasionsraten oberhalb des Medians (164,19%) wurden erreicht in 5/6 Astrozytomkulturen, 6/11 Glioblastomkulturen, 2/8 Meningeomkulturen und 1/4 Metastasenkulturen.

Die Auswertung der Ergebnisse des komplementierten *inlA*- und *inlB*-überexprimierenden Stammes *Listeria monocytogenes* 1/2a $\Delta inlAB2+inlAB_{PinlA}$ ist in Tabelle 9 dargestellt.



Relative Invasionsraten oberhalb des Medians (194,81%) wurden in 7/11 Glioblastomkulturen, 4/8 Meningeomkulturen, 2/6 Astrozytomkulturen und 1/4 Metastasenkulturen erreicht.

Die *zusammenfassende Darstellung der mittleren relativen Invasionsraten* der verschiedenen Listerienstämme in die untersuchten Tumorzellkulturen zeigt die Abhängigkeit der bakteriellen Invasion von den Internalinen A und B (Tabelle10). Eine Signifikanztestung wurde mittels Mann-Whitney-Wilcoxon-Test vorgenommen.



Die chromosomale Deletion des *inLAB*-Operons resultiert in einer relevanten Reduktion der Invasivität dieses Listerienstammes bei allen untersuchten Tumorkulturen.

Unter den **Glioblastomzellen** war der Anstieg der Invasivität durch *inIA*- wie auch durch *inIB*-Komplementation gegenüber dem *inLAB*-Deletionsstamm signifikant ($p < 0,01$). Die Steigerung der Invasivität durch Komplementation von *inIB* anstelle von *inIA* war ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Die Komplementanten mit isolierter Überexpression von *inIB* und kombinierter Überexpression von *inLAB* waren zwar signifikant invasiver als die Stämme ohne

inl-Überexpression oder die Deletionsmutante (jeweils $p < 0,01$), jedoch zeigte sich die stärkere Invasion des kombiniert *inLAB*-überexprimierenden Stammes gegenüber dem isoliert *inlB*-überexprimierenden nicht signifikant.

Für die **Astrozytomzellen** war die mittlere Invasion durch Komplementation von *inlA* ($p=0,2$) oder *inlB* ($p=0,08$) gegenüber dem *inLAB*-Deletionsstamm nicht signifikant, ebenso konnte kein signifikanter Invasionsunterschied zwischen der *inlA*- und *inlB*-Komplementante aufgewiesen werden ($p=0,07$). Der Invasionsunterschied zwischen dem Deletionsstamm und den lediglich *inlA*- und *inlB*-komplementierten Mutanten gegenüber den isoliert *inlB*- und kombiniert *inLAB*-überexprimierenden Stämmen ist in Astrozytomzellen jeweils signifikant ($p < 0,01$). Die höhere Invasion mit dem kombiniert *inLAB*- gegenüber dem isoliert *inlB*-überexprimierenden Stamm ist mit $p=0,6$ nicht signifikant.

Unter den **Meningeomzellen** war die Steigerung der mittleren relativen Invasion gegenüber dem *inLAB*-Deletionsstamm bei *inlA*-Komplementation signifikant ($p=0,02$). Die höheren Invasionswerte bei isolierter *inlB*-Komplementation waren im Vergleich zum Deletionsstamm nicht signifikant ($p=0,12$). Die bei *inlB*- gegenüber *inlA*-Komplementation tendenziell geringere relative Invasionsfähigkeit war nicht signifikant ($p=0,13$). Die mit dem *inlB*-überexprimierenden Stamm erreichte höhere Invasion war lediglich gegenüber der Deletionsmutanten signifikant ($p < 0,01$). Gegenüber den *inlA*- und *inlB*-komplementierten Stämmen brachte die isolierte *inlB*-Überexpression hingegen keine signifikante Steigerung der mittleren Invasion. Durch kombinierte *inLAB*-Überexpression dagegen war eine signifikante Invasionssteigerung gegenüber dem Deletionsstamm und *inlA*- sowie *inlB*-Komplementationsstamm nachweisbar (jeweils $p < 0,01$). Auch zwischen den beiden *inl*-überexprimierenden Stämmen war ein signifikanter Invasionsunterschied aufzeigbar ($p=0,04$).

Bei den **Hirnmetastazenzellen** war der Anstieg der Invasivität durch isolierte *inlA*- und auch *inlB*-Komplementation gegenüber dem *inLAB*-Deletionsstamm signifikant ($p=0,02$). Es konnte aber kein signifikanter Invasionsunterschied zwischen der *inlA*- und *inlB*-Komplementante aufgewiesen werden. Gegenüber dem *inLAB*-deletierten und den lediglich *inlA*- und *inlB*-komplementierten Stämmen war die höhere mittlere Invasion der *inlB*- und *inLAB*-überexprimierenden Stämme signifikant. Zwischen den *inl*-überexprimierenden Stämmen selbst konnte hingegen kein signifikanter Unterschied der mittleren Invasion aufgezeigt werden ($p=0,15$).

Die Einzelergebnisse der **immunfluoreszenzmikroskopisch bestimmten Adhäsion und Invasion** der verschiedenen untersuchten Listerienstämme an bzw. in die unterschiedlichen Tumorgruppen sind in Tabelle 13 und 14 im Anhang dargestellt. Der Anteil fluoreszenzoptisch nachweisbarer Adhäsion von >20/100 Zellen bzw. Invasion >10/100 Zellen für jeden untersuchten Listerienstamm wurde bestimmt.

Innerhalb der Gruppe der **Glioblastome** fanden sich *Adhäsionsraten von >20/100 Zellen* in 4/11 Kulturen bei Verwendung des Wildtypstammes (36,4%). Bei Verwendung des Deletions- sowie *inlA*- und *inlB*-Komplementationsstammes wurde eine Adhäsion >20/100 Zellen nur bei jeweils 1/11 Kulturen beobachtet (je 9,1%). Durch Internalin-Überexpression konnte diese Rate auf 5/11 (45,5% bei *inlB*-Überexpression) bzw. 8/11 Kulturen (72,7% bei kombinierter *inlAB*-Überexpression) gesteigert werden.

Invasionsraten >10/100 Zellen ließen sich bei Verwendung des Wildtypstammes in 3/11 Kulturen nachweisen (27,3%). Bei Verwendung des Deletions- sowie *inlA*- und *inlB*-Komplementationsstammes wurde eine Invasion >10/100 Zellen nur bei jeweils 1/11 Kulturen beobachtet (je 9,1%). Durch Internalin-Überexpression konnte diese Invasionsrate auf 6/11 (% bei isolierter *inlB*-Überexpression) bzw. 8/11 Kulturen (72,7% bei kombinierter *inlAB*-Überexpression) gesteigert werden.

In der Gruppe der **Astrozytome** fanden sich *Adhäsionsraten von >20/100 Zellen* in 2/6 Kulturen bei Verwendung des Wildtypstammes (33,3%). Bei Verwendung des Deletions- und *inlA*-Komplementationsstammes wurde dies in je 1/6 Kulturen gesehen (16,7%). Der *inlB*-Komplementationsstamm erreichte eine Adhäsion >20/100 Zellen in 2/6 Kulturen (33,3%). Durch isolierte *inlB*- und kombinierte *inlAB*-Überexpression konnte diese Adhäsionsrate auf jeweils 3/6 Kulturen (50%) gesteigert werden.

Invasionsraten >10/100 Zellen ließen sich bei Verwendung von Wildtypstamm, Deletions- sowie *inlA*-Komplementationsstamm jeweils in 1/6 Kulturen nachweisen. Der *inlB*-Komplementationsstamm und der isoliert *inlB*-überexprimierende Stamm erreichten jeweils Invasionsraten >10/100 Zellen bei 2/6 Kulturen (je 33,3%). Mit dem *inlAB*-Überexpressionsstamm konnte diese Invasionsrate in 3/6 Kulturen erreicht werden (50%).

Bei den **Meningeomen** fanden sich *Adhäsionsraten von >20/100 Zellen* in 1/8 Kulturen bei Verwendung des Wildtypstammes, des Deletions- sowie *inlA*- und *inlB*-Komplementationsstammes (12,5%). Durch Internalin-Überexpression konnte diese Rate auf

2/8 (25% bei isolierter *inlB*-Überexpression) bzw. 3/8 Kulturen (37,5% bei kombinierter *inlAB*-Überexpression) gesteigert werden.

Invasionsraten >10/100 Zellen ließen sich bei Verwendung von Wildtypstamm, Deletions- sowie *inlA*- und *inlB*-Komplementationsstamm nur bei jeweils 1/8 Kulturen beobachten (je 12,5%). Durch Internalin-Überexpression konnte diese Invasionsrate auf 2/8 (25% bei isolierter *inlB*-Überexpression) bzw. 3/8 Kulturen (37,5% bei kombinierter *inlAB*-Überexpression) gesteigert werden.

Innerhalb der Gruppe der **Hirnmetastasen** fanden sich *Adhäsionsraten* von >20/100 Zellen in keiner Kultur bei Verwendung von Wildtypstamm, Deletions- sowie *inlA*- oder *inlB*-Komplementationsstamm. Auch durch isolierte *inlB*-Überexpression konnte diese Rate nicht verbessert werden. Lediglich bei Verwendung des kombiniert *inlAB*-überexprimierenden Stammes ließ sich eine Adhäsionsrate >20/100 Zellen in 1/4 Kulturen zeigen (25%).

Invasionsraten >10/100 Zellen ließen sich bei Verwendung von keinem der untersuchten Listerienstämme erreichen.

4.2 Ergebnisse der Restriktionsverdau- und PCR-Ansätze

4.2.1 Verdau und PCR der Ausgangsplasmide pCMV β , pEGFP-1 und pSOG 3012

Das Restriktionsenzym *NotI* schneidet aus dem Plasmid pCMV β (7164bp) das *lacZ*-Gen heraus. Hierzu finden sich entsprechende Schnittstellen in den Basenpositionen 819 und 4293. Es entstehen zwei Fragmente. Zum einen die *lacZ*-Gensequenz mit einer Länge von 3454bp und zum anderen der Restvektor mit einer Länge von 3672bp.

Der entsprechende Kontrollverdau von pEGFP-1 erbringt eine Linearisierung des Plasmidvektors, da es nur eine *NotI*-Schnittstelle im Plasmid gibt. Diese befindet sich an der Position 820. Die Gesamtlänge des linearisierten Plasmides beträgt 4151bp.

Auch der *NotI*-Kontrollverdau des Plasmides pSOG 3012 erbringt eine Linearisierung des Plasmides, da es nur eine *NotI*-Schnittstelle, hier an der Position 1031, gibt. Die Gesamtlänge des linearisierten Plasmides beträgt 4086bp.

Zusätzlich zum Kontrollverdau wird mit pCMV β und pEGFP-1 eine Kontroll-PCR durchgeführt. Die Amplifizierung des *lacZ*-Genes aus pCMV β ergibt ein Amplikon von 3714bp Länge. Die PCR des Plasmides pEGFP-1 ergibt ein Produkt von 760bp, das auch für die weitere Präparation des *EGFP-1*-Genes genutzt wird.

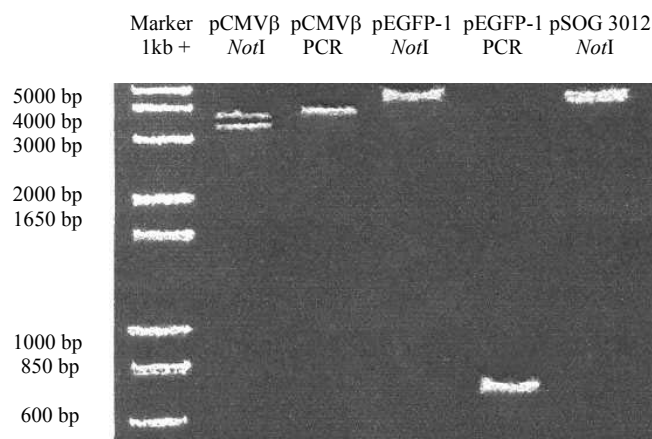


Abb. 6 Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Kontrollverdauansätzen der Ausgangsplasmide

4.2.2 Kontrollverdau und PCR des Basisplasmides pCS2a sowie von pCS3a

Der Kontrollverdau des Plasmides pCS2a mit *NotI* ergibt eine Linearisierung des Basisplasmides. Die Fragmentlänge entspricht der Gesamtlänge des Vektors, 3672bp. Die Kontroll-PCR mit den 3'/5'-CMV β -Primern, die ober- und unterhalb der *NotI*-Schnittstelle binden, ergibt ein Produkt mit einer Länge von 280bp.

Der *NotI*-Kontrollverdau des Plasmides pCS3a (4403bp) ergibt zwei Fragmente. Zum einen die *EGFP*-kodierende Sequenz mit einer Länge von 731bp, zum anderen den linearisierten Basisplasmidvektor pCS2a mit einer Länge von 3672bp. Da der *NotI*-Verdau des Ligationsproduktes keinen Aufschluß über die Orientierung der *EGFP*-kodierenden Sequenz innerhalb des Basisplasmides gibt, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Mit der Kombination von *EGFP*-5'- und CMV β -3'-Primern können ausschließlich die korrekt orientierten Genabschnitte amplifiziert werden. Das entsprechende Amplikon hat eine Länge von 870bp.

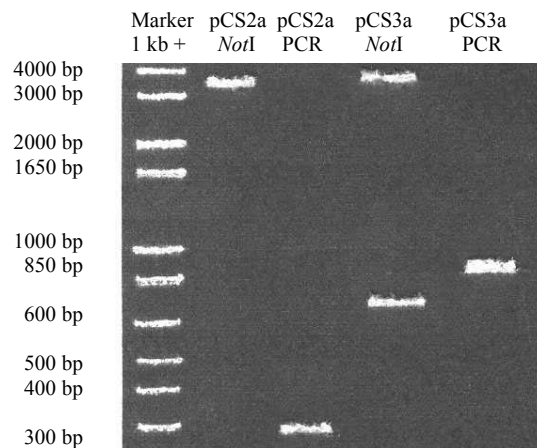


Abb. 7 Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Kontrollverdauansätzen der Plasmide pCS2a und pCS3a

4.2.3 Präparativer Verdau von pCMV β , pCS2a, pCS3a und pSOG 3012

Die Reportersequenzen aus pCMV β , pCS2a und pCS3a werden in den Plasmidvektor pSOG 3012 überführt, der einen in grampositiven Bakterien unspezifisch wirksamen Replikationsursprung aus *Streptococcus agalactiae* enthält. So können diese Vektoren von *Listeria ssp.* abgelesen werden.

Die Plasmide pCMV β , pCS2a und pCS3a werden präparativ mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut. Durch diesen Verdau werden die reportergetragenden Sequenzen bestehend aus CMV-Promotor, SV40 SD/SA-Region, dem Reportergen sowie der SV40-polyA-Region herausgetrennt. Dieses Fragment ist für das jeweilige Plasmid von unterschiedlicher Länge. Von identischer Länge für die genannten Plasmide ist der verbleibende Restvektor, der den Replikationsursprung für *E.coli* sowie das Ampicillinresistenzgen enthält (2650bp).

Für pCMV β befindet sich in der reportergetragenden Kassette das *lacZ*-Gen. Das *EcoRI/SalI*-verdaute Fragment hat eine Länge von 4514bp. Im Plasmid pCS2a befindet sich neben der Promotor-, der SD/SA- sowie der polyA-Region kein Reportergen, sondern lediglich die Sequenzen ober- und unterhalb der singulären *NotI*-Schnittstelle. Der *EcoRI/SalI*-Verdau zeigt ein Fragment von 1022bp Länge. Der *EcoRI/SalI*-Verdau mit dem Plasmid pCS3a erbringt neben dem Restfragment den *EGFP*-tragenden Abschnitt mit einer Länge von 1753bp.

Um die genkassettentragenden Fragmente in den für Listerien geeigneten Vektor pSOG 3012 (4086bp) übertragen zu können, muß dieser ebenfalls präparativ doppelverdaut werden. Hierzu werden die Enzyme *MunI* und *XhoI* verwendet. *MunI* schneidet an Position 1 des Plasmides und *XhoI* an Position 4024. Das Plasmid wird mit einem Verlust von 62 Basen aus der MCS linearisiert.

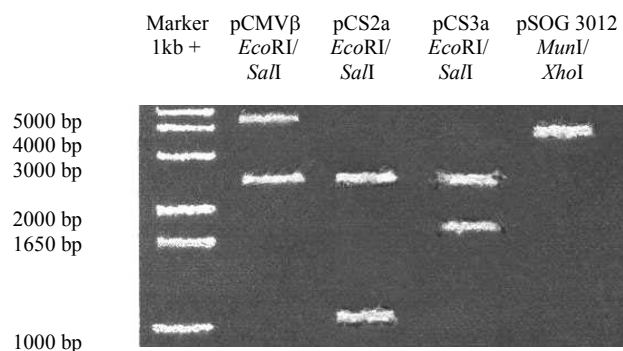


Abb. 8 Gelelektrophorese der präparativen Restriktionsverdauansätze

4.2.4 Kontrollverdau und PCR von pCS1, pCS2 und pCS3

Die Ligation von pSOG 3012 mit der *lacZ*-Gen tragenden Kasette ergibt den Vektor pCS1 (8538bp). Die Kontroll-PCR ergibt ein Fragment von 3752bp. Ein *NotI*-Kontrollverdau ergibt drei Fragmente mit einer jeweiligen Länge von 3492, 3196 und 1850bp.

Der Einbau der kontrollplasmidtragenden Kasette aus pCS2a in pSOG 3012 ergibt das Plasmid pCS2 (5046bp). Die Kontroll-PCR mit den 3'/5'-CMV β -Primern erbringt ein Fragment von 280bp Länge. Ein Kontrollverdau mit *NotI* zeigt zwei Fragmente. Das größere mit einer Länge von 3196bp und das kleinere mit 1850bp.

Die Übertragung der *EGFP*-kodierenden Kasette aus pCS3a in pSOG 3012 ergibt das Plasmid pCS3 (5777bp). Die Kontroll-PCR mit der Primerkombination EGFP-5' und CMV β -3' zeigt ein Fragment von 870bp Länge. Ein Kontrollverdau mit *NotI* zeigt 3 Fragmente auf. Das größere hat eine Länge von 3196bp, das mittlere eine Länge von 1850bp und das kleinere eine Länge von 731bp.

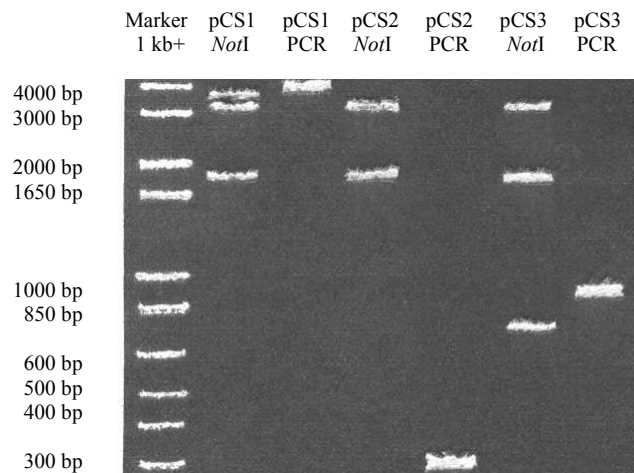


Abb. 9 Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Kontrollverdauansätze der endgültigen Vektoren

4.3 Ergebnisse der Gentransferversuche mittels Lipofektion

4.3.1 Transfektion von pCMV β und pCS1 in U87

Die Aktivität der Reportergene in den neu konstruierten Plasmidvektoren und deren Vorstufen wurde in Transfektionsversuchen überprüft. Zur Transfektion wurden Zellen der humanen Glioblastomlinie U87 benutzt. Als Transfektionsverfahren diente die Lipofektion unter Zuhilfenahme des LipofectAmin plus Kits.

Die Transfektion der Plasmide pCMV β und pCS1 resultierte nach durchgeführter *lacZ*-Färbung in einer deutlichen Blaufärbung von Zellen. Der Anteil transfizierter Zellen betrug für die Lipofektion von pCMV β etwa 60% und für die Lipofektion von pCS1 etwa 40%.

Als Negativkontrollen für die pCMV β -Transfektion wurden die Kontrollplasmide pCS2a und pCS2 eingesetzt, daneben wurden native Zellen untersucht. Entsprechend bearbeitete Zellen ließen sich nicht blau anfärben.

Als Positivkontrolle der *lacZ*-Färbung wurden Zellen der Linie C6*lacZ* gefärbt. Diese zeigten eine Färberate von 80-95%.

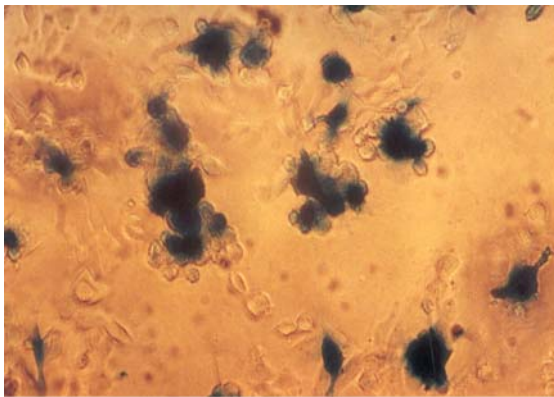


Abb. 10 U87-Zellen nach Lipofektion von pCMV β (*lacZ*-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

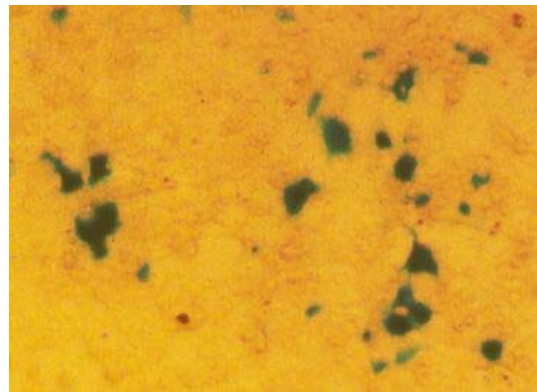


Abb. 11 U87-Zellen nach Lipofektion von pCS1 (*lacZ*-Färbung, Originalvergrößerung 200x)

4.3.2 Transfektion von pCS3a und pCS3 in U87

Die Transfektion der Plasmide pCS3a und pCS3 in die U87-Zellen zeigte bei Betrachtung durch den Fluoreszenzkanal des Mikroskopes eine deutliche Fluoreszenz von etwa 60-70% der Zellen bei Einsatz von pCS3a. Bei Nutzung von pCS3 wurde eine Fluoreszenzrate von etwa 45-55% erreicht. Die Negativkontrollplasmide pCS2a und pCS2 brachten keine Verstärkung der Fluoreszenz in entsprechend transfizierten Zellen. Auch die nativen U87-Zellen zeigten keine Fluoreszenzsteigerung.

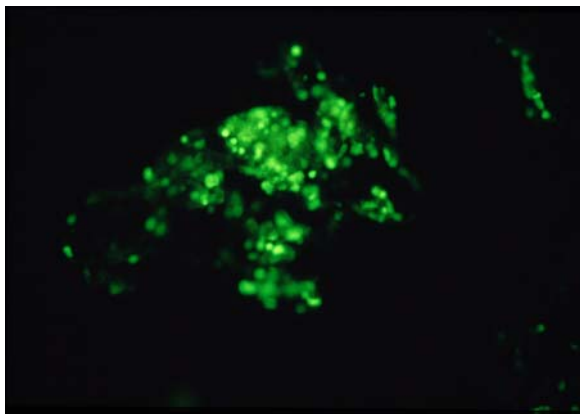


Abb. 12 U87-Zellen nach Lipofektion von pCS3a (Fluoreszenzmikroskopie, Originalvergrößerung 200x)

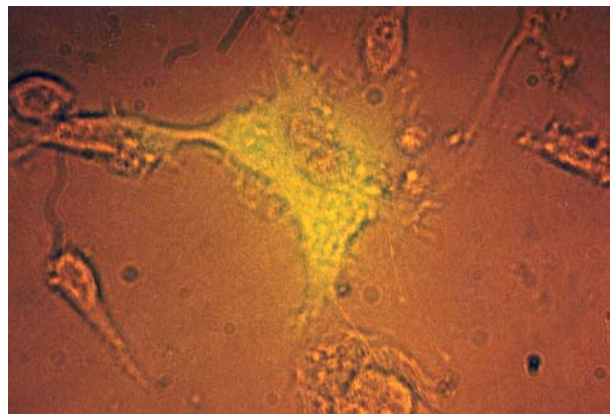


Abb. 13 U87-Zellen nach Lipofektion von pCS3 (Fluoreszenz-/Durchlichtmikroskopie, Originalvergrößerung 400x)

4.3.3 Transfektion von pCS2a und pCS2 in U87

Die reporterlosen Kontrollplasmide pCS2a und pCS2 brachten nach Lipofektion in die U87-Zellen nach lacZ-Färbung weder eine Blaufärbung noch eine Fluoreszenzsteigerung im Vergleich zu den nativen Zellen.

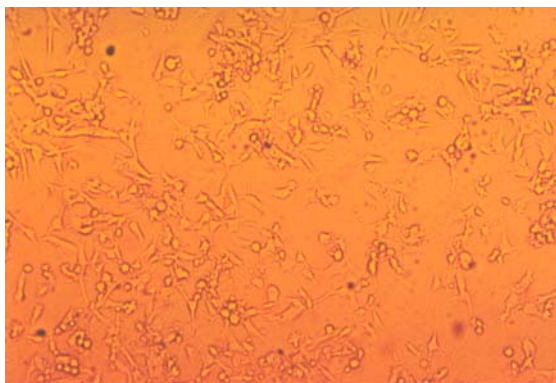


Abb. 14 U87-Zellen nach Lipofektion von pCS2a (Durchlichtmikroskopie Originalvergrößerung 200x)

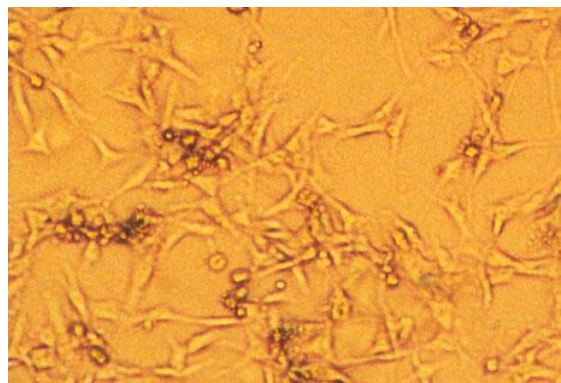


Abb. 15 U87-Zellen nach Lipofektion von pCS2 (Durchlichtmikroskopie, Originalvergrößerung 400x)

4.4 Ergebnisse der Gentransferversuche mit *L.monocytogenes* spp.

4.4.1 Transfer von *L.monocytogenes* 1/2a+pCS1

Zellen der Reihen 293T, U87, U373, A172 sowie der Primärkulturen SK54 und GE89 ließen sich nach pCS1-Transfer durch *L.monocytogenes* und lacZ-Färbung in unterschiedlichem Ausmaß blau anfärben. 293T-Zellen waren zu 30-35% blau gefärbt. Die käuflichen Hirntumorzelllinien zeigten Blaufärbung nur in circa 2-4% der Zellen. Ähnliche Färberaten konnten mit den Primärkulturen erreicht werden.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit von der Dauer der Infektion sowie von der eingesetzten Bakterienzahl. Infektionszeiten von länger als 6 Stunden erwiesen sich als zytotoxisch. Höhere Bakterienkonzentrationen (bis 4×10^4 /ml Medium) ergaben höhere Transfektionsraten.

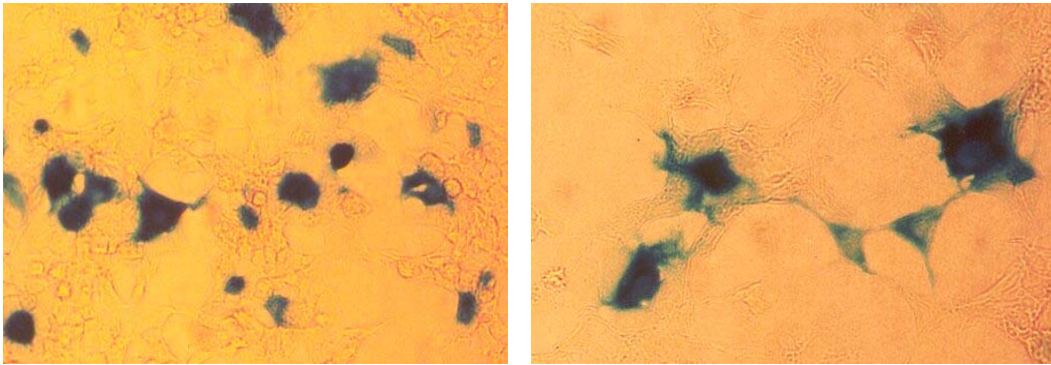


Abb. 16 und 17 293T-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes*+pCS1
(lacz-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

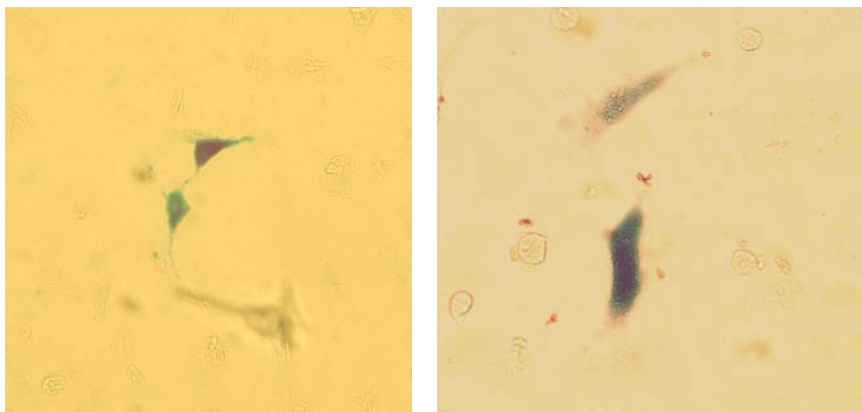


Abb. 18 und 19 U87-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes*+pCS1
(lacz-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

4.4.2 Transfer von *L.monocytogenes* 1/2a+pCS3

293T, U87, U373, A172 sowie primärkultivierte Zellen des OP-Präparates GE89 wurden für die Infektion mit den fluoreszenzreportergentragenden Listerien genutzt. Auch hier zeigten sich eine zeit- und dosisabhängige Transferleistung. Die stärksten Fluoreszenzraten zeigten sich nach sechsstündiger Infektion bei einer Bakteriendichte von 4×10^4 /ml Medium. Längere Inkubation und höhere Bakterienkonzentration schädigten die Zellen, so daß sie nicht weiter kultivierbar waren. Die Fluoreszenzdichte nahm in jenen Fällen rapide ab.

Die Zellen der Linie 293T waren nach dem Infektionsprocedere zu annähernd 70% fluoreszierend, die käuflichen Hirntumorzellen sowie die Primärkulturen lediglich in 3-5% der Zellen.

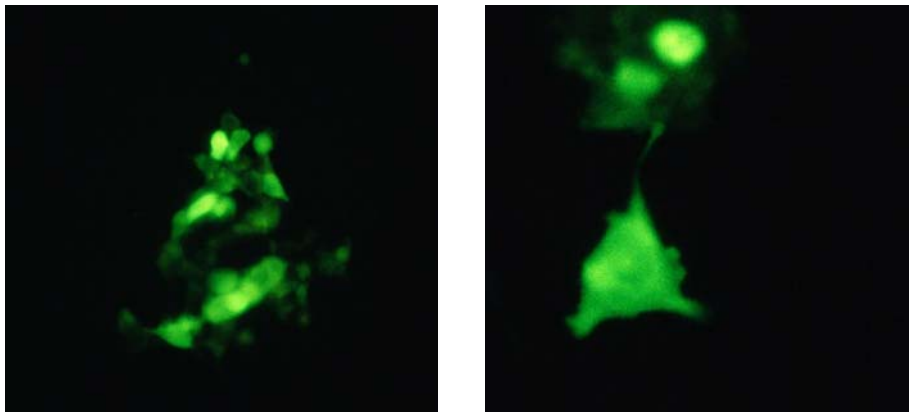


Abb. 20 und 21

293T-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes*+pCS3
(Fluoreszenzmikroskopie, Originalvergrößerung 200x bzw. 400x)

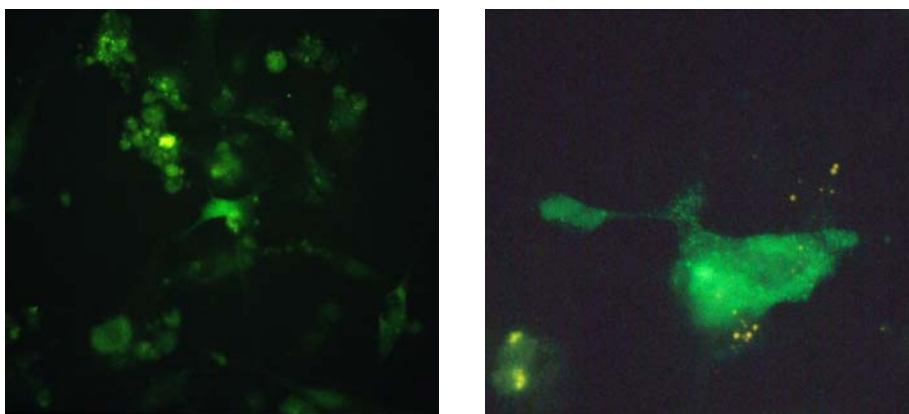


Abb. 22 und 23

U87-Zellen nach Infektion mit *L.monocytogenes*+pCS3 in Fluoreszenzmikroskopie
(Fluoreszenzmikroskopie, Originalvergrößerung 200x bzw. 400x)

4.4.3 Transfer von *L.monocytogenes* 1/2a+pCS2

293T, U87, U373, A172 sowie primärkultivierte Zellen der OP-Präparate SK54 und GE89 wurden mit dem Kontrollstamm infiziert. Nach lacZ-Färbung konnte keine Blaufärbung und im Fluoreszenzkanal keine Fluoreszenzsteigerung in den Zellen gesehen werden. Das Belassen der lacZ-Färbelösung auf den Zellen für mehr als 6 Stunden führt gelegentlich zu einer schwachen Hintergrundanfärbung. EGFP-typische Fluoreszenz wurde unabhängig von der Inkubationsdauer in keinem Fall beobachtet.

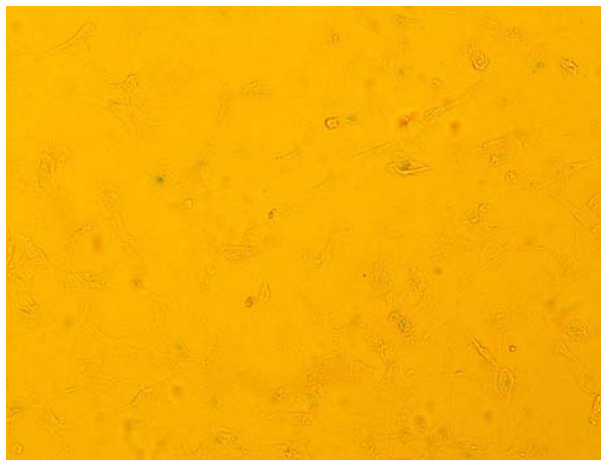


Abb. 24 U87-Zellen nach Infektion mit *L.m.*+pCS2
(Durchlichtmikroskopie, Originalvergrößerung 200x)

5. DISKUSSION

5.1 Diskussion der Invasionsversuche

Ziel der Invasionsversuche war die Untersuchung, ob *Listeria monocytogenes spp.* in etablierte Gliomzelllinien und primärkultivierte ZNS-Tumorpräparate invadieren können. Zusätzlich sollte mit speziell entwickelten Bakterienmutanten und -komplementanten für die Internalingene *inlA* und *inlB* die Frage nach der Steuerbarkeit der bakteriellen Invasion gegenüber dem Wildtypstamm *Listeria monocytogenes* 1/2a beantwortet werden.

Die höchsten relativen Invasionswerte wurden, unabhängig von der untersuchten Zellart, bei kombinierter Überexpression von *Internalin A* und *B* gefunden (im Mittel 204% der Wildtypinvasion). Die geringsten relativen Invasionswerte aller getesteten Listerienstämme wurden beim *Internalin AB*-Deletionstamm beobachtet (im Mittel 51,6% der Wildtypinvasion). Beide Internalingene scheinen demnach für die Listerieninfektion von Tumorzellen des Zentralnervensystems eine Bedeutung zu besitzen - für die einzelnen Zellgruppen jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß.

Für ***Glioblastom- bzw. Astrozytomzellen*** zeigte sich in dieser Arbeit eine gemischte *Internalin A/B*-Abhängigkeit der Listerieninvasion mit besonderer Bedeutung des *Internalin B* (am deutlichsten für Glioblastome). Gegenüber dem *Internalin A*-komplementierten Stamm konnte die Invasion durch Einsatz des *Internalin B*-komplementierten Stammes um den Faktor 1,34 ($p < 0,05$) bzw. 1,46 ($p = 0,15$) gesteigert werden. Die Verwendung des kombiniert *Internalin AB*-überexprimierenden Stammes brachte gegenüber dem isoliert *Internalin B*-überexprimierenden Stamm nur noch eine Steigerung der relativen Invasion um den Faktor 1,22 ($p = 0,13$) bzw. 1,16 ($p = 0,6$).

Die Invasions-Abhängigkeit vom *Internalin B* findet sich auch bei anderen Zellen epithelialer Abstammung. Möglicherweise spielt die *Internalin*-Rezeptorausstattung neuroepithelialer Zellen eine Rolle bei der Listerieninvasion. Vergleichende Studien der *internalin*-abhängigen Listerieninvasion in verschiedene humane ZNS-Tumorzellpräparate sind aus der Literatur nicht zu entnehmen. Auch ist über deren Ausstattung mit den als *inl*-Rezeptoren bekannten Molekülen bislang nur unzureichendes Wissen vorhanden. Die interzellulären Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Cadherine (u.a. E-Cadherin [*InlA*-Rezeptor]) werden beispielsweise im adulten Gehirn sehr selten nachgewiesen und man vermutet, daß bei zunehmender Entdifferenzierung von Tumoren deren Invasivität durch den zusätzlichen Verlust der Cadherine mitbedingt wird (Foty und Steinberg,2004; Rampon et al.,2005).

Utsuki et al. fanden auf 45 Präparaten astrozytärer Tumoren der WHO-Grade II-IV keinerlei Immunoreaktivität für E-Cadherin. Demgegenüber konnte auf nativen Astrozyten vermehrt der auch als InlB-Rezeptor fungierende globuläre C1-Komplement-Rezeptor nachgewiesen werden (Fernando et al.,2003). Dies lässt zumindest in vitro auf eine größere Bedeutung des Internalin B schließen. Zwar zeigten auch in vivo-Experimente an Zellen der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen einen Internalin B-abhängigen Übertritt aus der Blutbahn durch das Endothel in Richtung ZNS, jedoch wurde dabei nicht die Ausbreitung jenseits der BHS und deren mögliche Abhängigkeit von Internalinen untersucht (Greiffenberger et al.,1997). Dramsi et al. zeigten 1998 den Infektionsmodus jenseits der BHS am Rattenmodell auf, dies jedoch nur mit einem Listerien-Wildtypstamm im Vergleich zu apathogenen *Listeria innocua* spp. Dabei wurde eine Präferenz der Listerien zu Mikrogliazellen und Astrozyten gefunden, aber keine direkte Invasion von Neuronen. Anhand unserer Ergebnisse können wir die Hypothese der Präferenz von *L.monocytogenes* spp. zu humanen astrozytären Zellen in gewissem Umfang unterstützen. Durch die bevorzugte Adhäsion und Invasion höhergradiger astrozytärer Tumorzellen, wie in unseren Invasionsstudien an humanen Zellen und von Peters et al. an nativen murinen Hirngewebskulturen gezeigt, ist ein gewisses Targeting auf gliale Tumorzellen denkbar. Zudem invadiert *L.monocytogenes* besonders stark in proliferationsaktive Zellen (Velge et al.,1997), was durch deren generell bessere Ausstattung mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf deren Zelloberfläche begründet sein könnte. So sind auch internalin-unabhängige Listerien-Invasionsmechanismen verstärkten Ausmaßes denkbar, wie z.B. auf der Basis von insulin-like growth factor II-Rezeptoren bereits nachgewiesen (Gasanov et al.,2006), deren Präsenz auch auf Gliomzellen für deren Tumorwachstum Bedeutung hat (Kiaris et al.,2000).

Die **Meningeomzellen** zeigten dagegen eine gemischte *Internalin AB*-Abhängigkeit der Listerieninvasion mit Bevorzugung von *Internalin A*. Beim *Internalin B*-komplementierten Stamm wurde - anders als bei den astrozytären Zellen - eine verminderte mittlere relative Invasion gegenüber dem *Internalin A*-komplementierten Stamm beobachtet (Faktor 0,96; $p=0,6$). Durch *Internalin AB*-Überexpression wurde gegenüber ausschließlicher *Internalin B*-Überexpression eine deutliche Invasionssteigerung um den Faktor 1,53 gezeigt ($p=0,035$). Eine Erklärung hierfür könnte die stark differente InlA-Rezeptorausstattung von Meningeomzellen gegenüber neuroepithelialen Tumorzellen sein. Konnten Utsuki et al. auf astrozytären Tumoren kein E-Cadherin nachweisen, so fand sich dieses auf Meningeompräparaten verschiedener WHO-Grade ubiquitär (Shimada et al.,2005). Darüber

hinaus könnte vermutet werden, daß die eher InlA-abhängige>Listereininvasion in Meningeome mit deren (vergleichsweise) geringerer Proliferationsaktivität zusammenhängt. Für nicht proliferationsaktive Zellen wurde die Invasion von *L.monocytogenes* ausschließlich InlA gesteuert, während für die Invasion wachstumsaktiver Zellen eine zunehmende Synergie zwischen InlA und InlB besteht (Velge et al.,1997). Auffällig war weiterhin eine in Meningeomzellen vergleichsweise hohe mittlere Invasion des *Internalin AB*-deletierten Stammes von 74,1% der Wildtypinvasion. Offenbar ist die Invasion in Meningeomzellen auch Internalin AB-unabhängig möglich (wie bei Chatterjee et al.,2006 beschrieben), obgleich sich die Invasion durch Überexpression von insbesondere *inlA* (siehe oben) deutlich steigern lässt. Zudem ergibt sich die Frage nach der generellen Phagozytosefähigkeit von meningealen Zellen, worüber aber in der Literatur bislang nichts beschrieben ist.

Bei den **Hirnmetastasen**-Zellkulturen wurde eine gemischte *Internalin A/B*-Abhängigkeit der>Listerieninvasion beobachtet. Im Vergleich zu den anderen Zellkulturen zeigte sich insgesamt eine geringere Adhäsion, womit sich auch die vergleichsweise verminderte Invasion in die Metastasenzellen begründen lässt. Hier dürfte ebenfalls der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche eine wesentliche Rolle zukommen. Denkbar ist, daß die metastasierenden Zellen gegenüber ihrem Ursprungsgewebe Oberflächenmerkmale verlieren. Der Verlust des E-Cadherin, einem interzellulärem Adhäsionsmolekül und gleichzeitig Internalin A-Rezeptor, könnte zum Beispiel die Ablösung aus dem Primärtumorverband fördern und zudem in einer verminderten Adhäsion/Invasion dieser Zellen durch *Listeria spp.* resultieren (Ikeguchi et al.,2000). Darüber hinaus ist über die>Listerieninvasion in Hirnmetastasen-Kulturen in der Literatur noch nichts Vergleichbares beschrieben.

Die neben den Hirntumorzellen in Vorversuchen eingesetzte humane **embryonale Nierenepithelzelllinie 293T** wurde wesentlich effizienter von den>Listerien invadiert. Erklärt werden kann dies einerseits durch den generellen Tropismus der>Listerien zu epithelialen Geweben. Andererseits ist im speziellen Fall von embryonalen Nierenepithelzellen sicher auch die bekannt starke Präsenz von E-Cadherin, dem Rezeptor für Internalin A, auf der Zelloberfläche von Bedeutung (Rampon et al.,2005; Shimazui et al.,2004). In unseren Versuchen konnte für 293T-Zellen eine sehr deutliche Invasionsabhängigkeit der>Listerien vom Vorhandensein des *inlA* gezeigt werden, während die>Listerien-Invasion in die allermeisten epithelialen Zellen überproportional von der *inlB*-Aktivität abhängig ist (Chakraborty,1999).

5.2 Diskussion der Gentransferversuche

In den Transferversuchen sollte die Überführbarkeit der reportertragenden Plasmide in humane Zellen gezeigt werden. Der Nachweis konnte geführt werden, wenngleich die durch Listerien erreichten Transferraten für Zellen hirneigener Tumoren nur um 3-5% lagen. Als limitierender Faktor ist hierbei am ehesten das Bakterium anzunehmen. Anscheinend ist die niedrige Expressionsrate weniger durch geringe Adhäsion der Listerien, deren intra(wirts)zelluläre (antibiotikum-gesteuerte) Lysierung oder die Degradation der Plasmid-DNA, sondern vielmehr durch inhibierende bakterielle Makromoleküle begründet (Zelmer et al.,2005). Durch die Listerieninfektion könnte die Wirtszelle daneben auch die Kontrolle über einzelne zelluläre Regulationsmechanismen einbüßen, die eine down-Regulation der wirtszellulären Proteinbiosynthese denkbar machen.

Die Expression von Fremd-DNA durch jede einzelne Hirntumorzelle wäre ideal, ist aber keine zwingende Voraussetzung für eine vektorbasierte Fremdgentherapie. Eine Suizidgentherapie ist auch unter Ausnutzung sogenannter Bystander-Effekte auf die nicht fremdtragenden Zellen denkbar, wenn mindestens 10% der Zellen maligner Hirntumoren das Suizidgen exprimieren. Diese Rate wurde sowohl in vitro (Li et al.,2005) als auch durch Suizidgentherapie-Studien mit retroviralen Vektoren an humanen Glioblastomen im Rahmen einer Phase-II-Multicenterstudie abgeleitet (Weber et al.,2000; Sandmair et al.,2000). Ähnlich den viralen Vektorsystemen dürfte auch beim bakteriellen Fremdgentransfer ein dem Bystander-Effekt vergleichbarer Mechanismus existieren, da dieser durch das jeweilige Prodrug-System bedingt ist. Bei Plasmidtransfer in Maustumoren durch *E.coli* wurden, neben der eigentlichen Fremdgewirkung, auch immunologische Phänomene, wie z.B. die Einwanderung von Leukozyten, beobachtet, die für etwa 50% der Tumornekrosen verantwortlich gemacht wurden (Melero et al.,2000; Critchley et al.,2004).

Durch bakteriellen Vektortransfer können ausreichende Transferraten erreicht werden, wenn die Vektor-Zielzell-Interaktionen optimiert sind. So ist z.B. mit *S. typhimurium* eine nahezu vollständige Transfektion von Makrophagen erreichbar (Paglia et al.,2000). Auch mit *Listeria monocytogenes* wurden in humanen epithelialen Zellen bereits Transfektionsraten >10% beobachtet (Weiss und Krusch,2001) und in unseren Vorversuchen mit 293T-Zellen wurde ein Fremdgentransfer mit *Listeria monocytogenes* von bis zu 70% beobachtet.

Eine weitere Steigerung der Transfereffizienz des Listerienvektor-Systems könnte zunächst durch Verbesserungen an mindestens drei Angriffspunkten erreicht werden: an der Listerie, am Transferplasmid und an der Zielzelle.

In dieser Arbeit wurde für die Gentransferstudien der *Listeria monocytogenes* 1/2a-Wildtypstamm verwendet. Wie bei anderen Untersuchern, die Listerien zum Gentransfer nutzen, wurde eine stark zytolytische Wirkung der Listerien auf die Wirtszellen beobachtet (Hense et al.,2001; Spreng et al.,2000). Im Wesentlichen wird hierfür das Listeriolysin O verantwortlich gemacht, nach dessen genomischer Deletion zwar deutlich mehr Wirtszellen die Infektion überleben, jedoch auch die Invasions- und korrelierend die Fremdgentransferraten absinken (Grillot-Courvalin et al.,2002; Fajac et al.,2004), obwohl Listeriolysin O kein absolut essentieller Invasionsfaktor ist, wie in diversen Invasionsstudien gezeigt wurde (Paschen et al.,2000). Einige Wirtszellreihen scheinen ohne Listeriolysin-Aktivität, im Vergleich zum bakteriellen Wildtyp, sogar nahezu unveränderte Invasionsraten zu ermöglichen, was die Bedeutung der listeriolyysinartig wirkenden bakteriellen Phospholipasen von *L.monocytogenes* unterstreicht. Insbesondere für die Listerien-Invasion von Zellen des Zentralnervensystems ist die Bedeutung der Phospholipasen bereits gezeigt worden (Schlüter et al.,1998). Darüber hinaus ist bekannt, daß *actA*-deletierte (nicht zur interzellulären Ausbreitung fähige) Listerien eine deutlich reduzierte Infektions- und Gentransferrate in epithelialen Geweben zeigen, was die Bedeutung dieses Virulenzgens unterstreicht (Pilgrim et al.,2003).

Die Infektion im hier untersuchten in vitro-Modell verläuft ohne artifizielle (antibiotische) Intervention immer zytozid. Der in vitro-Transfer ist mit invasiven *Listeria spp.* umfangreicher als mit ausschließlich abortiv-infizierenden Bakterien möglich, da in der Regel höhere Invasionsraten erreicht werden. Der abortive Infektionsmodus stellt somit in vitro keine grundsätzliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Fremdgentransfer dar. Für zukünftige in vivo-Anwendungen, insbesondere bei somatischem Gentransfer, sollten hingegen möglichst wenig immunogene und wenig invasive (wirtszellschonende) Listerien konstruiert werden. Prinzipiell wäre es möglich, attenuierte oder weniger invasive Listerienstämme zu konstruieren, die nur mit den gewünschten Virulenz- und Transfergenen ausgestattet sind. Mit einer solchen Listerienvariante (*L.m. hlyW491A*), die ein verändertes und weniger zelltoxisches Listeriolysin produziert, konnte - beim in vitro Transfer des *CTFR*-Gens in humane Bronchialepithelzellen (CHO-K1-Zellen) als Modell der Gentherapie der

Zystischen Fibrose - eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Fremdgenstransferrate registriert werden (Krusch et al.,2002). Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von *L.innocua*, einer nicht humanpathogenen Listerienart.

Auch Veränderungen am Transferplasmid könnten einen zusätzlichen Gewinn an Transfereffizienz erbringen. Die in dieser Arbeit verwendeten Transferplasmide enthalten nur das Reportergen und die zur bakteriellen Replikation und Selektion benötigten Gene. In den Invasionsstudien, die im Rahmen dieser Arbeit an Hirntumorzellen durchgeführt wurden, konnte aber die Abhängigkeit der Listerieninvasion von den Internalinen A und B gezeigt werden. Die mit dem Wildtypstamm aufzeigbare Fremdgenstransferrate liegt mit weniger als 10% im Bereich der fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Invasion des Listerien-Wildtypstamm in die astrozytären Tumorzellen. Durch Nutzung von Listerien mit Überexpression der *Internaline A* und *B* konnte eine Steigerung der Invasionsrate auf mehr als 10% in der Mehrzahl der untersuchten Zellkulturen beobachtet werden. Potentiell könnte also bei Verwendung eines *InternalinAB*-überexprimierenden Listerienstammes als Vektor, die Fremdgenstransferrate in astrozytäre Tumorzellen erhöht werden - möglicherweise sogar über die Grenze von 10% hinaus.

Durch geeignete Promotorwahl ergibt sich eine weitere Möglichkeit, die intrazelluläre Konzentration der Fremdgene zu variieren. In dieser Arbeit wurde der Cytomegalievirus-Promotor verwendet, der von den humanen Polymerasen bevorzugt abgelesen wird. Stärkere Promotoren sind bisher nicht bekannt, lediglich der Chicken- β -Aktin-Promotor erreicht eine dem CMV-Promotor ähnliche Aktivität in humanen nativen neuronalen Zellen und Hirntumorzellen (Fukuchi et al.,1994; Doll et al.,1996). Etwas weniger stark wirken der SV40-Promotor oder - aus dem humanzellulären Bereich - der Ubiquitin-Promotor.

Die Beladung von Bakterien mit natürlichen Plasmiden wird in natura auf etwa 50 Plasmidkopien pro Bakterium begrenzt (plasmid copy number control [Brown,1997; del Solar und Espinosa,2000]). Das dafür verantwortliche Gen (CopR-Gen [Kuhn et al.,2000]) wurde in den verwendeten Vektoren weitgehend inaktiviert, so daß mit circa 1000 Kopien des Plasmides von seiten der einzelnen Listerie ein optimierter Zustand vorliegt.

Die Konzentration des Fremdenzyms in der Wirtszelle könnte noch erhöht werden, wenn die intrazelluläre Stabilität der Fremdgene verbessert würde – z.B. durch den zusätzlichen Einbau eines Selektionsgens (in der Regel Resistenzgene gegenüber Pharmaka) und gleichzeitiger Anwesenheit des Selektionsfaktors (Minol und Urmann,1996).

Es könnte zudem, anstelle einer singulären Fremdgenfraktion im Plasmid, eine sich mehrfach wiederholende Folge von Reportergensequenzen in das Plasmid eingesetzt werden, welches dann als sogenanntes Multicopy-Plasmid fungieren würde (Klock,1996).

Neben bakteriellem Vektor und Plasmid könnte auch die Wirtszelle für den Gentransfer optimiert werden. In vitro wären Modifikationen an der Wirtszelle zur Steigerung der nachweisbaren Transfereffizienz relativ einfach möglich. So würde z.B. das Einbringen von speziellen Genen für Internalinrezeptoren oder deren Überexpression einen vektoriiellen Transfer von Listerien erfolgreicher machen. Diese Komponente der Vektor-Zielzellen-Interaktion ist in vivo aber wahrscheinlich am schwierigsten zu beeinflussen. Es würde ein zusätzlicher Gentransfer nötig werden, um eine selektive Listerien-Glioblastom-Interaktion zu ermöglichen, wobei erschwerend hinzukommt, daß bis heute noch kein exklusiver Glioblastom-spezifischer Zelloberflächenmarker identifiziert worden ist.

Auch die genauen Mechanismen der intra(wirts)zellulären Freisetzung und Transkription der Fremdgenplasmide aus *L.monocytogenes* sind erst in Ansätzen aufgeklärt (Pilgrim et al.,2003; Lössner und Weiss,2004), beispielsweise die exakten Einzelschritte bis zur Fremd-DNA-Transkription und die hieran im Detail beteiligten Faktoren. Die Aufnahme in den Kern erfolgt am wahrscheinlichsten über passive Einschlußvorgänge im Rahmen der Teilung der (tumorösen) Wirtszellen. Ein aktiver Transport der Fremd-DNA aus dem Zytoplasma in den Kern ist zwar denkbar, jedoch ebenso unwahrscheinlich, wie das längere Überleben der Wirtszelle nach einer direkten Invasion der Listerien bis in den Nukleus. Es ist ebenfalls noch nicht bekannt, ob nicht doch eine Prozessierung der „Fremd“-mRNA durch die Wirtszelle stattfindet oder wie die Degradation der Fremd-DNA-/RNA (wann und unter welchen Umständen?) verläuft. Die gezielte Steuerung dieser intrazellulären Abläufe könnte, sofern möglich, zukünftig eine weitere Effizienzsteigerung bakterieller Vektorsysteme denkbar machen (Merrick,1992; Underhill et al.,2003; Boeger et al.,2005; Schoen et al.,2005; Shimizu et al.,2006).

Weitere Ansätze könnten sich durch die gezielte Steuerung der vektor-assoziierten Immunreaktion und der Bystander-Effekte ergeben.

5.3 Bewertung im Zusammenhang

In dieser Arbeit wurden die Grundlagen eines neuen gentherapeutischen Systems erarbeitet. Der vektorielle Gentransfer in humane Hirntumorzellen erfolgt dabei durch das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* 1/2a. Die folgenden Ergebnisse weisen die potentielle Eignung von *Listeria monocytogenes* als Vektor für gentherapeutische Projekte nach:

1. *Listeria monocytogenes* 1/2a kann in die Zellen humaner hirneigener Tumoren invadieren. Das Ausmaß der Invasion kann zudem durch plasmidgesteuerte Überexpression der Virulenzgene *Internalin A* oder *B* über die Invasionsrate des Wildtypbakteriums hinaus gesteigert werden.
2. Es ist möglich, mit *Listeria monocytogenes* 1/2a in vitro expressionsfähige Fremd-DNA-Abschnitte auf geeigneten Plasmiden in Hirntumorzellen einzuschleusen. In dieser Arbeit wurden neu entwickelte Listerien-Vektoren mit β -Galactosidase (*lacZ*) und *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* als Reportergen verwendet. Diese Vektoren sind auch für den Transfer therapeutischer Fremdgene geeignet.

Die Transfektionseffizienz des in dieser Arbeit geprüften bakteriellen Gentransfersystems sollte für eine suffiziente Suizidgentherapie an Zellen hirneigener Tumoren noch erhöht werden. Die Erprobung von *Listeria monocytogenes* als Gentherapie-Vektor lässt zukünftig durch die Kombination der heutigen Standardtherapie mit einem optimierten gentherapeutischen Verfahren ein wesentliches Potential in der Glioblastombehandlung erwarten (Castro et al.,2003).

Die Ergebnisse der klinischen Studien mit viralen oder retroviralen Vektoren waren bislang zusammengenommen nicht zufriedenstellend (Westphal und Jacobs,2003), weshalb die vektorielle Gentherapie für diese Tumoren weiterhin klinisch-experimentellen Charakter hat (Böker,2004). Dementsprechend wird 2005 eine europäische Multicenter-Phase-III-Studie beginnen, die den adenovirus-basierten Transfer von HSV-Thymidinkinase in Glioblastome untersuchen soll. Das Potential der Zielzell-Vektor-Interaktion und die Anwendungssicherheit bakterieller Vektorsysteme könnten das Ausmaß der aktuellen Virus-Systeme erreichen, weshalb weiteres Suchen nach und Optimieren von bakteriellen Alternativen für den vektorbasierten Fremdgentransfer gerechtfertigt sind (Vassaux et al.,2006).

6. LITERATURNACHWEIS

Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med* 2, 148-164 (2000)

Alavi JB, Eck SL. Gene therapy for malignant gliomas. *Hematol Oncol Clin North Am* 12, 617-29 (1998)

Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S. Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34(1), 45-60 (1994)

Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci* 110, 731-43 (1997)

Berche P. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* 18, 323-36 (1995)

Boeger H, Bushnell DA, Davis R, Griesenbeck J, Lorch Y, Strattan JS, Westover KD, Kornberg RD. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett*; 7; 579: 899-903 (2005)

Böker DK, Winking M. Die Rolle von Bosswellia-Säuren in der Therapie maligner Gliome. *Deut Ärzteblatt* 94, A-1197 (1997)

Böker DK, Mennel HD. Maligne Tumoren des Zentralnervensystems. In: Böker DK, Mennel HD, Hermanek P, Spraul CW (Hrsg.). *Klassifikation maligner Tumoren des ZNS und der Augen*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1-93 (2002)

Böker DK. Intrazerebrale Tumoren. In: Moskopp D, Wassmann H (Hrsg.). *Neurochirurgie*. Schattauer Verlag Stuttgart, New York, 407-427 (2004)

Braun L, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* 25, 285-94 (1997)

Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* 27, 1077-87 (1998)

Braun L, Ghebrehiwet B, Cossart P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 19, 1458-66 (2000)

Brown TA. Vektoren: Plasmide und Bakteriophagen. In: Brown TA. (Hrsg.). *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 26-41 (1997)

Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X, Bigliari A, Williams JC, Hu J, Lowenstein PR. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* 98, 71-108 (2003)

- Chakraborty T, Goebel W. Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* 138, 41-58 (1988)
- Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, Domann E, Hartl M, Goebel W, Nichterlein T, Notermans S. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 174, 568-74 (1992)
- Chakraborty T, Ebel F, Domann E, Niebuhr K, Gerstel B, Pistor S, Temm Grove CJ, Jokusch BM, Reinhard M, Walter U. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 14, 1914-21 (1995)
- Chakraborty T. Molecular and cell biological aspects of infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 201, 155-63 (1999)
- Chatterjee SS, Otten S, Hain T, Lingnau A, Carl UD, Wehland J, Domann E, Chakraborty T. Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. *Int J Med Microbiol.*, Mar 7 (2006)
- Chen J, Bezdek T, Chang J, Kherzai AW, Willingham T, Azzara M, Nisen PD. A glial-specific, repressible, adenovirus vector for brain tumor gene therapy. *Cancer Res* 58, 3504-7 (1998)
- Chen SH, Shine D, Goodman JC, Grossmann RG, Woo SLC. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vitro. *Proc Natl Sci USA* 91, 3045-7 (1994)
- Collins MD; Wallbanks S; Lane DJ; Shah J; Nietupski R; Smida J; Dorsch M; Stackebrandt E. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* 41, 240-6 (1991)
- Cossart P, Mengaud J. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* 6, 463-74 (1989)
- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 57, 3629-36 (1989b)
- Cowsill C, Southgate TD, Morrissey G, Dewey RA, Morelli AE, Maleniak TC, Forrest Z, Klatzmann D, Wilkinson GW, Lowenstein PR, Castro MG. Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther* 7, 679-85 (2000)
- Critchley RJ, Jezard S, Radford KJ, Goussard S, Lemoine NR, Grillot-Courvalin C, Vassaux G. Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E.coli*. *Gene ther* 11, 1224-1233 (2004)
- Culver KW, Ram Z, Walbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256, 1550-2 (1992)

Culver KW. Gene therapy for malignant neoplasm of the CNS. *Bone Marrow Transplant* 18, 56-9 (1996)

Daniels JJ, Autenrieth IB, Goebel W. Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol Lett* 190, 323-8 (2000)

De Angelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* 44, 691-5 (1998)

DeAngelis LM. Chemotherapy for brain tumors-a new beginning. *N Eng J Med* 352, 1036-8 (2005)

Deimling A von, Louis ADN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15, 328-38 (1995)

del Solar G, Espinosa M. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* 37, 492-500 (2000)

Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ, Southgate TD, Klatzmann D, Lassmann H, Castro MG, Löwenstein PR. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med* 5, 1256-63 (1999)

Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI. Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther* 3, 437-447 (1996)

Domann E, Leimeister-Wächter 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 Immun* 59, 65-72 (1991)

Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wächter M, Wuenscher M, Chakraborty T. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 11, 1981-90 (1992)

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

Dramsi S, Lebrun M, Cossart P. Molecular and genetic determinants involved in invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* 209, 61-77 (1996)

Dramsi S, Dehoux P, Lebrun M, Goossens PL, Cossart P. Identification of four new members of the internalin multigen family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* 65, 1615-25 (1997)

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* 66, 4461-8 (1998)

- Drevets DA, Sawyer RT, Potter TA, Campbell PA. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun*, Nov 63, 4268-76 (1995)
- Eck SL, Alavi JB, Davis A, Hackney D, Judy K, Mollmann J, Phillips PC, Wheeldon EB, Wilson JM. Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Hum Gene Ther* 7, 1465-82 (1996)
- Fajac I, Grosse S, Collombet JM, Thevenot G, Goussard S, Danel C, Grillot-Courvalin C. Recombinant *Escherichia coli* as a gene delivery vector into airway epithelial cells. *J Control Release* 97, 371-381 (2004)
- Fitzek MM, Thornton AF, Rabinov JD, Lev MH, Pardo FS, Munzenrieder JE, Okunieff P, Bussiere M, Braun I, Hochberg FH, Hedley Whyte ET, Liebsch NJ, Harsh GR4th. Accelerated fractionated proton/photon irradiation to cobalt gray equivalent for glioblastoma multiforme: results of a phase II prospective trial. *J Neurosurg* 91, 251-60 (1999)
- Flowers A, Levin VA. Chemotherapy for brain tumors. In: Kaye H, Laws Jr ER (Hrsg.): *Brain Tumors: An encyclopedic approach*. Churchill Livingstone Edinburgh, 349-360 (1995)
- Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* 48, 397-409 (2004)
- Fukuchi K, Hearn MG, Deeb SS, Smith AC, Dang N, Miyzaki J, Bothwell M, Martin GM. Activity assays of nine heterogeneous promoters in neural and other cultured cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A, 300-305 (1994)
- Fulton DS, Urtasun RC, Scott-Brown I. Increasing radiation dose intensity using hyperfractionation in patients with malignant glioma. *J Neurooncol* 14, 63-72 (1992)
- Gaillard 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* 65, 1127-41 (1991)
- Gaspar LE, Zamorano LJ, Shamsa F, Fontanesi J, Ezzel GE, Yakar DA. Permanent 125iodine implants for recurrent malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43,977-82 (1999)
- Gerstel B, Gröbe L, Pistor S, Chakraborty T, Wehland J. The ActA polypeptides in *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor binding sites for host microfilament proteins. *Infect Immun* 64, 1929-39 (1996)
- Goebel W, Kreft J. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol* 5, 86-8 (1997)
- Gratzl O, Rem JA, Wasner M. Nervensystem. In: Siewert JR (Hrsg.): *Chirurgie*. Springer Berlin, Heidelberg, New York 6. Aufl., 215-88 (1998)
- Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Weiglein I, Bubert A, Engelbrecht F, Stins M, Kuhn M. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* 66, 5260-7 (1998)

- Grillot-Courvalin C, Goussard S, Courvalin P. Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol* 4, 177-186 (2002)
- Hahn H. Listerien. In: Hahn H, Falke D, Klein P (Hrsg): *Medizinische Mikrobiologie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2. Aufl., 397-403 (1994)
- Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KE, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microbiol* 3, 599-609 (2001)
- Hess KR. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurocol* 42, 227-31 (1999)
- Hof H. *Listeria monocytogenes*, Listeriose. In: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G (Hrsg.): *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Stuttgart, Jena, New York Vol.7, 518-21 (1994)
- Ikeguchi, Scand J Gastroenterol (2000)
- Ireton K, Cossart P. Host-pathogen interaction during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet* 31, 113-38 (1997)
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 9, 469-79 (1999)
- Jain KK. Use of bacteria as anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther* 1, 291-300 (2001)
- James CD. Gene Alterations in Glial Tumors. In: Nagai M (Hrsg.): *Brain Tumor - Research and Therapy III*. Springer Verlag Tokyo, Berlin, Heidelberg 1. Aufl., 161-72 (1996)
- Kayser FH. *Listeria monocytogenes*. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (Hrsg): *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 9. Aufl., 246-7 (1998)
- Keles GE, Anderson B, Berger MS. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol* 1999 Oct;52(4):371-9
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (Hrsg.): *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Springer Berlin, Heidelberg (1993)
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia* 15, 211-21 (1995)
- Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD. Zentrales Nervensystem / Tumoren des Nervensystems. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): *Pathologie*. Urban&Schwarzenberg München, Wien, 230-315 (1997a)

- Kleihues P, Burger PC, Plate KH, Ohgaki H, Cavanee WK. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavanee WK (Hrsg.): Pathology & Genetics / Tumours of the Nervous System. Oxford University Press, 16-24 (1997b)
- Klock G. Erhöhung der Gendosis durch Multicopy-Plasmide. In: Gassen HG, Minol K (Hrsg.): Gentechnik. 4.Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 225-227 (1996)
- Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P. *L.monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. Cell 68, 521-31 (1992)
- Kocks C, Hellio R, Gounon P, Ohayon H, Cossart P. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. J Cell Sci 105, 699-710 (1993)
- Krusch S, Domann E, Frings M, Zelmer A, Diener M, Chakraborty T, Weiss S. *Listeria monocytogenes* mediated CTFR transgene transfer to mammalian cells. J Gene Med 4, 655-667 (2002)
- Kruse CA, Varella-Garcia M, Kleinschmidt-Demasters BK, Owens GC, Spector EB, Fakhrai H, Savelieva E, Liang BC. Receptor expression, cytogenetic, and molecular analysis of six continuous human glioma cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim 34, 455-62 (1998)
- Kuhn K, Steinmetzer K, Brantl S. Transcriptional repressor CopR: the structured acidic C terminus is important for protein stability. J Mol Biol 300, 1021-1031 (2000)
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch S, Hess K, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival. J Neurosurg 95, 190-8 (2001)
- Lantos PL, Vandenberg SR, Kleihues P. Tumours of the Nervous System. In: Graham DI, Lantos PL (Hrsg.): Greenfield's Neuropathology. Arnold London. 6. Auflage, 583-879 (1996)
- Larson DA, Sneed PK, Gutin PH. Interstitial brachytherapy in malignant gliomas. In: Karim ABMF, Laws Jr ER (Hrsg.): Glioma. Springer Heidelberg, 205-215 (1991)
- Lasa I, David V, Gouin E, Merchand JB, Cossart P. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. Mol Microbiol 18, 425-36 (1995)
- Lasa I, Gouin E, Goethals M, Vancompernelle K, David V, Vandekerckhove J, Cossart P. Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. EMBO J 16, 1531-40 (1997)
- Lebrun M, Mengaud J, Ohayon H, Nato F, Cossart P. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. Mol Microbiol 21, 579-92 (1996)
- Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. Infect Immun 65, 5309-19 (1997)

- Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. EMBO J 18, 3956-63 (1999)
- Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D, Hulsebos TJ. Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. Int J Cancer 79, 159-65 (1998)
- Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol 5, 361-6 (1991)
- 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 Immun 63, 3896-903 (1995)
- Loeffler JS, Shrieve DC, Tarbell N, Alexander E3rd. External stereotactic radiation techniques for intracranial lesions. In: Kogelnik HD (Hrsg.): Progress in Radio-Oncology. Monduzzi Bologna, 389-396 (1995)
- Loessner H, Weiss S. Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. Expert Opin Biol Ther 4, 157-168 (2004)
- Marchand JB, Moreau P, Paoletti A, Cossart P, Carlier MF, Pantaloni D. Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. J Cell Biol 130, 331-43 (1995)
- Marquis H, Doshi V, Portnoy DA. The broad-range phospholipase C and metalloprotease mediate Listeriolysin-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. Infect Immun 63, 4531-4 (1995)
- Marras LC, Geerts WH, Perry JR. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. Cancer 89, 640-6 (2000)
- Martin R (Hrsg.). Elektrophorese von Nukleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- Mehta MP. Radiosurgery of malignant brain tumors. In: De Salles A, Lufkin R (Hrsg.): Minimally invasive therapy of the brain. Georg Thieme New York, Stuttgart, 213-24 (1997)
- Melero I, Vile RG, Colombo MP. Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte? Gene Ther 7, 1167-1170 (2000)
- Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L.monocytogenes* into epithelial cells. Cell 84, 923-32 (1996)

- Mengaud J, Lecuit M, Lebrun M, Nato F, Mazie JC, Cossart P. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* 64, 5430-3 (1996b)
- Mennel HD. Interdisziplinäre Leitlinien der DKG und ihrer Arbeitsgemeinschaften: Diagnostik und Therapie supratentorieller Gliome des Erwachsenenalters. *Forum DKG* 14, 580-6 (1999)
- Merrick WC. Mechanism and regulation of eucaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56, 291-315 (1992)
- Minol K, Urmann U. Genklonierung und Genexpression in höheren Zellen. In: Gassen HG, Minol K (Hrsg.): *Gentechnik*. 4.Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 177-178 (1996)
- Moors M, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA. Expression of Listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 67, 131-9 (1999)
- Müller S, Hain T, Pashalidis P, Lingnau A, Domann E, Chakraborty T, Wehland J. Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun* 66, 3128-33 (1998)
- Murray EGD, Webb RE, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undiscrined bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol* 29, 407-39 (1926)
- Narayanan K, Warburton PE. DNA modification and functional delivery into human cells using *Escherichia coli* DH10B. *Nucleic Acid Res* 31, 51 (2003)
- Nestler U, Heinkelein M, Lücke M, Meixensberger J, Scheurlen W, Kretschmer A, Rethwilm A. Foamy virus vectors for suicide gene therapy. *Gene Ther* 4, 1270-1277 (1997)
- Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar LK, Chakravarti A, Muzikansky A, Stemmer-Rachamimov A, Chiocca EA, Aguilar-Cordova E, Hochberg FH. The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J Neurooncol* 67, 177-88 (2004)
- Newton CR, Graham A (Hrsg.). *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994)
- Niebuhr K, Chakraborty T, Rohde M, Gazlig T, Jansen B, Köllner P, Wehland J. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect Immun* 61, 2793-802 (1993)
- Noske W, Lentzen H, Lange K, Keller K. Phagocytotic activity of glial cells in culture. *Exp Cell Res* 142, 437-45 (1982)
- Otter A, Blakemore WF. Observation on the presence of *Listeria monocytogenes* in axons. *Acta Microbiol Hung* 36, 125-31 (1989)

- Paglia P, Terazzini N, Schulze K, Guzman CA, Colombo MP. In vivo correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther* 7, 1725-1730 (2000)
- Parida S, Domann E, Rohde M, Gazlig T, Müller S, Darji A, Hain T, Jansen B, Köllner P, Wehland J, Chakraborty T. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 28, 81-95 (1998)
- Parker WB, King SA, Allan PW, Bennett LL Jr, Secrist JA3rd, Montgomery JA, Gilbert KS, Waud WR, Wells AH, Gillespie GY, Sorscher EJ. In vivo gene therapy of cancer with *E.coli* *purine nucleoside phosphorylase*. *Hum Gen Ther* 8, 1637-44 (1997)
- Paschen A, Dittmar KEJ, Grenningloh R, Rohde M, Schadendorf D, Domann E, Chakraborty T, Weiss S. Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presenting capacity. *Eur J Immunol* 30, 3447-3456 (2000)
- Paulus W, Bayas A, Ott G, Roggendorf W. Interphase cytogenetics of glioblastoma and gliosarcoma. *Acta Neuropathol* 88, 420-5 (1994)
- Peters M, Hewicker Trautwein M. Infection of murine fetal brain cell cultures with *Listeria monocytogenes*. *Vet Microbiol* 41, 19-28 (1994)
- Peters M, Hewicker Trautwein M. Studies on the cell tropism of *Listeria monocytogenes* in ovine fetal brain cell cultures. *Vet Microbiol* 49, 169-79 (1996)
- Pilgrim S, Stritzker J, Schoen C, Kolb-Maurer A, Geginat G, Loessner MJ, Gentschev I, Goebel W. Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther* 10, 2036-2045 (2003)
- Pollock SS, Pollock TM, Harrison MJ. Infection of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*: a review of 54 adult and juvenile cases. *Q J Med* 53, 331-40 (1984)
- Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 60, 2710-7 (1992)
- Poyart C, Abachin E, Razafimanantsoa I, Berche P. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 61, 1576-80 (1993)
- Prats N, Briones V, Blanco MM, Altimira J, Ramos JA, Domínguez L, Marco A. Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 744-7 (1992)
- Raffelsbauer D, Bubert A, Engelbrecht F, Scheinpflug J, Simm A, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* 260, 144-58 (1998)
- Ram z, Culver KW, Oshiro EM. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3, 1354-61 (1997)

Rampon C, Prandini MH, Bouillot S, Pointu H, Tillet E, Frank R, Vernet M, Huber P. Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast and mesangial cells. *Exp Cell Res* 302, 48-60 (2005)

Rüger, R. Methoden der Genübertragung. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): *Handbuch der Molekularen Medizin-Bd.1 Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 195-241 (1997)

Rosolen A, Frascella E, di Francesco C, Todesco A, Petrone M, Mehtali M, Zacchallo F, Zanesco L, Scarpa M. In vitro and in vivo antitumor effects of retrovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene-transfer in human medulloblastoma. *Gene Ther* 5, 113-20 (1998)

Sachs L: *Statistische Methoden: Planung und Auswertung*. 7. überarbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1993)

Sandmair AM, Turunen M, Tyynela K, Loimas S, Vainio P, Vanninen R, Vapalahti M, Bjerkgvig R, Janne J, Yla-Herttuala S. Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions. *Cancer Gene Ther* 7, 413-21 (2000)

Schirmer M (Hrsg.): *Neurochirurgie-Eine Einführung*. Urban&Schwarzenberg München, Wien 9. Aufl. (1998)

Schlüter D, Chahoud S, Lassmann H, Schumann A, Hof H, Deckert Schlüter M. Intracerebral targets and immunomodulation of murine *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 14-24 (1996)

Schlüter D, Domann E, Buck C, Hain T, Hof H, Chakraborty T, Deckert Schlüter M. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infect Immun* 66, 5930-8 (1998)

Schoen C, Kolb-Maurer A, Geginat G, Löffler D, Bergmann B, Stritzker J, Szalay AA, Pilgrim S, Goebel W. Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell Microbiol*; 7(5): 709-24 (2005)

Schuchat A, Broome CV. Infektionen mit *Listeria monocytogenes*. In: Schmailzl KJG (Hrsg.): *Harrison's Innere Medizin Bd.1*. Blackwell Wissenschafts-Verlag 13. Aufl., 753-6 (1995)

Shimazui T, Schalken JA, Kawai K, Kawamoto R, van Bockhoven A, Oosterwijk E, Akaza H. Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 11, 357-360 (2004)

Shimizu M, Yoshimoto T, Sato M, Matsuzawa A, Takeda Y. Frequency and resistance of CD95 (Fas/Apo-1) gene-transfected tumor cells to CD95-mediated apoptosis by the elimination and methylation of integrated DNA. *Int J Cancer*. Feb 27 (2006)

Shrieve DC, Alexander E3rd, Black PM, Wen PY, Fine HA, Kooy HM, Loeffler JS. Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative

radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. *J Neurosurg* 90, 72-7 (1999)

Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 63, 4231-7 (1995)

Spreng S, Dietrich G, Niewiesk S, ter Meulen V, Gentschev I, Goebel W. Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 299-304 (2000)

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Belanger K, Brandes AA, Bogdahn U, Curschmann J, Cairncross G, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Eng J Med* 352, 987-96 (2005)

Sturtz FG, Wadell 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* 8, 1945-53 (1997)

Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement and the spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109, 1597-608 (1989)

Underhill MF, Coley C, Birch JR, Findlay A, Kallmeier R, Proud CG, James DC. Engineering mRNA translation initiation to enhance transient gene expression in chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 19(1): 121-9 (2003)

Velge P, Bottreau E, Van-Langendonck N, Kaeffer B. Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. *J Med Microbiol* 46, 681-692 (1997)

Voges J, Weber F, Reszka R. Clinical protocol. Liposomal gene therapy with the herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir system for the treatment of glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 13, 675-85 (2002)

Weiss S, Krusch S. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol Chem* 382, 533-541 (2001)

Westphal M, Winking M. Intrakranielle Druckerhöhung. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M (Hrsg.): *Neuroonkologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 86-92 (2003)

Winking M, Böker DK, Simmet T. Significant influence of Cysteinyl-Leukotrienes in formation of perifocal edema in brain tumor patients. *J Neurooncol* 21, 348-52, (1994)

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

Wiestler OD, Deimling A von. A Model for the Molecular Pathogenesis of Astrocytic Gliomas. In: Nagai M (Hrsg.): *Brain Tumor - Research and Therapy III*. Springer Verlag Tokyo, Berlin, Heidelberg 1. Aufl., 161-72 (1996)

Wuenschel MD, Kohler S, Goebel W, Chakraborty T. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet.* 228, 177-82 (1991)

Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther* 7, 269-74 (2000)

Zelmer A, Krusch S, Koschinski A, Rohde M, Repp H, Chakraborty T, Weiss S. Functional transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: a mechanistic approach. *J Gene Med.*7(8): 1097-112 (2005)

Zülch KJ. *Brain Tumors. Their Biology and Pathology.* Springer Berlin, Heidelberg. 3. Auflage, (1986)

7. ANHANG

	EGD	$\Delta inLAB2$	$\Delta inLAB2+$ <i>inLA</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLB</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLB_{PmlA}</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLAB_{PmlA}</i>
Glioblastome						
U 87	1422,93	1117,71	1064,49	1098,5	3542,95	3804,77
US 11	260,2	72,67	213,81	130,07	187,55	444,16
PH 15	221,8	176,69	251,52	319,84	401,86	499,47
PE 17	375	115,46	222,11	251,21	371,96	456,19
SG 33	207,6	93,94	96,55	200,96	396,45	481,49
SK 54	52,79	13,03	20,67	38,09	83,11	46,3
CE 63	185,64	52,59	78,62	178,12	440,04	527,01
WP 02	13,73	4,95	8,27	14,03	27,71	30,97
MW72	163,85	51,83	114,63	138,91	258,57	350,57
EM 74	213,97	52,1	123,31	182,43	397,86	575
KH 86	23,59	6,7	15,59	18,86	29,37	41,9
Astrozytome						
U 373	5345,75	1046,16	1140,78	1740,04	9581,19	10271,86
WE 66	248,5	113,02	151,96	199,3	478,91	602,02
DE 10	476,48	538,42	566,53	739,4	866,57	750,46
WL 64	4,7	3,32	3,54	6,57	11,82	8,04
IA 84	7,4	4,01	6,17	8,01	11,98	27,89
NR 93	49,61	27,98	36,24	57,92	92,2	96,65
Meningeome						
ZK 14	200,1	184,29	274,64	265,49	328,54	396,68
SM 45	12,76	9,23	10,22	7,16	8,93	14,79
SG 53	4,71	2,14	2,78	6,12	8,33	9,75
RR 59	3,83	3,05	4,46	3,84	4,45	8,17
HH 68	1062,5	915,98	2644,78	2800,33	2481,79	3994,04
AE 78	21,6	15,45	22,4	11,59	15,1	26,29
NC 82	86,79	65,54	78,85	71,11	89,19	156,46
HR 90	149,87	105,15	153,32	130,52	168,2	288,44
Metastasen						
FE 65	190,8	56,74	159,24	78,72	245,62	261,49
GE 83	8,12	3,01	4,33	5,09	16,13	22,24
HH 28	1,92	0,61	1,11	1,27	2,39	3,33
WH 22	39,87	12,41	19,74	30,94	51,24	64,32

Tabelle 11.

Absolute Invasion der einzelnen Listerienstämme [arithmetischer Mittelwert $a/10^6$ eingesetzten Listerien]

	EGD	$\Delta inlAB2$	$\Delta inlAB2+$ <i>inlA</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlB</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlB_{PinlA}</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlAB_{PinlA}</i>
Glioblastome						
U87	100	78,55	74,81	77,2	248,99	267,39
US 11	100	27,93	82,17	49,99	72,08	170,7
PH 15	100	79,66	113,4	144,2	181,18	225,19
PE 17	100	30,79	59,23	66,99	99,19	121,65
SG 33	100	45,25	46,51	96,8	190,97	231,93
SK 54	100	24,69	39,19	72,15	157,43	87,71
CE 63	100	28,33	42,35	95,95	237,04	283,89
WP 02	100	37,06	61,82	104,94	207,29	231,67
MW72	100	31,63	69,96	84,78	157,81	213,96
EM 74	100	24,35	57,63	85,26	185,94	268,73
KH 86	100	28,42	66,07	79,95	124,5	177,6
arith.MW		39,6963636	64,8309091	87,11	169,310909	207,310909
StandAW		20,3577500	20,92323563	24,31882851	54,69657475	62,18903592
Astrozytome						
U373	100	19,57	21,34	32,55	179,23	192,15
WE 66	100	45,48	61,15	80,02	192,72	242,26
DE 10	100	113,96	118,9	155,18	181,87	157,5
WL 64	100	70,66	75,38	139,69	251,49	171,03
IA 84	100	54,24	83,39	108,19	161,91	376,92
NR 93	100	56,4	73,04	116,76	185,84	194,81
arith.MW		60,0516667	72,2	105,398333	192,176667	222,445
StandAW		31,3587438	31,70415178	44,14057789	30,8169912	80,99135182
Meningeome						
ZK 14	100	92,1	137,25	132,68	164,19	198,24
SM 45	100	72,34	80,1	56,1	70,01	115,92
SG 53	100	45,5	59,12	130	176,83	207,08
RR 59	100	79,73	116,53	100,26	116,21	213,26
HH 68	100	86,21	248,92	263,56	233,58	375,91
AE 78	100	71,55	103,69	53,68	69,96	121,7
NC 82	100	75,52	90,85	81,93	102,77	180,27
HR 90	100	70,16	102,3	87,09	112,23	192,46
arith.MW		74,13875	117,345	113,1625	130,7225	200,605
StandAW		13,8741130	58,06522269	67,50646292	56,74209441	80,01509893
Metastasen						
FE 65	100	29,74	83,46	41,26	128,73	137,05
GE 83	100	37,01	53,29	62,72	198,62	273,84
HH 28	100	31,71	57,6	66,12	124,73	173,5
WH 22	100	31,13	49,52	77,61	128,53	161,33
arith.MW		32,3975	60,9675	61,9275	145,1525	186,43
StandAW		3,18416263	15,35406434	15,17993714	35,69247388	60,21098294

Tabelle 12.

Relative Invasion der Listerienstämme [arithmetisches Mittel in Prozent der Wildtypinvasion]

	EGD	$\Delta inLAB2$	$\Delta inLAB2+$ <i>inLA</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLB</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLB_{P_{inLA}}</i>	$\Delta inLAB2+$ <i>inLAB_{P_{inLA}}</i>
Glioblastome						
U 87	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
US 11	++++	++	+++	+++	+++	+++++
PH 15	+++	++	+++	+++	++++	++++
PE 17	++++	++	++	++	++++	+++++
SG 33	++++	+	++	+++	++++	+++++
SK 54	++	+	+	+	++	++
CE 63	+++	++	++	+++	++++	+++++
WP 02	++	+	+	++	++	++
MW72	+++	+	+	++	+++	++++
EM 74	+++	+	++	+++	+++	++++
KH 86	+	+	+	+	++	++
Astrozytome						
U 373	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
WE 66	+++	+	++	+++	++++	+++++
DE 10	++++	+++	+++	++++	+++++	+++++
WL 64	++	+	+	++	++	++
IA 84	++	+	+	+	++	++
NR 93	++	+	++	++	+++	+++
Meningeome						
ZK 14	+++	+++	+++	+++	++++	++++
SM 45	++	+	++	+	++	++
SG 53	++	+	++	++	++	++
RR 59	++	+	+	+	+	++
HH 68	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
AE 78	++	+	+	+	+	++
NC 82	+++	+	++	+	++	+++
HR 90	+++	++	+++	++	+++	+++
Metastasen						
FE 65	+++	+	++	++	+++	++++
GE 83	++	+	+	++	++	++
HH 28	++	+	+	++	++	++
WH 22	++	+	+	++	++	+++

Tabelle 13.
Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Adhäsion der einzelnen Listerienstämme

>40/100 Zellen adhärirt +++++
20-40/100 Zellen adhärirt ++++
10-20/100 Zellen adhärirt +++
5-10/100 Zellen adhärirt ++
0-5/100 Zellen adhärirt +

	EGD	$\Delta inlAB2$	$\Delta inlAB2+$ <i>inlA</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlB</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlB_{P_{inlA}}</i>	$\Delta inlAB2+$ <i>inlAB_{P_{inlA}}</i>
Glioblastome						
U 87	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
US 11	+++	+	++	++	++	++++
PH 15	++	+	++	++	+++	++++
PE 17	+++	++	++	++	+++	++++
SG 33	++	+	+	++	+++	++++
SK 54	+	+	+	+	+	+
CE 63	++	+	+	++	+++	++++
WP 02	+	+	+	+	+	+
MW72	++	+	+	+	++	+++
EM 74	++	+	+	++	+++	++++
KH 86	+	+	+	+	+	+
Astrozytome						
U 373	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
WE 66	++	+	+	++	+++	++++
DE 10	+++	+++	+++	++++	++++	++++
WL 64	+	+	+	+	+	+
IA 84	+	+	+	+	+	+
NR 93	+	+	+	+	++	++
Meningeome						
ZK 14	++	++	++	++	+++	+++
SM 45	+	+	+	+	+	+
SG 53	+	+	+	+	+	+
RR 59	+	+	+	+	+	+
HH 68	++++	++++	++++	++++	++++	++++
AE 78	+	+	+	+	+	+
NC 82	++	+	+	+	+	++
HR 90	++	+	++	+	++	+++
Metastasen						
FE 65	++	+	+	+	++	++
GE 83	+	+	+	+	+	+
HH 28	+	+	+	+	+	+
WH 22	+	+	+	+	+	++

Tabelle 14.
Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der absoluten Invasion der einzelnen Listerienstämme

>40/100 Zellen invadiert +++++
20-40/100 Zellen invadiert ++++
10-20/100 Zellen invadiert +++
5-10/100 Zellen invadiert ++
0-5/100 Zellen invadiert +

7.1 Tabellenübersicht

Tabelle 1. Häufigkeitsverteilung bei neu diagnostiziertem Gliom	1
Tabelle 2. Übersicht von häufig in Glioblastomzellen nachgewiesenen Veränderungen	3
Tabelle 3. Zusammenfassung der unterschiedlichen genetischen Merkmale sekundärer und primärer Glioblastome	4
Tabelle 4. Schematische Darstellung der Plasmidklonierungsstrategie	42
Tabelle 5. Zusammengefaßte relative Invasionsraten <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a $\Delta inLAB2$	52
Tabelle 6. Zusammengefaßte relative Invasionsraten <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a $\Delta inLAB2+inIA$	53
Tabelle 7. Zusammengefaßte relative Invasionsraten <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a $\Delta inLAB2+inIB$	53
Tabelle 8. Zusammengefaßte relative Invasionsraten <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a $\Delta inLAB2+inIB_{P_{inIA}}$	54
Tabelle 9. Zusammengefaßte relative Invasionsraten <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a $\Delta inLAB2+inLAB_{P_{inIA}}$	54
Tabelle 10. Zusammenfassende Darstellung der mittleren Invasionsraten	55
Tabelle 11. Zusammenfassung Mittelwerte der absoluten Listerieninvasion	88
Tabelle 12. Zusammenfassung Mittelwerte der relativen Listerieninvasion	89
Tabelle 13. Zusammenfassung fluoreszenzmikroskopisch bestimmter Adhäsion	90
Tabelle 14. Zusammenfassung fluoreszenzmikroskopisch bestimmter Invasion	91

7.2 Abbildungsnachweis

Abb. 1	11
Schema des Infektionszyklus und der Virulenzfaktoren von <i>L.monocytogenes</i>	
Abb. 2	26
Schematischer Ablauf der Invasionsversuche	
Abb. 3	46
Schematische Darstellung der <i>EGFP</i> -Amplifizierung	
Abb. 4	51
Beispiel eines β -Gal-Assays (293T-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> 1/2a+pCS1)	
Abb. 5	51
Beispiel der Immunfluoreszenzfärbung (A172-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> 1/2a)	
Abb. 6	59
Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Kontrollverdauansätzen der Ausgangsplasmide	
Abb. 7	60
Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Kontrollverdauansätzen der Plasmide pCS2a und pCS3a	
Abb. 8	61
Gelelektrophorese der präparativen Restriktionsverdauansätze	
Abb. 9	62
Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Kontrollverdauansätze der endgültigen Vektoren	
Abb. 10	63
U87-Zellen nach Lipofektion von pCMV β	
Abb. 11	63
U87-Zellen nach Lipofektion von pCS1	
Abb. 12	64
U87-Zellen nach Lipofektion von pCS3a	
Abb. 13	64
U87-Zellen nach Lipofektion von pCS3	
Abb. 14	64
U87-Zellen nach Lipofektion von pCS2a	
Abb. 15	64
U87-Zellen nach Lipofektion von pCS2	
Abb. 16 und 17	65
293T-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> +pCS1	
Abb. 18 und 19	65
U87-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> +pCS1	
Abb. 20 und 21	66
293T-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> +pCS3	
Abb. 22 und 23	66
U87-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> +pCS3	
Abb. 24	67
U87-Zellen nach Infektion mit <i>L.monocytogenes</i> +pCS2 in Durchlichtmikroskopie	

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ACNU	Aryl-2-chlorethyl-1-nitrosoharnstoff
<i>actA</i>	Virulenzgen für actin nucleation factor A von <i>L.monocytogenes</i>
ActA	Virulenzprotein actin nucleation factor A
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BCNU	1,3-Bis-2-chlorethyl-1-nitrosoharnstoff (Carmustin)
BHI	Brain-Heart-Infusion
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovine serum albumin
CCNU	1-2-chlorethyl-3-cyclohexyl-1-nitrosoharnstoff (Lomustin)
CD	Cytosin-Deaminase
CFU	colony forming units
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-(bis-aminoethylether)-tetraacetat
FDG	Fluoro-Desoxy-Glucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acid protein
GFP	green fluorescent protein
Gy	Gray
<i>hly</i>	Hämolysingen von <i>L.monocytogenes</i>
HSV	Herpes-Simplex-Virus
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheit
<i>inl</i>	Internalingen
Inl	Internalinprotein
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KPS	Karnofsky-Performance-Status
l	Liter
<i>lacZ</i>	beta-galactosidase-Gen aus <i>E.coli</i>
LB	Lactobroth
LLO	Listeriolysin
LRR	leucin rich repeat region
min.	Minute
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

mmol	Millimol
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
<i>NF-1</i>	Neurofibromatosegen Typ 1
<i>NF-2</i>	Neurofibromatosegen Typ 2
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NSE	Neuron Spezifische Enolase
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF-A	platelet derived growth factor A
PDGFR-a	platelet derived growth factor receptor a
PET	Positronenemissionstomographie
PI-3-Kinase	Phospho-Inositol-Kinase
<i>plcA</i>	Gen für Phospholipase A
<i>plcB</i>	Gen für Phospholipase B
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
<i>prfA</i>	Gen für den positiven Regulationsfaktor A
<i>RB 1</i>	Retinoblastomgen 1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SPECT	single photon emission computed tomography
Std.	Stunde
TB	transformation buffer
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
TGF	transforming growth factor
TK	Thymidinkinase
ÜNK	Übernachtkultur
VDEPT	virus directed enzymatic prodrug therapy
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

Ehrenwörtliche Erklärung

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 Angaben, 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.

Diese Arbeit wurde bislang weder an einer in- oder ausländischen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion eingereicht, noch habe ich anderweitig um Zulassung zur Promotion zum Dr. med. ersucht.

Teile der vorliegenden Arbeit gelangten bereits zur Veröffentlichung in:

Nestler U, Hain T, Schulz C, Domann E, Chakraborty T, Böker DK. **Glioblastom-Targeting mittels Oberflächenproteinen im Listerien-Modell.** Vortrag Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Neuroonkologie der DGNC - Molekulare Diagnostik und Genterapie maligner Hirntumoren; Dresden 1998

Schulz C, Nestler U, Hain T, Winking M, Domann E, Böker DK, Chakraborty T. **Fremdgentransfer in Glioblastomzellen mittels *Listeria monocytogenes*.** Vortrag 5. Rauschholzhausener Symposium - Maligne Gliome: Aktuelle Ergebnisse und neue Perspektiven in Diagnostik und Therapie; Rauschholzhausen 1999

Nestler U, Hain T, Schulz C, Winking M, Chakraborty T, Böker DK. **Expression of foreign genes in glioblastoma cells using a *Listeria monocytogenes* vector system.** Vortrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie; Bonn 1999; Acta Neuropathologica 98(5), 542 (1999)

Nestler U, Schulz C, Hain T, Domann E, Winking M, Böker DK, Chakraborty T. **Listerien Uptake in niedergradigen Gliomen und Glioblastomen.** Vortrag 6. Rauschholzhausener Symposium - Niedergradige Gliome: Strategien in Diagnostik und Therapie; Rauschholzhausen 2000

Nestler U, Schulz C, Hain T, Chakraborty T, Böker DK. **Expression des *E.coli lacZ*-Genes in Glioblastomzellen mittels eines *Listeria monocytogenes* Transfersystems.** Vortrag 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie; Lübeck 2000; Zentralbl Neurochir Suppl 1:29 (2000)

Hain T, Nestler U, Schulz C, Domann E, Böker DK, Chakraborty T. **The uptake of *Listeria monocytogenes* into primary glioblastoma cells is mediated by Internalin A and B.** Posterbeitrag Molekulare Mikrobiologie Mannheim (2001)

Gießen, den 07.11.2006

Chris Schulz

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit werden Experimente zum Gentransfer in humane Glioblastomzellen mit einem Genvektorsystem, basierend auf dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* 1/2a, beschrieben.

Die Untersuchung der Listerieninvasion in 2 etablierte Gliomzelllinien sowie 27 Primärkulturen intraoperativ entnommener Hirntumorpräparate zeigte, daß *L.monocytogenes* in der Lage ist, humane Hirntumorzellen zu invadieren. Die stärkste absolute Listerien-Wildtypinvasion wurde dabei unter den astrozytären Tumorzellen beobachtet. Die Invasion in diese Tumorzellen war deutlich von der Aktivität der bakteriellen invasiven Virulenzgene *Internalin A und B* abhängig. Die plasmidgesteuerte Überexpression dieser Virulenzgene in den verwendeten Listerienstämmen resultierte gegenüber Wildtypilisterien in einer auf 215% gesteigerten mittleren Invasion in astrozytäre Tumorzellen. Durch Deletion beider Internalingene hingegen wurde die bakterielle Invasion in astrozytäre Zellen im Mittel auf 50% reduziert.

Als Reportergene des Fremdgentransfers wurden *lacZ* und *EGFP* gewählt. Mit hierfür konstruierten Plasmidvektoren konnte per Lipofektion in astrozytäre Zellen die intrazelluläre Fremdgenaktivität festgestellt werden. Durch Transformation der Plasmidvektoren in *Listeria monocytogenes* 1/2a wurden komplementierte Listerien-Stämme generiert, deren Eignung zum vektoriiellen Fremdgentransfer in astrozytäre Zellen zu untersuchen war.

Derart komplementierte Wildtypstämme von *Listeria monocytogenes* waren in der Lage, die gewählten Reportergene in humane Zellen zu transportieren. Transferraten von bis zu 70% wurden in Zellen der epithelialen Zelllinie 293T beobachtet. Die Transfereffizienz in den untersuchten astrozytären Zellen lag zwischen 3-5%.

Eine Transferrate von mehr als 10% sollte für einen therapeutischen Gentransfer (von beispielsweise Suizidgenen) angestrebt werden. Unter anderem durch Veränderung der Virulenzfaktorausstattung des Vektors, spezifiziertes Targeting der Wirtszelle und durch Optimierung der Fremdgene für die intrazelluläre Transkription und Translation könnte eine weitere Steigerung der Transfereffizienz erreicht werden.

SUMMARY

Experiments for gene transfer into human glioblastoma cells using the facultative intracellular bacterium *listeria monocytogenes* are described in the presented paper.

Examination of bacterial invasion into stable glioblastoma cells and primary cell cultures of different intracranial tumors did show, that *listeria* are able to enter these cells, depending on the cell origin and the existing bacterial virulence factors. The strongest absolute invasion of wild type *listeria monocytogenes* was observed in cells of astrocytic origin. Using bacterial mutants with deletion of the virulence genes *internalin A* and *B* results in a distinct reduced invasion in astrocytic cells (50%), whereas overexpression of this genes by a privileged transcribed plasmid could essentially increase the invasion number of the *listeria* mutants (215%).

For the gene transfer studies two reporter genes, *lacZ* and *EGFP*, in special constructed plasmids were used. Via lipofection these reporter gene containing plasmids were conducted into human cells and the activity of the foreign genes was observed by fluorescens microscopy and the β -galactosidase staining assay. These reporter gene containing plasmids were transfered to *listeria monocytogenes* protoplasts and after culturing of the bacteria a complete bacterial gene transfer vector system was created, able to invade human brain tumor cells and to deliver the foreign genes.

More than 70% of 293T cells, a human renal epithelial cell line, could succesfully transfected in the developed transfer procedure. However in glioblastoma cells this transfer rate could not increased up to 10%. This number should be reached at least to detect significant therapeutic effects, for instance in suicide gene transfer protocols.

By optimizing more factors of the three interacting instances (bacterium, plasmid vector and host cell) a higher transfer rate could result.

LEBENS LAUF

- Geburtsdaten:** geboren am 25. September 1974 in Parchim (Mecklenburg)
- Schulbildung:** 1981-1990 Johann-Wolfgang-von Goethe-Oberschule in Neustadt-Glewe
1990-1993 Friedrich-Franz-Gymnasium in Parchim
- Wehrdienst:** 1993-1995 Heeres- und Marinesanitätsdienst der Bundeswehr
- Studium:** April 1996 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität zu Gießen
- März 1998 Ärztliche Vorprüfung bestanden
- Juli-August 1998 Famulatur am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr.rer.nat. Chakraborty)
- August-September 1998 Famulatur an der Universitätsklinik für Kardio-Vaskularchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr.med. Hehrlein)
- März 1999 Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
- Juli-August 1999 Famulatur an der Universitätsklinik für Neurochirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr.med. Böker)
- August-September 1999 Famulatur an der Universitätsklinik für Kardio-Vaskularchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr.med. Hehrlein)
- März-April 2000 Famulatur an der Abteilung Neurochirurgie des BWZK Koblenz (Leitender Arzt: Flottenarzt Dr.med. Klawki)
- Juli-September 2000 Famulatur an der Universitätsklinik für Neurochirurgie der Universität Wien (Vorstand: Univ.-Prof. Dr.med. Ungersböck)
- September-Oktober 2000 Famulatur an der Abteilung Neurochirurgie des BWZK Koblenz (Leitender Arzt: Flottenarzt Dr.med. Klawki)
- April 2001 Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
- April 2001-März 2002 Praktisches Jahr
1. Terial Neurochirurgie (Neurochirurgische Klinik der JLU Gießen)
2. Terial Chirurgie (Department Chirurgie des UniversitätsSpitals Zürich)
3. Terial Innere Medizin (Medizinische Kliniken der JLU Gießen)
- April 2002 Ärztliche Prüfung bestanden (Gesamtnote „sehr gut“)
- Ärztliche Tätigkeit:** seit Mai 2002 Weiterbildungsassistent der Neurochirurgischen Klinik BWZK Koblenz
seit Juli 2006 Weiterbildungsassistent der Neurochirurgischen Klinik BWK Ulm

Gießen, den 07.11.2006

Chris Schulz

DANKSAGUNG

Die Experimente, deren Ergebnisse in dieser Arbeit resultieren, wurden in der Zeit vom Mai 1998 bis zum Oktober 2001 in labortechnischen Abteilungen an der Neurochirurgischen Klinik sowie am Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt.

Den Direktoren, Herrn Prof. Dr. med. Böker und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Chakraborty, gilt mein Dank für das Anvertrauen dieses äußerst interessanten Themas sowie für die Erlaubnis, an den jeweiligen Laborplätzen beider Einrichtungen arbeiten zu dürfen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Winking danke ich nicht nur für die Beratung bei Fragen zur Tumorbilogie, sondern sowohl stellvertretend als auch persönlich für die Anleitung und Ausbildung während meines neurochirurgischen PJ-Wahlfachtertials im Sommer 2001 in Gießen.

Herrn Dr. med. Ulf Nestler gilt mein besonderer Dank für die ausführliche wissenschaftliche Betreuung des Gesamtprojekts sowie die Anleitung zum korrekten Arbeiten mit Zellkulturen und die kritische Korrektur des Manuskriptes.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Torsten Hain möchte ich mich für die intensive fachliche Anleitung und Einarbeitung in mikrobiologische Arbeitstechniken bedanken, außerdem wurden von ihm die verschiedenen Listerienstämme zur Verfügung gestellt.

Dankend möchte ich zudem Herrn Dr. med. Phillipos Pashalidis erwähnen, der mir bei den ersten Schritten im mikrobiologischen Labor mehr als hilfreich zur Seite stand, ebenso Frau Dr. rer. nat. Sonja Otten, die eines der wichtigen Ausgangsplasmide beisteuerte.

Für die Rücksichtnahme und das Verständnis der Notwendigkeit möchte ich mich besonders beim OP-Personal der Neurochirurgischen Klinik in Gießen bedanken.

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern beider Einrichtungen sei für die freundliche und zuvorkommende Behandlung Dank gesagt.